



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización bioquímica y estructural de los proteasomas de una línea celular de *Arabidopsis thaliana* bajo diferentes condiciones de estrés”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIOL. DANIEL ARISTIZÁBAL RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Fernando Lledías Martínez
Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Tomás David López Díaz
Instituto de Biotecnología - UNAM

Dra. Georgina Ponce Romero
Instituto de Biotecnología - UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. José Fernando Lledías Martínez en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de estudios de posgrado con número 548874 y por DGAPA – UNAM a través del apoyo a los proyectos PAPIIT IN208313 (Proteólisis regulada en la respuesta de defensa de las plantas - Dr. José Fernando Lledías Martínez) y PAPIIT IN212116 (Caracterización bioquímica y estructural de los proteasomas de plantas - Dr. José Fernando Lledías Martínez).

AGRADECIMIENTOS

ACADÉMICOS

Al Dr. Fernando Lledías por sus enseñanzas, su asesoría, su apoyo y su paciencia durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Mario Rocha Sosa (q.e.p.d.) por haberme aceptado en su laboratorio.

Al Dr. Plinio Guzmán Villate y a Laura Aguilar Henonin, del Cinvestav – Irapuato, por la donación de los cultivos celulares usados para este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Georgina Ponce y Dr. Tomás López por su acompañamiento académico a lo largo del proceso.

A los miembros del jurado: Dra. Gladys Cassab López, Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, Dr. Carlos Amero Tello, Dra. Claudia Díaz Camino y Dr. José Luis Reyes Taboada.

Al cuarto oscuro por recibirme y soportarme durante largas tardes.

A la unidad de docencia del IBT – UNAM, especialmente al Lic. J. Antonio Bolaños Guillén y a la Dra. Claudia Treviño.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por el apoyo para la asistencia a congresos nacionales.

Al CONACyT y al PAPIIT por mi beca de maestría y la financiación de los proyectos que hicieron posible la realización de este trabajo, respectivamente.

Al Instituto de Biotecnología – IBT y la Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM.

PERSONALES

A mi padre y a mi madre, a quienes va dedicado este trabajo, por apoyarme y motivarme incondicionalmente. Ustedes han sido mi motor a lo largo de estos años, y durante este proceso no fue la excepción. Simplemente gracias. A mi hermano y a mi hermana por estar a mi lado en todo momento y ser mis amigos incondicionales. Este triunfo es de los cinco, familia.

A Andrea Camacho un “gracias totales” que lo abarca todo.

A mi familia en México: Nathy, Charlie, Marianita, Danielita, Jei y Adri. Nunca terminaré de agradecerles ni podré pagarles todo lo que hicieron por mí en este tiempo.

A mis “parceros” más cercanos: Checho, Chuy e Ivanito por compartir momentos memorables durante estos dos años. Grandes amigos que deja la vida.

A mis compatriotas, pero sobre todo amigos: Clau, Luis Fe, Leidy, Ori y Adri. Gracias por su invaluable amistad y por hacerme sentir como si estuviera en casa.

A mis amigos y compañeros de maestría, especialmente a Emma, Caro, Lula y Edgardo por su compañía y amistad durante la maestría.

A mis amigos de fútbol por dos años de goles, gambetas y buena amistad: Adam, Cabo, Palens, Braulio, Perro, Pedro Arenas, Chiri, Villa y todos aquellos con los que tuve el gusto de compartir una cancha.

A Paty Rueda y Fernando porque gracias a ellos conocí el IBT y pude llegar a México.

A Guillermo y Rosy por su hospitalidad y generosidad.

A Doña Au y su deliciosa sazón por mantenerme vivo y bien alimentado durante estos dos años.

A mis compañeros de laboratorio: Viri, Alexis, Alma, Marel, Eli, Pepe por su apoyo técnico y por las incontables tardes que disfrutamos en el lab.

A todas aquellas personas con las que me crucé en el camino, que de una u otra forma dejaron una huella en mí e hicieron de esta maestría una experiencia inolvidable.

A todos gracias.

Tabla de Contenido

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>7</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>8</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>9</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>11</i>
EL PROTEASOMA	11
PROTEASOMA 20S	11
PROTEASOMA 26S	13
REGULADOR 19S	14
SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA (SUP)	15
OTROS REGULADORES PROTEASOMALES	18
PA200 y BLM10	18
11S o PA28	19
INMUNOPROTEASOMA	20
ECM29	21
PR500	22
PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PROTEASOMA (PAPs)	23
ESTRÉS OXIDATIVO	25
AUMENTO DE TEMPERATURA	26
GENERALIDADES Y ANTECEDENTES EN NUESTRO LABORATORIO	28
<i>HIPÓTESIS</i>	<i>29</i>
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	<i>30</i>
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	<i>30</i>
<i>METODOLOGÍA</i>	<i>30</i>
CULTIVO DE CÉLULAS	30
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PROTEASOMAS	31
TRATAMIENTO CON PARAQUAT	32
TRATAMIENTO POR AUMENTO DE TEMPERATURA	32
SEPARACIÓN MEDIANTE BN-PAGE DE LAS DIFERENTES VERSIONES DEL PROTEASOMA	33
WESTERN BLOT	33
ELECTROELUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LAS MUESTRAS DE LOS TRATAMIENTOS CON PARAQUAT Y AUMENTO DE TEMPERATURA	34
ENSAYOS DE CARBONILACIÓN Y UBIQUITINACIÓN DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON PARAQUAT Y LAS SOMETIDAS A AUMENTO DE TEMPERATURA	34
ENSAYO DE VIABILIDAD	36

<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	36
EXTRACCIÓN DE PROTEASOMAS	36
SEPARACIÓN DE LAS POBLACIONES PROTEASOMALES MEDIANTE BN-PAGE EN CÉLULAS CONTROL	38
TRATAMIENTO CON PARAQUAT (ESTRÉS OXIDATIVO)	40
TRATAMIENTO POR AUMENTO DE TEMPERATURA	64
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE PROTEASOMAS DE ALTO PESO MOLECULAR	77
<i>CONCLUSIONES</i>	79
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	81

Índice de figuras

Figura 1. Proteasoma 20S.	12
Figura 2. Proteasoma 26S.	14
Figura 3. Diagrama esquemático del sistema ubiquitina-proteasoma.	17
Figura 4. Regulador Blm10 de <i>S. cerevisiae</i> .	19
Figura 5. Regulador 11S o PA28 de mamíferos.	20
Figura 6. Esquema del inmunoproteasoma.	21
Figura 7. Regulador Ecm29.	22
Figura 8. Extracción y enriquecimiento de proteasomas.	38
Figura 9. Separación de poblaciones proteasomales por BN-PAGE en células control.	40
Figura 10. Tinción con Azul de Coomassie y western blot.	42
Figura 11. Electroelución de la proteína usada como control de carga.	43
Figura 12. Tinción con nitrato de plata de las muestras del tratamiento con paraquat.	44
Figura 13. Tinción con Rojo Ponceau de una muestra tratada a 37°C.	46
Figura 14. Tratamientos control sin adición de paraquat.	49
Figura 15. Western blot de las células tratadas con 5 µM de paraquat a diferentes tiempos.	50
Figura 16. Western blot de las células tratadas con 50 µM de paraquat a diferentes tiempos.	52
Figura 17. Western blot de las células tratadas con 500 µM de paraquat a diferentes tiempos.	53
Figura 18. Medición de marcadores de estrés.	58
Figura 19. Tinción con Azul de Coomassie y western blot.	66
Figura 20. Tinción con nitrato de plata del BN-PAGE de las muestras del tratamiento con aumento de temperatura.	68

Figura 21. Tratamientos control sin aumento de temperatura.	69
Figura 22. Tratamientos sometidos al aumento de temperatura.	70
Figura 23. Medición de marcadores de estrés.	72
Figura 24. Microscopía electrónica del proteasoma.	78

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones y tiempos de los tratamientos con paraquat.	41
Tabla 2. Determinación de cuentas viables de los cultivos en presencia de paraquat.	48

Resumen

El proteasoma es reconocido como el complejo multicatalítico clave de la degradación no lisosomal de proteínas. Es responsable del recambio proteico intracelular y está involucrado también en varios procesos reguladores centrales que incluyen el ciclo celular, la traducción de señales, la apoptosis y la expresión génica entre otros procesos celulares (Schwartz & Ciechanover, 1999).

La estructura mínima básica del proteasoma, la cual le da su definición como tal, es el centro catalítico 20S, el cual tiene forma de barril. El proteasoma 20S es capaz de degradar prácticamente cualquier proteína, sin que éstas requieran ubiquitinación ni ATP y sin que se le asocien otras partículas proteicas reguladoras. El 20S ha sido aislado de algunas plantas tales como hojas de espinaca, de semillas de chícharos secos y de hojas de trigo. Las características bioquímicas de los proteasomas aislados de estas plantas son casi idénticas a las de los proteasomas aislados de otros eucariotas. El proteasoma 20S puede unir diferentes reguladores (p.e. las partículas 19S, PA28, PA200, PR500 o Blm 10), a uno o ambos extremos, que modifican la especificidad de los sustratos a degradar y de los péptidos que se producen como resultado de esta degradación. Al unirse estas moléculas reguladoras se forman otras versiones de proteasomas, cada una con su función determinada (Iwanczyk *et al.*, 2006).

La mayoría de estudios sobre el proteasoma se han realizado en células de mamíferos y de levaduras. En estos modelos de estudio se han identificado diferentes versiones proteasomales que cumplen una función de acuerdo a las condiciones dadas en la célula en ese momento. Los estudios en células vegetales y particularmente en *Arabidopsis thaliana* son muy escasos. Además de esto, no hay información sobre las posibles modificaciones (estructurales y/o funcionales) que puedan experimentar los proteasomas en plantas.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue caracterizar bioquímica y estructuralmente las diferentes versiones del proteasoma de células en cultivo de *A. thaliana* así como las Proteínas Asociadas al Proteasoma (PAPs) que se observen en respuesta al estrés oxidativo y al estrés por aumento de temperatura. Para esto utilizamos una línea celular de *A. thaliana* que fue sometida a estrés oxidativo, mediante la adición de diferentes concentraciones de paraquat, y a estrés por aumento de temperatura al someterlas a 37°C. Los proteasomas de estos cultivos celulares fueron enriquecidos por ultracentrifugación diferencial para posteriormente poder establecer si las condiciones de estrés condicionaron el establecimiento o ensamble de diferentes versiones del proteasoma.

Dentro de los principales resultados obtenidos para el tratamiento con estrés oxidativo está la identificación de distintas poblaciones proteasomales de alto peso molecular (mayor al 20S independiente) en los tratamientos con paraquat. La presencia de estos proteasomas de alto peso molecular coincide con el aumento de los niveles de proteínas ubiquitinadas y carboniladas, sugiriendo que éstos podrían estar cumpliendo alguna función en la regulación de estos dos procesos. El aumento de la temperatura produjo un aumento de poblaciones proteasomales de alto peso molecular. Pero a diferencia del tratamiento con paraquat, los niveles de ubiquitinación disminuyeron en todos los tiempos, mientras que el nivel de proteínas carboniladas se mantuvo prácticamente invariable. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con paraquat o ante un aumento de la temperatura en el cultivo se observan cambios en las poblaciones proteasomales y se evidencia la aparición de versiones de proteasoma de alto peso molecular, las cual pueden estar jugando un papel importante para responder ante estas condiciones adversas. Estos resultados apoyan lo encontrado previamente en nuestro laboratorio en otra línea celular de *A. thaliana* con tratamientos semejantes, lo que sugiere que ésta puede ser una respuesta general de la célula vegetal ante condiciones adversas.

Introducción

El proteasoma

El proteasoma es un complejo multienzimático encargado de la degradación no lisosomal de proteínas en la célula. Es responsable del recambio proteico intracelular y está involucrado también en varios procesos reguladores centrales que incluyen el ciclo celular, la traducción de señales, la apoptosis y la expresión génica entre otros procesos celulares (Schwartz & Ciechanover, 1999). Es una proteasa esencial en el citoplasma y núcleo de las células eucariotas, ocupa cerca del 1% de las proteínas celulares solubles (en células HeLa) (Farout & Friguet, 2006; Hendil, *et al.*, 2002).

En las células eucariotas el proteasoma es el encargado de degradar la mayoría de proteínas, y produce pequeños péptidos de 3 – 25 aminoácidos que a su vez son digeridos en aminoácidos sencillos por una proteasa llamada tripeptidil proteasa (TPP). El resto de proteínas se degradan vía lisosoma en aminoácidos sencillos. (Schreiber & Peter 2014). La degradación de proteínas vía proteasoma puede ser dependiente del ATP o independiente de éste, como veremos más adelante.

Proteasoma 20S

La estructura mínima básica del proteasoma, la cual le da su definición como tal, es el centro catalítico 20S que tiene una masa de 700 kDa y está presente en plantas, animales, levaduras, bacterias y archa. Este centro catalítico es donde se lleva a cabo la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas y el control de calidad de proteínas recién sintetizadas que están involucradas en la regulación del ciclo celular, expresión

génica, respuesta inmune, respuesta a estrés y carcinogénesis (Jung & Grune, 2012). La partícula 20S tiene una topología de forma de barril formada por cuatro anillos apilados (dos internos β y dos exteriores α) compuesto de siete subunidades cada uno (Vierstra, 1996), cada una de las cuales tiene una masa molecular entre 20 y 30 kDa (Figura 1).

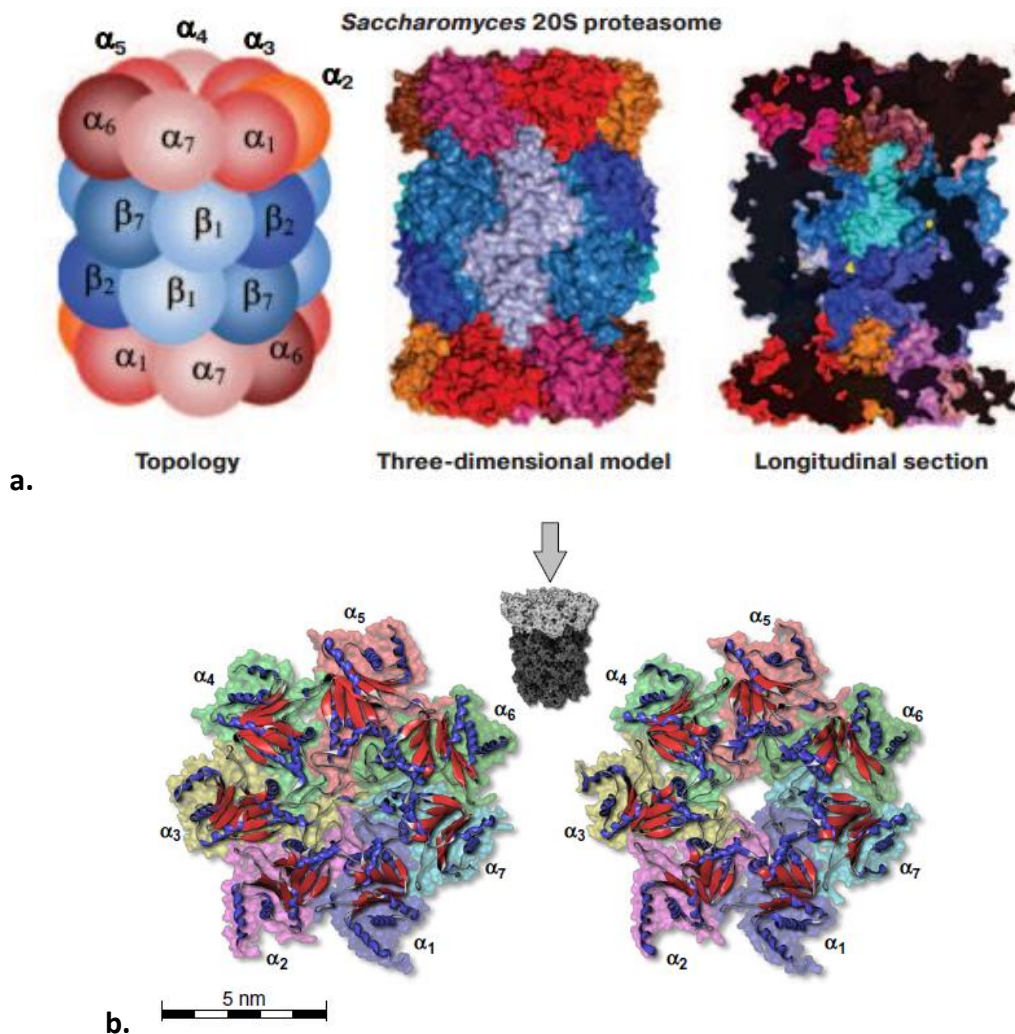


Figura 1. Proteasoma 20S. **a)** Topología y modelo tridimensional del proteasoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*. El proteasoma consiste de dos copias de siete diferentes subunidades α y dos copias de siete diferentes subunidades β . En la sección longitudinal, los residuos de treonina en la cámara catalítica se muestran en color amarillo (Tomada de Sorokin *et al.*, 2009). **b)** Puerta del proteasoma 20S eucariota. Esta imagen muestra un rearrreglo estructural de los anillos alfa del 20S de *C. cerevisiae* sin (imagen de la izquierda) y después de la activación (imagen de la derecha). La activación puede ser inducida por la unión de una proteína sustrato, de oligopéptidos cortos o de proteínas reguladoras. Después de la activación se facilita la entrada del sustrato debido a la apertura de la puerta formada por los extremos N-terminal de los anillos alfa (Tomada de Jung & Grune, 2012).

Los anillos β guardan tres subunidades proteolíticamente activas diferentes: caspasa ($\beta 1$), tripsina ($\beta 2$), y quimotripsina ($\beta 5$) (Fig. 1a) que permiten romper uniones peptídicas en el extremo C – terminal de aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos (Saeki & Tanaka, 2012); por esto la actividad proteolítica del proteasoma 20S es capaz de degradar virtualmente cualquier proteína. Estas tres subunidades ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$) contienen residuos de treonina catalíticamente activos en su N – terminal por lo que tienen actividad hidrolasa N – terminal nucleófila: esto indica que el proteasoma es una treonin – proteasa (Saeki & Tanaka, 2012).

Las subunidades o anillos α están encargados de regular la entrada de los sustratos a la cámara catalítica, y forman una especie de “puerta” muy angosta que está prácticamente cerrada (Fig. 1b) (Jung & Grune, 2012; Saeki & Tanaka, 2012). Esta puerta tiene una estructura ordenada formada por los residuos N – terminal de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$. La apertura de esta puerta está controlada por reguladores/activadores proteasomales que se pueden unir al 20S y de los cuales hablaremos más adelante.

Proteasoma 26S

Una de las versiones de proteasoma mejor estudiadas es el proteasoma 26S (Figura 2), la cual está altamente conservada y es especialmente homogénea entre los eucariotas (Pickart & Cohen, 2004; Wolf & Hilt, 2004). El proteasoma 26S es una proteasa multisubunitaria (está compuesto de al menos 33 subunidades) con masa molecular de 2.5 MDa (Schreiber & Peter, 2014), compuesta por dos subcomplejos: una partícula central o “core particle” (CP) 20S (700 kDa) donde se lleva a cabo la proteólisis, y una partícula reguladora o “regulatory particle” (RP) 19S (900 kDa) que se une a uno o ambos extremos del CP y prepara al sustrato para ser internalizado y degradado. El proteasoma 26S es muy abundante en el núcleo y el citoplasma, donde degrada principalmente proteínas reguladoras de vida corta (Schreiber & Peter, 2014). El 26S degrada, con ayuda del ATP, proteínas funcionales a las que se ha unido de forma covalente una cadena de poli-ubiquitina; por lo tanto controla negativamente la abundancia de un gran número de

proteínas reguladoras envueltas en cascadas de señalización y rutas metabólicas (Kurepa *et al.*, 2009). Además, es importante en el control de calidad de proteínas ya que degrada las que están mal plegadas o desnaturalizadas por errores en el proceso de traducción. Por eso, se dice que el proteasoma 26S es el componente proteolítico del sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) (Kurepa *et al.*, 2009).

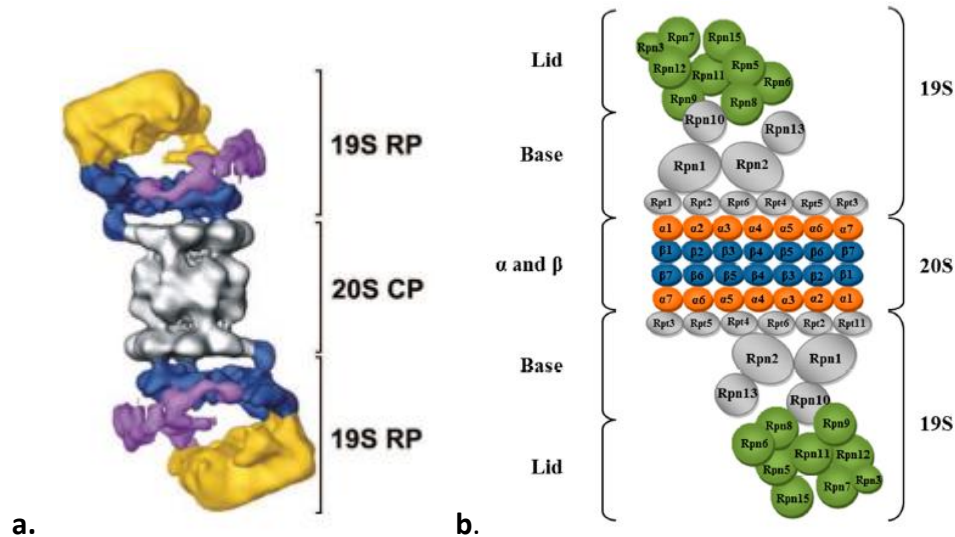


Figura 2. Proteasoma 26S. a) Modelo 3D de baja resolución del proteasoma 26S, obtenido por microscopía electrónica (Tomada de Sorokin, 2009). b) Esquema del proteasoma 26S. Se muestran las proteínas que conforman la base (color gris) y la tapa (color verde) de la subunidad reguladora 19S. La porción cilíndrica del 20S se muestra en una conformación abierta, mostrando el arreglo de las subunidades α y β identificadas en naranja y azul respectivamente (Tomada de Díaz-Villanueva *et al.*, 2015).

Regulador 19S

Uno de los reguladores/activadores proteasomales que se pueden unir al 20S es el regulador 19S, también conocido como PA700. La unión del 19S a uno o ambos extremos del 20S forman el proteasoma 26S (Schreiber & Peter, 2014; Kurepa, 2009; Glickman *et al.*, 1998). La subunidad 19S es la mejor descrita actualmente y está formada por dos estructuras principales: la base y la tapa. La primera tiene una conformación en anillo que interactúa directamente con la superficie distal de las subunidades alfa del 20S y la tapa está formada por nueve subunidades cuya función principal es la de reconocimiento de las

proteínas poli-ubiquitinadas que serán translocadas a la cavidad catalítica del 20S (Fig. 2) (Jung & Grune, 2012).

La base está conformada por seis subunidades con función de AAA-ATPasas (Rpt1-6) que forman un anillo y 3 subunidades sin actividad de ATPasa (Rpn1, Rpn2 y Rpn10) que al parecer funcionan como sitio de anclaje de otras proteínas (Kurepa & Smalle, 2008; Yang *et al.*, 2004; Glickman *et al.*, 1998). La tapa está formada por nueve subunidades no ATPasas (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12 y Rpn15) (Saeki & Tanaka, 2012; Glickman *et al.*, 1998). La unión entre la base y la tapa está estabilizada por las subunidades Rpn10 y Rpt5 (Saeki & Tanaka, 2012; Kurepa & Smalle, 2008). Este regulador 19S realiza varias funciones: reconocimiento y unión selectiva de las proteínas a degradar, desnaturalización y desdoblamiento de las proteínas ubiquitinadas, remoción de las cadenas de poliubiquitina de las proteínas sustrato, apertura de la puerta formada por los extremos amino de las subunidades α que están en cada extremo de la partícula 20S y finalmente, el internamiento de los sustratos a la cámara proteolítica del cilindro para su degradación (Yang *et al.*, 2004; Finley, 2002; Kohler *et al.*, 2001).

Sistema ubiquitina proteasoma (SUP)

Las proteínas celulares son marcadas para degradación proteasomal a través de la ubiquitinación, es decir la unión de ubiquitinas a las proteínas blanco. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos (8 kDa) altamente conservada en eucariontes. Además de cumplir el papel en la degradación regulada de proteínas, la ubiquitina también está involucrada en el transporte vesicular, la modificación de histonas, la reparación del ADN, entre otras (Rocha, 2013; Zamudio *et al.*, 2012). La ubiquitina puede formar un enlace peptídico con otra ubiquitina por medio de la unión covalente de la glicina del C – terminal con una lisina de la otra molécula de ubiquitina (Rocha, 2013). Como la molécula de ubiquitina tiene siete lisinas (en las posiciones 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63), las cadenas de ubiquitina pueden adoptar diferentes formas dependiendo de la unión de la glicina con alguna de las lisinas. Por lo tanto el destino final de las proteínas ubiquitinadas dependerá de la conformación de la cadena de ubiquitina. Las cadenas que se unen por la lisina 63

(K63) son dirigidas mayoritariamente a procesos de endocitosis, mientras que las unidas en la lisina 48 (K48) serán destinadas a degradación por el proteasoma 26S (Schreiber & Peter, 2014; Rocha, 2013; Zamudio *et al.*, 2012).

Existen tres tipos de ubiquitinación: monoubiquitinación, multi-monoubiquitinación y poliubiquitinación. En la monoubiquitinación, el sustrato forma un enlace covalente con una sola molécula de ubiquitina. En la multi-monoubiquitinación el sustrato forma un enlace covalente con varias moléculas de ubiquitina en distintos lugares del mismo sustrato. En la poliubiquitinación se forman polímeros de ubiquitina en donde participan las siete lisinas (pero principalmente K48 y K63) (Schreiber & Peter, 2014; Rocha, 2013; Zamudio *et al.*, 2012).

En las células eucariotas el SUP es la vía principal que dirige la degradación selectiva de las proteínas. En la célula hay esencialmente dos clases de proteínas que son marcadas para degradación dependiente de ubiquitina: proteínas mal plegadas o dañadas que son detectadas por la pérdida de su estructura terciaria y proteínas funcionales que cargan señales de degradación específicas (Kurepa & Smalle, 2008). Por lo tanto se conocen dos funciones específicas del SUP. La primera es llevar a cabo el control de calidad en la célula, incluyendo la degradación de proteínas con errores de traducción y proteínas dañadas por estrés que se podrían agregar y ser tóxicas para la célula. La segunda es la regulación celular e involucra la remoción selectiva y condicional de proteínas regulatorias. Este proceso juega un papel crítico en la regulación de una gran variedad de procesos celulares que incluye el ciclo celular, la transducción de señales, la apoptosis y la expresión génica. La función alterada del SUP ha sido implicada en enfermedades humanas como el cáncer y el Alzheimer (Gentier & van Leeuwen, 2015; Morrow *et al.*, 2015).

En la cascada de ubiquitinación, las proteínas a degradar se marcan covalentemente con una cadena de ubiquitina. La reacción enzimática (llamada ubiquitinación) comienza con la activación de una molécula de ubiquitina mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina del extremo C – terminal; la glicina se adenila (se requiere ATP). La ubiquitina activa se une a un residuo de cisteína en el extremo N - terminal de una enzima

activadora de la ubiquitina (E1) cuya actividad depende de ATP. Este complejo E1-ubiquitina interactúa con un residuo de cisteína de una enzima conjugadora de la ubiquitina (E2) para formar el complejo E2-ubiquitina. Finalmente una ligasa de ubiquitina (E3) se une al sustrato (proteína blanco) e interactúa con el complejo E2-ubiquitina, ligando la ubiquitina a la proteína blanco. El reconocimiento del sustrato para ubiquitinación se da por la interacción de éste con E2 y E3, y da como resultado la formación de un enlace isopeptídico entre un residuo C-terminal de la ubiquitina y un residuo de lisina de la proteína blanco. Finalmente la proteína queda marcada para degradación o para cumplir otras funciones (Figura 3) (Schreiber & Peter, 2014; Rocha, 2013; Zamudio *et al.*, 2012). En las plantas se codifican únicamente una o dos enzimas E1, mientras que hay mucha mayor variedad de E2 (36 isoformas en *A. thaliana*). Esto se refleja en mayor especificidad en cuanto al reconocimiento de diferentes E3. Sin embargo, la diversidad de E3 en *A. thaliana* es muy amplia, ya que su genoma codifica para alrededor de 1,500 de estas enzimas. Esto sugiere que las plantas utilizan el proceso de ubiquitinación para regular un gran número de procesos a lo largo de su vida (más del 5% del genoma de *A. thaliana* codifica para proteínas del SUP), incluyendo la regulación de la degradación mediada por el proteasoma.

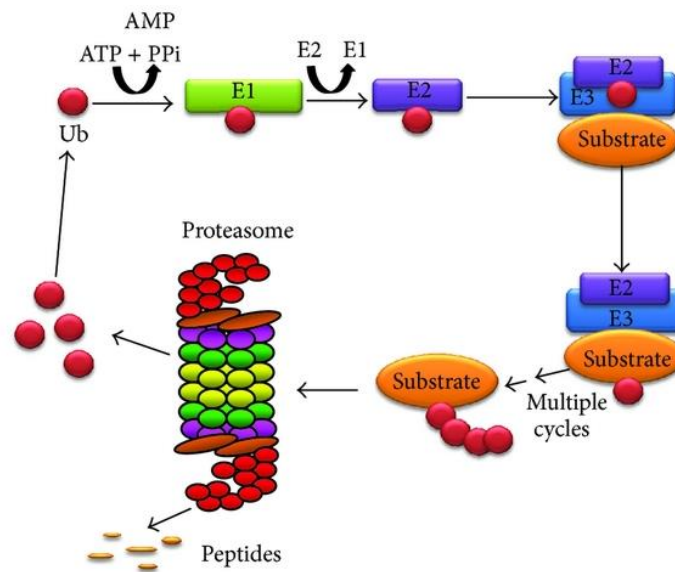


Figura 3. Diagrama esquemático del sistema ubiquitina-proteasoma. El SUP involucra al menos tres enzimas (E1, E2 y E3) que catalizan la adición de ubiquitina a residuos de lisina en la proteína sustrato. Los sustratos poliubiquitinados son reconocidos por el proteasoma o las proteínas asociadas a éste, la ubiquitina es

removida por desubiquitininasas y el sustrato es desplegado y translocado al 20S para su degradación (Tomada de Gomes, 2013).

Otros reguladores proteasomales

Aparte del regulador 19S se han descrito otros reguladores proteasomales que se pueden unir a uno o ambos extremos del 20S (p.e. las partículas 19S, PA28, PA200, PR500 o Blm 10, entre otras), ya sea que se una el mismo regulador a un 20S o un regulador diferente a cada extremo de un 20S, formando proteasomas homogéneos o híbridos respectivamente. En levadura, la versión dominante de proteasomas está constituida por híbridos Blm10- CP-19S y muestran actividad elevada de peptidasa, mientras que en mamíferos la versión PA28-CP-19S (también llamado inmunoproteasoma) juega un papel fundamental en la defensa inmune. A continuación se hará una breve descripción de los reguladores proteasomales descritos hasta la fecha.

PA200 y Blm10

Los reguladores homólogos PA200 (mamíferos) y Blm10 (levaduras) (Figura 4a) poseen unas asas de activación que se insertan en las subunidades α del 20S e inducen un rearrreglo estructural de la región de la puerta lo que permite la entrada del sustrato (López *et al.*, 2011; Iwanczyk *et al.*, 2006). Es decir que modulan la apertura de la puerta del 20S. Además, PA200/Blm10 cumple funciones en la espermatogénesis y la reparación del ADN (Pick & Berman, 2013). Iwanczyk *et al.*, (2006) purificaron a Blm10 y construyeron un modelo tridimensional a partir de criomicroscopía electrónica (Fig. 4b), donde se dieron cuenta que Blm10 se une a uno o ambos extremos del 20S. Cuando Blm10 no está unido a un extremo, la puerta conformada por los anillos α permanece cerrada, mientras que en el lado donde se une a 20S la puerta se abre, elucidando el papel de este regulador en la apertura de la puerta del proteasoma (Fig. 4c). Por su parte, PA200, aumenta la degradación de fragmentos de proteínas pequeñas, aunque no es capaz de degradar proteínas en su forma nativa (Jung & Grune, 2012). En 2010, Book *et al.* detectaron en *A. thaliana* una versión de proteasoma compuesta por 20S con un regulador PA200 adherido

a un extremo, y que puede estar involucrado en la degradación de proteínas independiente de ubiquitina. Este es uno de los muy pocos reportes de reguladores proteasomales detectados en plantas.

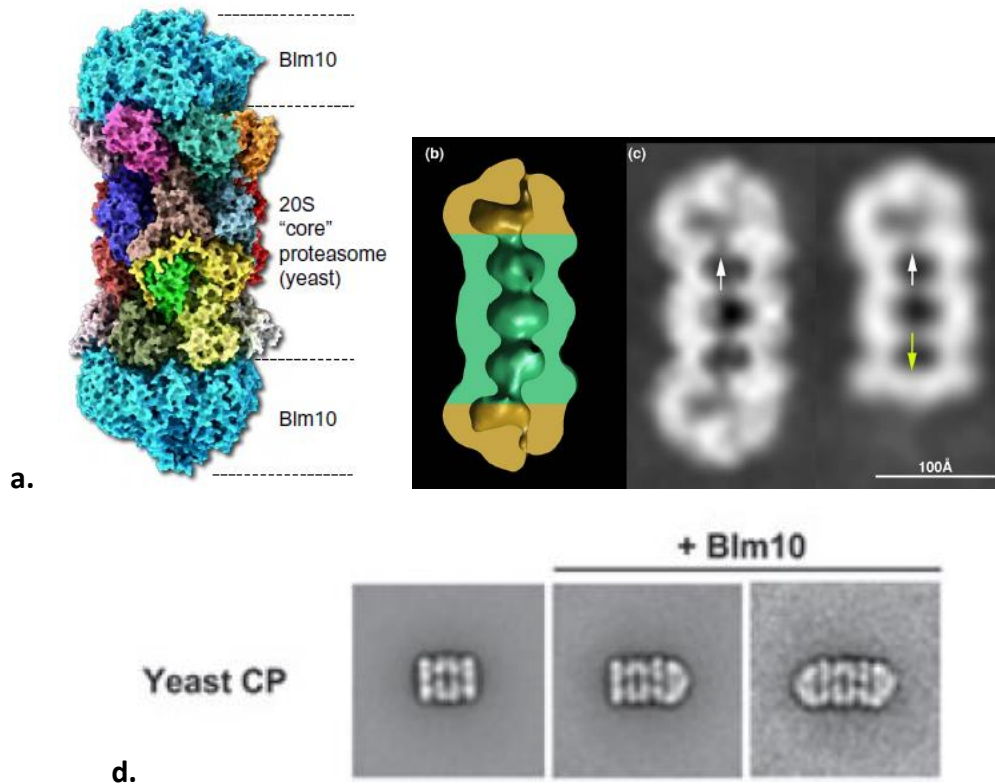


Figura 4. Regulador Blm10 de *S. cerevisiae*. **a)** Se observa una partícula central 20S con dos reguladores Blm10 (la estructura azul claro en forma de domo a ambos extremos del 20S) unidos (Tomada de Jung & Grune, 2012). **b)** Corte sagital de la superficie representando el proteasoma Blm10-20S-Blm10. Las tapas color café claro (Blm10) a ambos lados del 20S permiten la formación de una cavidad interna comunicada con el centro catalítico del proteasoma (Tomada de Iwanczyk *et al.*, 2006). **c)** Mapa de densidad del proteasoma Blm10-20S-Blm10 (panel izquierdo) y del proteasoma Blm10-20S (panel derecho). La densidad en el centro de los anillos alfa en contacto con Blm10 (flechas blancas) en ambos complejos es significativamente menor que en los anillos alfa libres (flecha amarilla) del complejo asimétrico (Tomada de Iwanczyk *et al.*, 2006). **d)** Imagen obtenida por microscopía electrónica del proteasoma 20S unido al regulador Blm10. En el recuadro de la izquierda se observa un proteasoma 20S independiente. En el recuadro del centro se observa el complejo 20S-Blm10, mientras que en el recuadro de la derecha se observa el complejo Blm10-20S-Blm10 (Tomada de Schmidt *et al.*, 2005).

11S o PA28

El regulador 11S en levaduras o PA28 en mamíferos (Figura 5), también conocido como REG, es un complejo multimérico, conformado por 3 subunidades, que se puede unir a

ambos extremos del 20S y estimular su capacidad para hidrolizar péptidos pequeños. REG α y β forman heteroheptámeros que se encuentran principalmente en el citoplasma y REG γ forma un homoheptámero localizado en el núcleo. REG $\alpha\beta$ activa los tres sitios activos del 20S uniéndose a los anillos α y promueve la apertura del canal hacia la cámara catalítica, mientras que REG γ solo activa la subunidad $\beta 2$ (tripsina). La degradación de sustratos por el complejo PA28-20S es independiente del ATP, por lo que se cree que los sustratos de este proteasoma son solo proteínas ya desnaturalizadas (Jung & Grune, 2012). REG $\alpha\beta$ juega un papel importante en la presentación de antígenos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase 1 (MHC-I) (Pick & Berman, 2013; Rechsteiner, 2013; Cascio *et al.*, 2002).

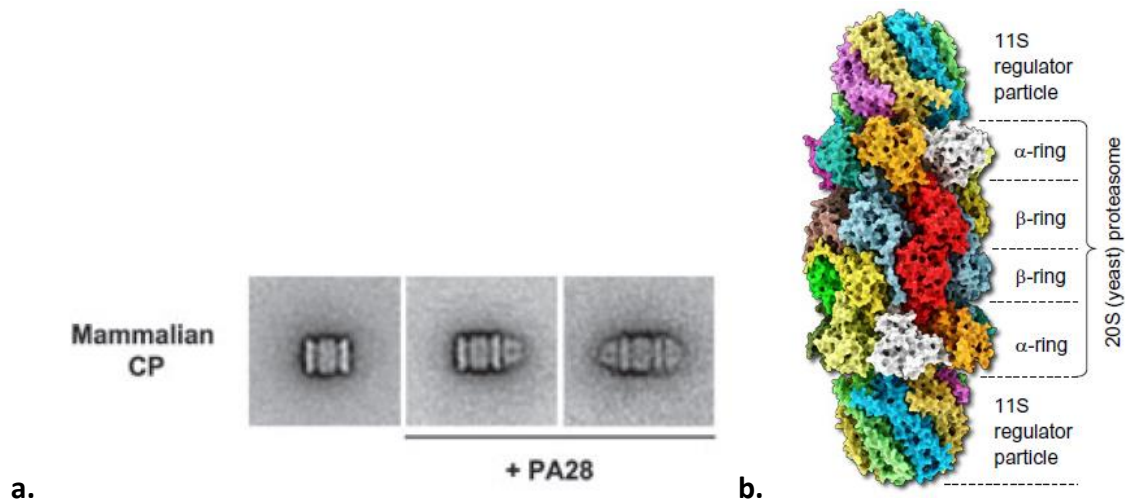


Figura 5. Regulador 11S de levaduras o PA28 de mamíferos. a) Imagen obtenida por microscopía electrónica del proteasoma 20S unido al regulador PA28. En el recuadro de la izquierda se observa un proteasoma 20S independiente. En el recuadro del centro se observa el complejo 20S-PA28, mientras que en el recuadro de la derecha se observa el complejo PA28-20S-PA28 (Tomada de Schmidt *et al.*, 2005). **b)** Se observa una partícula central 20S con dos reguladores 11S unidos a sus extremos (Tomada de Jung & Grune, 2012).

Inmunoproteasoma

Una versión especial del proteasoma 20S inducida por interferón - γ (IFN- γ) es el llamado inmunoproteasoma (i20S). Esta versión de proteasoma está compuesta por un regulador 19S, el 20S y un regulador 11S (se conoce como un proteasoma híbrido), o por el 20S y un regulador 11S unido a cada extremo del primero (Figura 6b). En vez de las subunidades catalíticas normales ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$), el inmunoproteasoma tiene las subunidades inducibles

$\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$ (Fig. 6a) (Pick & Berman, 2013; Rechsteiner, 2013; Cascio *et al.*, 2002). A diferencia de un 20S independiente o de un 26S, el inmunoproteasoma produce péptidos cortos (8-10 aminoácidos) y específicos para ser presentados por el MHC-I en la superficie celular durante la respuesta inmune (Jung & Grune, 2012).

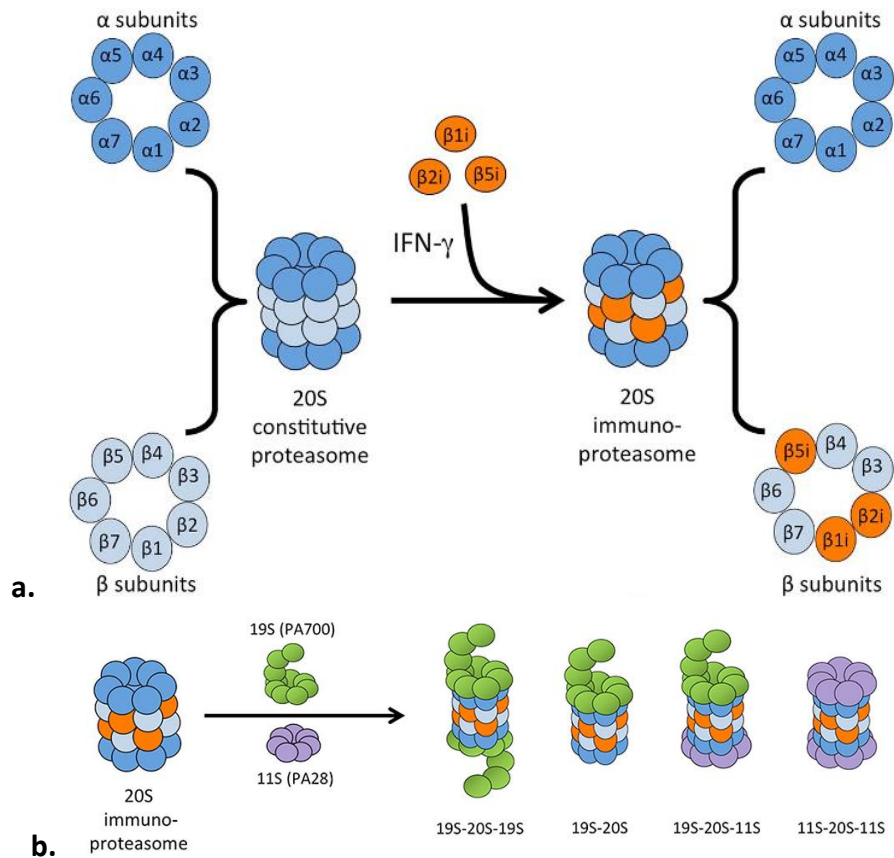


Figura 6. Esquema del inmunoproteasoma. a) el centro catalítico del proteasoma 20S está compuesto por dos anillos α externos y dos anillos β internos. La exposición al IFN- γ induce la síntesis de tres “inmunosubunidades” β ($\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$) que son incorporadas en el nuevo proteasoma formado, reemplazando las subunidades constitutivas y conformando el inmunoproteasoma. **b)** el regulador inducido por IFN- γ , 11S (PA28), se puede unir en el lado libre de un complejo 19S-20S para formar un proteasoma híbrido, o se puede unir a ambos extremos de un 20S modificado para formar el inmunoproteasoma (Tomadas de McCarthy & Weinberg, 2015).

Ecm29

Otro regulador asociado al proteasoma que ha sido reportado es Ecm29 (Figura 7). En levaduras Ecm29 actúa para estabilizar el proteasoma 26S aunque no se sabe si ayuda a activar la degradación de proteínas. El homólogo en humanos está asociado con membranas secretoras y endocíticas. Ecm29 reconoce los complejos 19S - 20S donde la

maduración del 20S está atrofiada por la ausencia de algunas subunidades β . En este caso Ecm29 actúa como proteína de andamiaje para mantener estable la asociación mientras se completa la maduración del 20S, tras lo cual Ecm29 se degrada y 19S – 20S se disocia (Rechsteiner, 2013; Lehmann *et al.*, 2010; Leggett *et al.*, 2002). Algo similar reportan Wang *et al.*, (2010), quienes encontraron que Ecm29 aumenta su asociación al 19S durante un evento de estrés oxidativo en levaduras. La mutación de Ecm29 en algunas células no permitió el desensamblaje del proteasoma 26S y estas células fueron más sensibles al estrés oxidativo que las silvestres, sugiriendo que la separación de 19S y 20S es importante para la respuesta celular a este tipo de estrés.

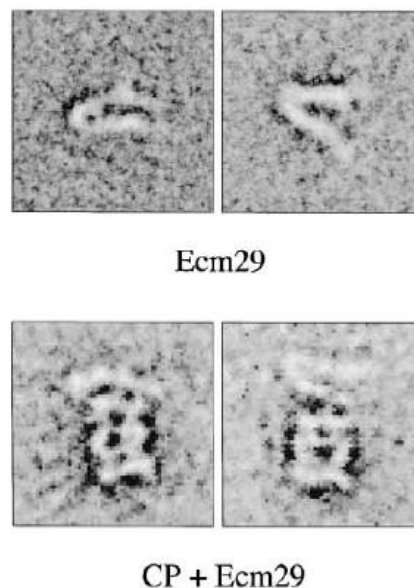


Figura 7. Regulador Ecm29. Micrografías electrónicas del regulador Ecm29 independiente y del complejo Ecm29-20S (Tomada de Leggett *et al.*, 2002).

PR500

PR500 es un complejo proteico de 500kDa detectado recientemente en plántulas de *A. thaliana* y en ramilletes de coliflor. Comparte al menos tres subunidades con la tapa del 19S. En plantas no estresadas PR500 se encuentra como un complejo aislado, mientras que en respuesta a un aumento de la temperatura se disgrega en sus diferentes componentes. Aun no se conoce bien su función pero algunas aproximaciones sugieren

que PR500 funciona como un reservorio de subunidades del 19S que se usan para acelerar la síntesis del 26S requerido para contrarrestar los efectos de la desnaturalización de proteínas por estrés. Aparte de ser un reservorio para la formación del regulador 19S, también se cree que PR500 recluta subunidades del 19S durante estrés por sequía y libera estas subunidades cuando aumentan las proteínas desnaturalizadas por otros tipos de estrés (Kurepa, 2009; Peng *et al.*, 2001).

Como podemos ver, hasta ahora son varios los reguladores proteasomales identificados en mamíferos y levaduras los cuales han sido bien caracterizados y se conoce mucho de su función. Sin embargo, en plantas apenas se han identificado dos reguladores proteasomales recientemente y su función aún no es muy conocida. El universo de los reguladores proteasomales es prácticamente un misterio en plantas, poco se conoce sobre este tema, menos aún en plantas sometidas a algún tipo de estrés.

Proteínas Asociadas al Proteasoma (PAPs)

Se han publicado evidencias experimentales que muestran que el proteasoma 26S se desensambla durante la degradación de un sustrato, todo ello coordinado con la hidrólisis de ATP (Babbitt, 2005). En el modelo de “masticar y escupir”, la hidrólisis controlada de ATP acoplada a la degradación de la proteína, genera una fuerza mecánica que causa un cambio conformacional en las ATPasas de la subunidad 19S. Este cambio, no sólo causa la disociación de la subunidad 19S del proteasoma 26S, sino que a su vez la subunidad 19S se disgrega en subcomplejos. Eventualmente los componentes de la subunidad 19S se reasocian y conforman nuevamente al proteasoma 26S restaurando la maquinaria para una nueva ronda de degradación. Es posible que durante la etapa de restauración, nuevos elementos o distintas proporciones de los elementos reguladores preexistentes, puedan integrarse y dar como resultado una nueva versión del proteasoma con diferente estabilidad, especificidad o actividad. Además de los reguladores/activadores arriba descritos, hay cada vez más evidencia de proteínas adicionales que interaccionan con el proteasoma e influyen su función. Se han descrito más de 300 proteínas con el nombre genérico de Proteínas Asociadas al Proteasoma (PAPs), entre las que se encuentran

factores transcripcionales, chaperonas, factores de elongación, receptores de cadenas de ubiquitina, enzimas deubiquitinantes, enzimas que conjugan ubiquitina (E2's) y ligasas de ubiquitina (E3's) entre otras (Weissman, 2001). Estas PAPs se pueden categorizar en dos grupos. El primer grupo comprende proteínas que están asociadas al sistema de ubiquitinación, tales como las enzimas desubiquitinadoras (DUB) USP14 y UCH37 y los receptores extrínsecos de ubiquitina UBL-UBA. También se incluyen muchas ligasas E3 como Hul5/KIAA10, E6AP, Parkin, Ubr1, Ufd4 y SCF (Saeki & Tanaka, 2012). También hay un grupo de receptores-lanzadera de ubiquitina ubicados en la base del 19S (asociados a Rpn1 y unidos a la DUB Ubp6) que reconocen los sustratos ubiquitinados y los lanzan hacia la cavidad del 20S. Estos receptores son Rad23, Ddi1 y Dsk2 (Lander et al, 2012). El segundo grupo incluye factores proteicos auxiliares que regulan la función proteasomal uniéndose directamente al proteasoma (Saeki & Tanaka, 2012). Un ejemplo de esos factores proteicos es Ecm29, del cual ya hablamos anteriormente.

Las PAPs se asocian al proteasoma en respuesta a cambios ambientales y afectan su función, regulación, ensamblaje, estabilidad y modulación del proceso de degradación proteica (Kaake et al., 2010; Babbitt, 2005). Sabiendo que hay un gran número de PAPs hasta ahora identificadas, y que seguramente aún hay muchas por descubrir, esto sugiere que el proteasoma 26S es mucho más diverso y complejo en composición de lo que se cree. El estudio de estas PAPs puede ayudar a elucidar aún más la dinámica de este complejo proteolítico (cómo se ensamblan y estructuran las poblaciones proteasomales a lo largo de un tiempo).

Aunque el papel de solo algunas de las PAPs ha sido descrito desde el punto de vista de su mecanismo, si consideramos su multiplicidad y sus propiedades tan divergentes, las PAPs conforman un grupo que sin duda resulta interesante estudiar en el contexto de la degradación de proteínas mediada por el proteasoma. Hasta ahora, este grupo relativamente nuevo de proteínas han sido aisladas y caracterizadas en *Saccharomyces cerevisiae*, tejidos de mamíferos o bien de cultivos de líneas celulares humanas mantenidas en condiciones estables de crecimiento. Son prácticamente nulos los reportes de las modificaciones que experimenta el proteasoma o de las diferentes proteínas que se

asocian a él en un modelo vegetal como *Arabidopsis thaliana*. Más interesante aún, resultará el estudio estructural y funcional de las diferentes versiones del proteasoma determinadas por las diversas proteínas que se asocien en las etapas del desarrollo, durante la limitación de nutrientes o bien en otras formas de tensión metabólica como la etapa estacionaria, el estrés calórico, el estrés osmótico y el estrés oxidativo entre otras. Todas estas condiciones inducen la alteración (estructural y/o química) de varias proteínas que se ve traducido en un incremento agudo en el contenido total de proteínas ubiquitinadas y en la activación del proteasoma (Finley & Chau, 1991; Jentsch, 1992).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un fenómeno químico y fisiológico que acompaña casi todos los tipos de estrés biótico y abiótico en plantas superiores (Demidchik, 2015). Se define como una perturbación en el estado redox normal de los tejidos causada por un agente biótico o abiótico; es decir cuando hay un desbalance entre la producción de especies reactivas y la defensa antioxidante. Este tipo de estrés produce especies reactivas de oxígeno, peróxidos y radicales libres que pueden destruir todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y el mismo ADN (Chang *et al.*, 2013; Yoshinaga *et al.*, 2005; Halliwell & Whiteman, 2004). La acción del estrés oxidativo es detenida por una producción efectiva de defensas antioxidantes que incluye compuestos antioxidantes (p.e. glutatión, vitaminas A, C y E, y flavonoides) y enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, entre otras). Algunos antioxidantes naturales y compuestos fenólicos como el ácido gálico, el ácido elálgico o el ácido tánico son responsables de la respuesta antioxidante y la remoción de los radicales libres (Chang *et al.*, 2013; Aiken *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo puede dañar las proteínas de diversas maneras. Una de ellas es causando la oxidación irreversible de los aminoácidos y la formación de derivados carbonilados e hidroxilados (Kurepa *et al.*, 2008). También puede causar mal plegamiento de las proteínas, exponiendo sus aminoácidos hidrofóbicos (normalmente dirigidos hacia el interior en la estructura en las proteínas nativas). Esta exposición de los parches hidrofóbicos “marca” a las proteínas oxidadas para su degradación por el proteasoma

(Davies, 2001). Existen versiones encontradas acerca de la degradación de proteínas oxidadas por el proteasoma. Por un lado, se sabe que las proteínas oxidadas no necesitan una cola de poli-ubiquitina ni ATP para su degradación por el proteasoma. En este escenario el reconocimiento de las proteínas oxidadas se lleva a cabo por el proteasoma 20S libre (Kriegenburg *et al.*, 2011; Shringarpure *et al.*, 2003; Ferrington *et al.*, 2001; Grune *et al.*, 1997), ya que el dominio de unión hidrofóbico en las subunidades α exteriores del 20S reconoce e interacciona con los parches hidrofóbicos expuestos de las proteínas mal plegadas (Jung *et al.*, 2014; Kurepa & Smalle, 2008; Davies, 2001).

Cuando las células son sometidas a una condición que produzca un estado de estrés oxidativo, la actividad del proteasoma 26S se reduce y éste promueve la disociación de los complejos reguladores. En este caso, la subunidad 20S por sí sola es capaz de degradar las proteínas oxidadas por una vía independiente de ATP y de ubiquitinación (Davies, 2001; Kurepa *et al.*, 2009). El estrés oxidativo severo inhibe la actividad del 20S. Esto hace al proteasoma 20S un elemento de estudio muy interesante e intrigante, ya que se puede estudiar bajo otras condiciones de estrés y evaluar su actividad y su conformación.

El proteasoma 20S degrada proteínas y péptidos sin la necesidad de aporte energético, y se ha propuesto a esta partícula como la más importante en la degradación de proteínas oxidadas (Davies, 2001). Aparentemente solo proteínas desplegadas, proteínas pequeñas o péptidos que atraviesen sin restricción la “puerta” proteasomal serían degradados. Se asume que estas proteínas deberán ser removidas por el proteasoma para evitar daños permanentes en el sistema celular si las condiciones ambientales lo permiten, o bien adaptarse al nuevo ambiente. Si el proteasoma no remueve las proteínas alteradas, la viabilidad celular se compromete.

Aumento de temperatura

La respuesta celular al choque térmico es uno de los mecanismos de defensa intracelular mejor estudiado en respuesta a condiciones de estrés. La exposición de las células a diferentes tipos de estrés como aumento de temperatura, restricción calórica, metales

pesados, oxidativo, osmótico, entre otros, induce la respuesta celular a estrés que conduce a la expresión preferencial de proteínas de choque térmico (HSP del inglés Heat Shock Proteins) (Verbeke *et al.*, 2001). Una respuesta ineficiente y alterada al aumento de temperatura está implicada en el crecimiento y desarrollo anormal, el envejecimiento y la apoptosis celular. El aumento de temperatura genera desnaturalización y mal plegamiento de proteínas, las cuales se pueden agregar e iniciar diferentes cascadas de señalización en respuesta al estrés. Una de estas cascadas de señalización en respuesta al aumento de temperatura es a través de los factores de transcripción de choque térmico (HSF del inglés Heat Shock transcription Factors) (Verbeke *et al.*, 2001).

Como parte de esa respuesta de choque térmico, las células expresan proteínas chaperonas, ubiquitina y algunas enzimas ubiquitinadoras que colaboran para prevenir la formación de agregados de proteínas mal plegadas. Algunas HSPs cumplen función de chaperonas y están involucradas en la renaturalización de proteínas mal plegadas. Estas chaperonas reconocen y se unen a proteínas en su conformación no nativa que están exponiendo sus parches hidrofóbicos. Al hacerlo, tratan de prevenir la agregación de estas proteínas mal plegadas durante el evento de estrés (Medicherla & Goldberg, 2008; Verbeke *et al.*, 2001). La partícula reguladora de proteasoma, PA28, tiene actividad de chaperona y se cree que se une y captura a las proteínas mal plegadas para dirigir las al replegamiento o a la degradación por el proteasoma (Connell *et al.*, 2001; Luders *et al.*, 2000). Mediante este mecanismo las chaperonas ayudan a disminuir la formación de agregados proteicos (Verbeke *et al.*, 2001; Arrigo, 1998). Este impedimento para que se formen agregados proteicos es una ventaja para la célula y para el sistema SUP ya que éste no se bloquea y puede continuar su actividad de degradación.

En levaduras ha sido bien estudiado el papel del SUP en la tolerancia al aumento de temperatura. Se ha visto que la resistencia a altas temperaturas requiere la síntesis de monómeros de ubiquitina así como de otros componentes del sistema de conjugación de ubiquitina para potenciar la actividad del proteasoma. El SUP funciona durante estrés por temperatura y degrada proteínas celulares dañadas. En plantas, el estrés por temperatura resulta en una disminución en la cantidad de monómeros de ubiquitina y en la

acumulación de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular (Belknap & Garbarino, 1996).

Generalidades y antecedentes en nuestro laboratorio

A diferencia de otros modelos eucariotas, donde los proteasomas han sido estudiados al detalle y se conoce mucho sobre su estructura y modificaciones, en plantas los estudios sobre este complejo son escasos. Un reporte a la fecha (Book *et al.*, 2010) da cuenta de la transcripción diferencial de los genes responsables de las subunidades de la partícula central 20S en órganos de *A. thaliana* tales como la raíz, las hojas de la roseta y caulinares, el tallo y la flor, lo que posiblemente se traduzca en proteasomas distintos y posiblemente especializados en la degradación de sustratos presentes solo en dichos órganos. No hay reportes de las poblaciones proteasomales asociadas a las diferentes etapas de la diferenciación celular.

En nuestro laboratorio se han obtenido resultados preliminares con otro tipo celular de *A. thaliana* (T87), a partir de células en cultivo mantenidas en condiciones estables de crecimiento, donde se observaron al menos 10 diferentes poblaciones de proteasomas, con base a las diferencias de sus pesos moleculares. Esto se logró gracias a la aplicación y combinación de técnicas de ultracentrifugación diferencial, electroforesis en geles nativos azules (BN/PAGE), electroforesis bidimensional, western blot, espectrometría de masas y microscopía electrónica. El análisis de cada uno de los complejos por geles bidimensionales (tipo O'Farrell) reveló, como era de esperar, un "mapa de puntos", en general muy semejante, entre las diferentes bandas originales con claras diferencias entre la abundancia relativa de algunos elementos. Estos últimos posiblemente sean las subunidades "clásicas" 20S. En algunos casos se observaron "puntos" sin contrapartes en el o los "mapas" correspondientes a otras bandas. Estos puntos, pueden corresponder a PAPs, proteínas que interaccionan de manera específica con algunos de los proteasomas. Resulta interesante observar en los geles BN, donde se resolvieron muestras provenientes de células tratadas con paraquat (un agente productor intracelular del radical superóxido)

o bien de células que se expusieron a alta temperatura, la aparición de bandas de alto peso molecular, no detectadas en los geles correspondientes a las células control (crecimiento estable). Como resultó para este último caso, el mapa de estas nuevas bandas, mostró un patrón general semejante al ya observado pero con claras variaciones en cuanto a la abundancia de ciertas subunidades, así como la presencia de PAPs adicionales. Mediante espectrometría de masas y western blot, se ha detectado la identidad de algunas de estas proteínas asociadas, entre ellas el factor de elongación traduccional eEF-1A y algunas formas de la tubulina, proteínas que ya han sido reportadas en asociación con los proteasomas de levaduras y de plántulas de *A. thaliana* (Saeki & Tanaka, 2012; Kaake *et al.*, 2010; Leggett *et al.*, 2002). El análisis por espectrometría de masas también reveló a las proteínas RGP1, RGP2 así como a la chaperonina HSP60 como proteínas de unión. Estas últimas no habían sido reportadas anteriormente como PAPs. Uno de los objetivos de este proyecto fue originalmente describir (estructural y funcionalmente) las diferentes PAPs y su papel en una condición específica de crecimiento. Muchas de las PAPs, hasta ahora descritas, pertenecen a grupos de función ciertamente divergentes, la función conocida de algunas de ellas, en el marco de la degradación de las proteínas mediada por el sistema de la ubiquitina-proteasoma, está aún muy lejos de ser entendida. Una posibilidad es que el o los diferentes elementos que interactúan con una PAP específica, además del proteasoma por supuesto, no han sido aún descritos. La diversidad en las conformaciones del proteasoma y de su composición es un campo de investigación que apenas comienza. El estudio de los proteasomas y sus PAPs, sin duda abrirá nuevas perspectivas sobre la dinámica del proteasoma.

Hipótesis

Las condiciones de cultivo de las células de *A. thaliana* condicionan la formación de las diferentes versiones del proteasoma con estructura y función definida para degradar o bien evitar la degradación de ciertos sustratos blanco.

Objetivo General

Caracterizar bioquímica y estructuralmente las diferentes versiones del proteasoma de células en cultivo de *A. thaliana* así como las PAPs que se observen en respuesta al estrés oxidativo y al estrés por aumento de temperatura.

Objetivos Particulares

- i) Separar e identificar mediante BN-PAGE y columnas de exclusión molecular las diferentes versiones del proteasoma presentes en células en cultivo de *A. thaliana* mantenidas en condiciones estables de crecimiento y bajo condiciones de estrés como la elevación de la temperatura del cultivo y la adición de paraquat (estrés oxidativo).
- ii) Analizar la dinámica ((cómo se ensamblan y estructuran las poblaciones proteasomales a lo largo de un tiempo) general de las diferentes poblaciones proteasomales en las distintas condiciones de estrés propuestas.
- iii) Analizar mediante SDS-PAGE las proteínas que forman parte de cada uno de los complejos.

Metodología

Cultivo de células

Se trabajó con una línea celular de *Arabidopsis thaliana* que nos obsequió el Dr. Plinio Guzmán Villate, investigador del laboratorio de regulación post-transcripcional en el Cinvestav – Irapuato, quien a su vez la obtuvo de la Universidad de Cornell. A partir de un

inóculo de células en etapa exponencial, tomamos 5 ml de éste y adicionamos 45 ml de medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con cinetina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4D) fresco. Los 50 ml del cultivo celular fueron mantenidos en matraces de 250 ml e incubados por una semana a 25°C con agitación a 100 rpm con periodo día/noche. Pasado este tiempo, las células se recuperaron por filtración sobre papel filtro Whatman y un embudo, eliminando el medio en un erlenmeyer. Hasta su análisis, las muestras fueron mantenidas a -70°C.

Extracción y purificación de los proteasomas

Para la extracción y purificación de proteasomas se utilizó el protocolo reportado por Shibatani *et al.*, 2006, con algunas modificaciones. A 15 ml de células (de las muestras mantenidas a -70°C), en tubos Falcon de 50 ml, le fueron agregados 25 ml de buffer de purificación, compuesto de 25 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro (Tris-HCl) pH 7.5, 1 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 2 mM adenosín trifostato (ATP), 0.25 M sacarosa, 1 mM cloruro de magnesio (MgCl₂), 1% polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 200 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y el equivalente a 10 ml de perlas de vidrio. Las células fueron agitadas en vórtex durante cinco minutos, dejadas en reposo en hielo y nuevamente agitadas otros cinco minutos para terminar de romperlas. El homogenizado fue centrifugado 15 min a 16,000 x g y el sobrenadante recuperado fue ultracentrifugado durante 1:10 h a 4°C y a 70,000 x g (en rotor tipo 55.2 Ti de Beckman Coulter). El sobrenadante recuperado fue centrifugado durante 5 min a 10,000 x g para remover impurezas, organelos, desechos celulares, células no lisadas y restos de PVPP que se desprendieran del precipitado. Se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó nuevamente, esta vez durante 3:30 h a 350,000 x g. Se descartó el sobrenadante y el pellet, que contiene los proteasomas enriquecidos, fue resuspendido en 1 ml de buffer POOLS (HEPES pH 7.8, 5 M NaCl, 2.5 M MgCl₂, 40 mM DTT, glicerol 7.5% y 1.6 µM ATP) (modificado de Shibatani *et al.*, 2006). Con la ayuda de un émbolo, el material no solubilizado se eliminó al centrifugar por 3 min a 16,000 x g el sobrenadante final fue almacenado en alícuotas de 200 µL a -80°C. Esta última es la fracción enriquecida en

proteasomas. En cada etapa del protocolo se tomó una muestra para comprobar el rendimiento de la extracción y purificación.

Tratamiento con Paraquat

Las células en cultivo de *A. thaliana* fueron tratadas con diferentes concentraciones de Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride – Sigma Aldrich). A 50 ml de los cultivos celulares (5 ml de un inóculo de células en etapa exponencial y 45 ml de medio MS) mantenidos en matraces de 250 ml e incubados por una semana a 25°C con agitación a 100 rpm, se les agregó paraquat en solución para obtener concentraciones finales de 5 µM, 50 µM y 500 µM. Los tiempos de exposición a las distintas concentraciones de paraquat fueron de 30 minutos, 1 y 2 horas. En total se obtuvieron nueve muestras de cultivos celulares tratados con paraquat y dos muestras control (obtenidas al inicio y al final del tratamiento). Las células de cada cultivo se recuperaron por filtración sobre papel filtro Whatman y un embudo. Hasta su análisis las muestras fueron mantenidas a -70°C. El protocolo de extracción y enriquecimiento proteasomal fue el previamente mencionado.

Tratamiento por aumento de temperatura

Para este tratamiento, los 50 ml de los cultivos celulares (5 ml de un inóculo de células en etapa exponencial y 45 ml de medio MS) mantenidos en matraces de 250 ml e incubados por una semana a 25°C con agitación a 100 rpm fueron sometidos a un aumento de temperatura con respecto a la usada comúnmente (25°C). Para este ensayo las células se incubaron a 37°C. Los tiempos de incubación fueron de 30 min, 1, 2 y 3 horas, tras los cuales las células fueron recuperadas por filtración sobre papel filtro Whatman y un embudo y se les aplicó el protocolo de extracción y purificación previamente mencionado. En total se obtuvieron cuatro muestras de células sometidas a estrés por temperatura y dos muestras control (inicial a las 0 h y final a las 3 h, ambos a 25°C).

Separación mediante BN-PAGE de las diferentes versiones del proteasoma

La separación de los proteasomas por medio de electroforesis en geles nativos azules (BN-PAGE) se basa en el protocolo descrito por Wittig *et al.*, (2006). Los BN-PAGE tienen la ventaja, frente a otros tipos de electroforesis en geles, que separan las proteínas en su estado nativo de acuerdo a su peso molecular y forma. Para que las proteínas migren en el gel, en la preparación de éste último se utiliza Coomassie G250, que se adhiere a las proteínas y les otorga carga negativa sin desnaturalizarlas; esto hace que puedan migrar. Brevemente, las muestras de proteasomas resuspendidas en buffer Pools se cargaron directamente en los pozos de los geles nativos. Los BN-PAGE se prepararon con un gradiente de acrilamida de 5-10%. El protocolo de corrida constó de tres pasos: 50 V durante 1 h, seguido de 150 V durante 16 h y finalmente 500 V durante 1 h. Se utilizan dos tipos de buffer; el superior se compone de 50 mM Tricina, 15 mM Bis-Tris pH 7 y 0.02% Coomassie G250, mientras que el inferior se compone de Bis-Tris pH 7. Este protocolo de geles nativos azules se aplicó para el análisis de todas las muestras.

Western blot

Al finalizar la corrida en BN-PAGE, los complejos se desnaturalizan en el mismo gel sumergiéndolo en una mezcla de agua caliente, dodecil sulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol (β -met). Los geles así tratados, se transfirieron en cámara húmeda (Biorad) (una hora a 0.36 A de corriente) a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Biorad). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó durante 5 min en tris-buffer salino con monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (TBS-tween). Se bloqueó la membrana durante 30 min en 20 ml de leche descremada (Svelty) 5% - TBS-tween. Después de un lavado de la membrana 5 min con TBS-tween, se incubó con un anticuerpo primario α -20S de ratón (anti ratón α 1+2+3+4+5+6. Cat ab22674 de Abcam a una dilución 1:5000) durante toda la noche a 4°C. Éste es un anticuerpo policlonal dirigido contra todas las subunidades α del cilindro central 20S. Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBS-tween, la membrana se incubó 30 min con un anticuerpo secundario α -ratón (HRP-Goat anti-mouse IgG (H+L) Cat. 62-6520 de Zymed) a una dilución 1:5000.

Después de lavar la membrana tres veces durante 20 min cada lavado, con TBS-tween, se reveló en un cuarto oscuro mediante el empleo del sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce) y la película radiográfica Kodak Medical X-ray film general purpose blue MXB.

Electroelución de las proteínas de las muestras de los tratamientos con paraquat y aumento de temperatura

Adicionalmente al western blot, los BN-PAGE se fraccionaron en ocho rebanadas horizontales de aproximadamente 0.7 cm cada una para recuperar, para su análisis posterior, las diferentes versiones del proteasoma con base a sus diferencias de peso molecular nativo. Cada rebanada se fraccionó en pedazos de 0.2 – 0.5 mm. El material resultante se colocó en las celdillas de electroelución de la cámara Little Blue Tank (ISCO) que contenían buffer de corrida de Laemmli (24mM Tris, 191mM Glicina y 3.4mM SDS) diluido 1:10. La cámara de electroelución, que consta de un rectángulo dividido a la mitad por un puente, cada lado contuvo 70 mL de buffer de corrida de Laemmli (sin diluir). La electroelución de los proteasomas de cada banda se realizó por 3 h a 3 W a 10°C. Una vez finalizada la corrida se invirtieron las cargas durante 1 min a 3 W para separar las proteínas electroeluidas que hayan quedado adheridas a las membranas de diálisis localizadas en la base de las celdillas de electroelución. Las proteínas electroeluidas fueron recuperadas (en un volumen aproximado de 200 µL) y se precipitaron con metanol y cloroformo. Las proteínas se resuspendieron en buffer de muestra de Laemmli y se analizaron de manera independiente mediante SDS.PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la detección del 20S por western blot, como ya se ha mencionado.

Ensayos de carbonilación y ubiquitinación de las muestras tratadas con paraquat y las sometidas a aumento de temperatura

Los niveles de proteínas carboniladas y de conjugados de ubiquitina se reconocen ampliamente como marcadores de estrés (Wong *et al.*, 2010; Irazusta *et al.*, 2008; Nystrom, 2005). Para determinar dichos niveles en las células sometidas al paraquat o al aumento de temperatura, se tomó un volumen de 200 μ L del extracto total de células recién lisadas (a partir de las purificaciones previamente mencionadas) de cada uno de los cultivos de los experimentos con paraquat, los sometidos a alta temperatura y los controles correspondientes. Se precipitaron las proteínas con metanol/cloroformo, se resuspendieron en buffer Laemmli y se cuantificaron por el método de Bradford. Para determinar los niveles de oxidación de las proteínas por su carbonilación, empleamos el kit OxyBlot (Cat. S7150). Merck-Millipore). Para ello, 5 μ g de proteína en 10 μ L se derivatizaron con 10 μ L de la solución 2,4 dinitrofenilhidrazina que reacciona con los carbonilos y forma 2,4.dinitrofenilhidrazona. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo con 7.5 μ L de la solución de neutralización y cada muestra se llevó a 50 μ L con el buffer de los western blot (tris-glicina y SDS). Para determinar el nivel de carbonilos totales, cada muestra se colocó en un pozo de la cámara para slot blot (Hoefer PR 648 de Amersham Biosciences). Las muestras se filtraron al vacío sobre membranas de nitrocelulosa, cada muestra se analizó por triplicado. La membrana resultante se bloqueó con leche descremada como ya se ha indicado y se incubó con el anticuerpo primario de conejo, un anti dinitrofenilhidrazona (a una dilución 1:150). Como anticuerpo secundario empleamos un anticonejo (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Cat. 65-6120 de Zymed) a una dilución 1:5000. Para el revelado se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce) y la película radiográfica Kodak Medical X-ray film general purpose blue MXB.

El ensayo de ubiquitinación consistió prácticamente en el mismo procedimiento que el de carbonilación. La única diferencia es que las muestras no se derivatizaron y previo al western blot la membrana se fijó durante una hora con solución fijadora (25% isopropanol y 10% ácido acético). Para el western blot se utilizamos como anticuerpo primario un α -ubiquitina (Ub (F-11) Mouse monoclonal IgG. Cat. Sc271289 de Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:10000 y como anticuerpo secundario empleamos un anticonejo (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Cat. 65-6120 de Zymed) a una dilución 1:5000. Para el revelado

se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce) y la película radiográfica Kodak Medical X-ray film general purpose blue MXB.

Ensayo de viabilidad

Para este ensayo se utilizaron cinco cultivos de células, dos controles (inicial y final) y tres a los que se les agregó paraquat (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M durante dos horas). De cada cultivo se tomó 1 ml de células con medio, se centrifugó 5 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet (las células) se resuspendió en 100 μ L de medio de cultivo. Se tomaron 15 μ L de células y se adicionaron 15 μ L de azul de tripán sin diluir y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Para el conteo de células vivas se utilizó una cámara de Neubauer. Finalmente se hizo el conteo de células vivas (citoplasma transparente) y muertas (citoplasma teñido) para calcular el porcentaje de viabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de proteasomas

Brevemente, células en cultivo de *A. thaliana* fueron recuperadas por filtración y lisadas con buffer de purificación para obtener un homogenizado total (ver Metodología). Este homogenizado fue sometido a una primera centrifugación durante 15 min a 16,000 x g, tras la cual se tomó una muestra del sobrenadante (Sn1) y del pellet (P1). Posteriormente el sobrenadante (Sn1) fue sometido a una primera ultracentrifugación durante 1:10 h a 4°C y a 70,000 x g, nuevamente se tomó una muestra del sobrenadante (Sn2) y el pellet (P2). A su vez el sobrenadante Sn2 se ultracentrifugó nuevamente, esta vez durante 3:30 h a 350,000 x g y se tomó muestra del sobrenadante (Sn3) y el pellet (P3) obtenidos. El pellet final (P3) fue resuspendido en buffer POOLS y con la ayuda de un émbolo, el material no solubilizado se eliminó al centrifugar por 3 min a 16,000 x g. Se recuperó el

sobrenadante final y se denominó Sn4. Este Sn4 fue la fracción final de proteasomas enriquecidos usados para todos los experimentos (Figura 8a).

Las muestras Sn1, P1, Sn2, P2, Sn3, P3 y Sn4 fueron analizadas en un SDS-PAGE al 12,5% para ver la eficiencia del protocolo de enriquecimiento de los proteasomas. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un western blot con un anticuerpo primario anti-20S. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8b, donde se observa el aumento de los proteasomas a medida que se avanza en el proceso de enriquecimiento. Se puede ver como en las muestras Sn1 a Sn3 la abundancia de proteasomas es baja y aumenta levemente en el P2. El P1 contiene muy poco proteasoma ya que éste es el pellet de la primera centrifugación, y lo que ahí se encuentra son organelos, desechos celulares y células no lisadas entre otros. La muestra Sn3 no contiene proteasomas, sugiriendo que éstos están todos en P3 y Sn4. Efectivamente esto se evidencia en las bandas correspondientes a P3 y Sn4, donde se observa un enriquecimiento significativo de la fracción de proteasomas reflejado en la intensidad y grosor de las bandas obtenidas en el western blot. Esta última fracción (Sn4), la cual fue resuspendida en buffer POOLS, es la más enriquecida y por lo tanto la que se analizó posteriormente por medio de los BN-PAGE y western blot, ya que es la fracción más enriquecida en subunidades alpha obtenida después de someter el P3 a centrifugación para eliminar sedimentos.

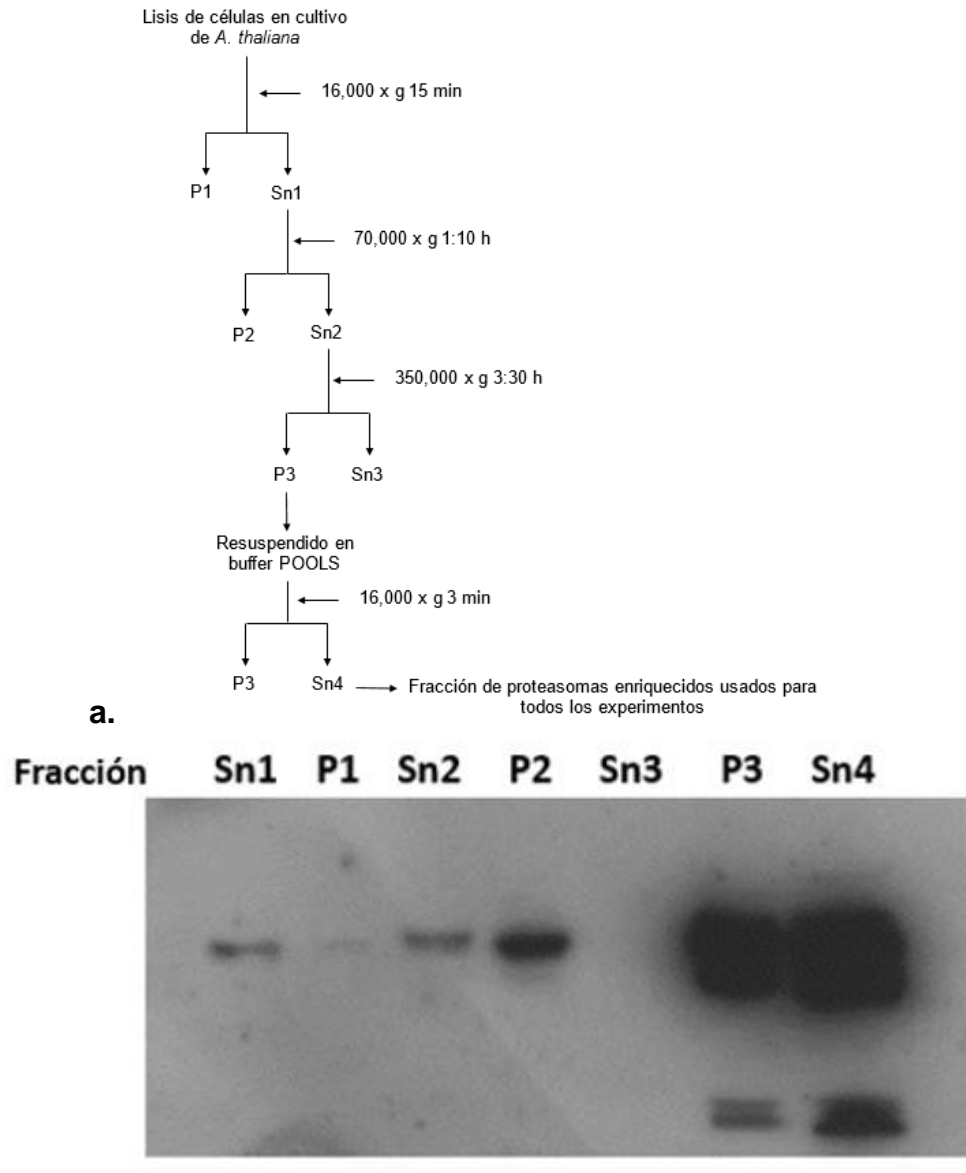


Figura 8. Extracción y enriquecimiento de proteasomas. **a)** Diagrama de flujo que representa el procedimiento de enriquecimiento de los proteasomas, indicando las diferentes fracciones que posteriormente fueron analizadas por western blot (modificado de Shibatani et al., 2006). **b)** Western blot en el que se observa el proceso de enriquecimiento de proteasomas a lo largo del protocolo de extracción y purificación. Se usó anticuerpo anti-20S. Las bandas que se observan en los carriles corresponden a la señal de 20S. Los carriles corresponden a: muestra del sobrenadante (Sn1) y el pellet (P1) después de la primera centrifugación; sobrenadante (Sn2) y pellet (P2) después de la primera ultracentrifugación, sobrenadante (Sn3) y pellet (P3) después de la segunda ultracentrifugación y pellet final (Sn4) resuspendido en "POOLS" después de centrifugarlo.

Separación de las poblaciones proteasomales mediante BN-PAGE en células control

Se corrió un BN-PAGE, con gradiente del 5 – 10%, de la fracción Sn4 para que con base a sus diferencias de peso molecular se pudieran distinguir las diferentes versiones del proteasoma. Para esto, se tiñó una fracción vertical del gel con Azul de Coomassie para establecer la posición del 20S, que en este tipo de geles es la banda mayoritaria (Figura 9a); el resto del gel fue cortado horizontalmente en ocho tiras de igual ancho (siete mm) (Fig. 9a). En nuestro laboratorio sabemos que la banda mayoritaria en estos BN-PAGE es en efecto el 20S porque además de su peso molecular y la reactividad con el α -20S, tenemos datos de espectrometría de masas que así lo confirman. Estos datos los obtuvimos de cultivos de otra línea celular de *A. thaliana*, de los cuales tenemos evidencia adicional por imágenes de microscopía electrónica que se obtuvieron de esta banda mayoritaria (Lledías *et al.*, sin publicar). Las proteínas contenidas en las ocho tiras del gel fueron electroeluidas, separadas en un gel SDS-PAGE y sometidas a western blot con un anticuerpo anti-20S. El resultado del western blot se puede ver en la Figura 9b, donde se evidencia la presencia de diferentes poblaciones proteasomales presentes en las diferentes fracciones del BN/PAGE. En los carriles 2 al 4 de la Fig. 9b se observa reactividad con el α -20S. Su posición en los BN-PAGE sugiere que son versiones del proteasoma con mayores pesos moleculares que el 20S solo. El carril 5 pertenece al proteasoma 20S y es la población mayoritaria presente en estas células analizadas en estas condiciones de cultivo. En los carriles 6 y 7 se observa señal con el α -20S. Dado que su localización en los geles corresponde a complejos de menor tamaño que el complejo 20S, una posibilidad es que correspondan a hemiproteasomas u otros intermediarios en la ruta de ensamblaje hacia el 20S maduro (Li *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2006; Burri *et al.*, 2000); estos complejos también los hemos detectado en estudios previos, hechos en nuestro laboratorio, de espectrometría de masas, actividad del proteasoma y microscopía electrónica (Lledías *et al.*, sin publicar). La presencia de proteasomas de mayor peso molecular que el 20S sugiere la interacción del 20S con una o más partículas reguladoras.

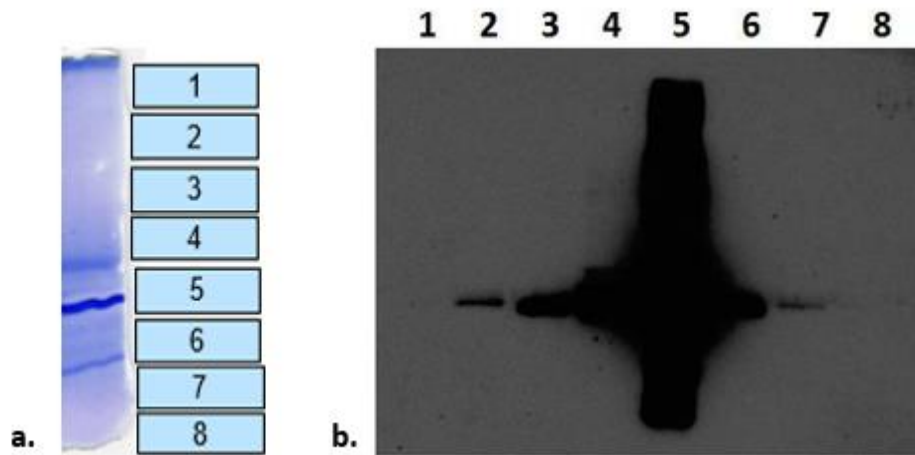


Figura 9. Separación de poblaciones proteasomales por BN-PAGE en células control. a) Gel nativo azul de la fracción enriquecida de proteasomas (Sn4) teñido con Azul de Coomassie. Se evidencia la presencia de varias bandas; la banda mayoritaria (rebanada 5) corresponde al proteasoma 20S. Esquema de corte de las 8 rebanadas horizontales. b) Western blot de las proteínas electroeluidas a partir de las ocho rebanadas; se usó un anticuerpo α -20S.

Tratamiento con paraquat (estrés oxidativo)

El paraquat es un herbicida generalista usado para controlar pastos y malezas en la agricultura (Moustaka & Moustakas, 2014). Este herbicida es absorbido por las hojas de las plantas, donde bloquea la fotosíntesis al producir radicales superóxido y otras especies reactivas de oxígeno (Moustaka & Moustakas, 2014; Yoshinaga *et al.*, 2005). Al rebasar la capacidad antioxidante celular se genera un estado de estrés oxidativo. La unión del ión paraquat (PQ^{2+}) con el oxígeno, ayudada por la intervención de la superóxido dismutasa, produce los radicales superóxido. Los radicales superóxido a su vez se unen con el hierro (Fe^{2+}) en la llamada reacción “Fenton”, y producen hidroxilos (OH). El propósito de utilizar el paraquat en este proyecto es clara, ver el efecto del estrés oxidativo sobre las diferentes poblaciones de proteasomas de las células en cultivo de *A. thaliana*.

Para ver si un estado inducido de estrés oxidativo es capaz de influir en la formación de las distintas versiones proteasomales de células en cultivo de *A. thaliana*, éstas fueron incubadas con diferentes concentraciones del herbicida a tres diferentes tiempos. Se

evaluaron nueve tratamientos, un control inicial y un control final, para un total de 11 muestras (Tabla 1).

Tratamientos con paraquat			
Concentración	Tiempo		
5 μ M	30 min	1 h	2 h
50 μ M	30 min	1 h	2 h
500 μ M	30 min	1 h	2 h

Tabla 1. Concentraciones y tiempos de los tratamientos con paraquat. Esta tabla muestra los diferentes tratamientos con paraquat usados en las células en cultivo de *A.thaliana*. La columna de la izquierda hace referencia a las tres concentraciones de paraquat usadas. La columna de la derecha indica los tiempos de exposición al agente oxidante para cada concentración.

Con el fin de observar el patrón de bandeo y la detección de 20S por western blot (Figura 10), a cada una de las 11 muestras de células (nueve con paraquat y dos controles) se le hizo el protocolo de extracción y enriquecimiento de proteasomas. De cada purificación se tomó una alícuota de 100 μ L y se le aplicó el protocolo de extracción de proteínas con metanol y cloroformo (ver Metodología). El pellet obtenido de la precipitación de proteínas fue resuspendido en 50 μ L de buffer Laemmli y se cuantificó la proteína total de cada una de las muestras por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Los datos obtenidos de la cuantificación de proteína para las 11 muestras fueron usados para cargar la misma cantidad de proteína en los dos SDS-PAGE que se corrieron (con las 11 muestras); uno para ver el patrón de bandeo de las muestras y el otro para realizar western blot (Figura 10).

SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y western blot de los tratamientos con paraquat

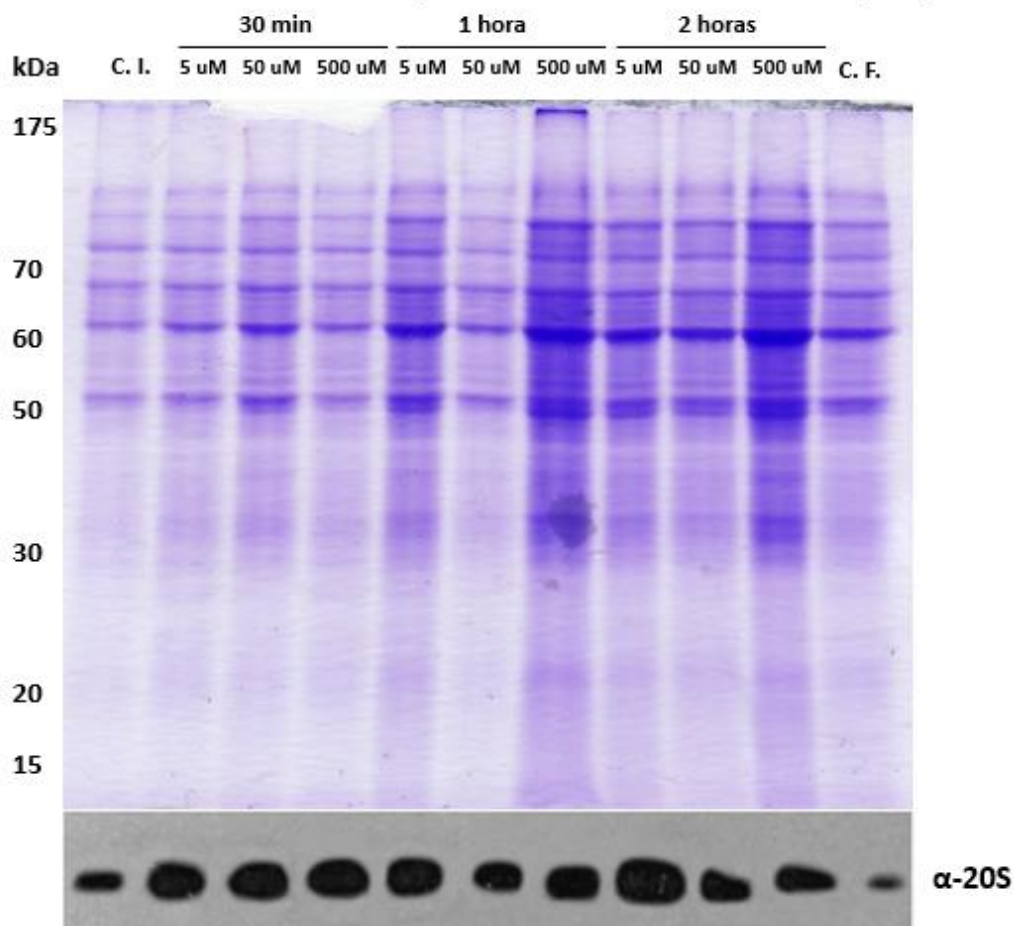


Figura 10. Tinción con Azul de Coomassie y western blot. Patrón de bandeo y SDS-PAGE de los tratamientos con paraquat y los controles sin paraquat teñido con Azul de Coomassie y el western blot que se hizo para detectar la presencia de 20S en todos los tratamientos (debajo del gel).

En el gel teñido con azul de Coomassie (Fig. 10) se puede ver que el patrón de bandeo de las 11 muestras es prácticamente el mismo, lo cual sugiere que el método de enriquecimiento de los proteasomas además de eficiente, se centra en el mismo juego de proteínas a pesar de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células. El western blot (Fig. 10 debajo del gel) se realizó con un anticuerpo anti-20S, y las bandas de 20S obtenidas fueron cuantificadas por densitometría usando el software gratuito ImageJ, para en los siguientes experimentos cargar la misma cantidad de 20S. Esto se hizo para que en cada carril de los BN-PAGE entrara la misma cantidad de proteasomas totales y con base a ello se separaran, si fuera el caso, en las diferentes versiones.

Antes de evaluar cada una de las 11 muestras del tratamiento con paraquat en un BN-PAGE independiente para separar las diferentes versiones proteasomales por muestra, fue necesario establecer un control de carga para los geles y que a la vez nos sirviera como control de electroelución, electroforesis y transferencia. Todo esto para verificar que en cada carril de los geles que se corrieron entrara la misma cantidad de proteasomas totales, como se mencionó previamente, evitando sesgos en el resultado final.

Se determinó la eficiencia de la electroelución, empleando una proteína abundante de bajo peso molecular presente en *E. coli* como control de carga. Al correr un homogenizado de *E. coli* en un SDS-Page, la proteína mostró una notable abundancia y además debido a su bajo peso molecular no interfiere con los pesos de las subunidades de 20S (Figura 11a, señalada en carriles 1 - 6). Con el fin de purificar esta proteína y poderla emplear como control interno de carga, se corrió un gel preparativo de este homogenizado, se cortó una rebanada de la región donde se ubicó esta proteína marcadora, se electroeluyeron las proteínas de la rebanada cortada y se corrieron en un SDS-PAGE para comprobar que la proteína elegida electroeluyó bien (Fig. 11b).

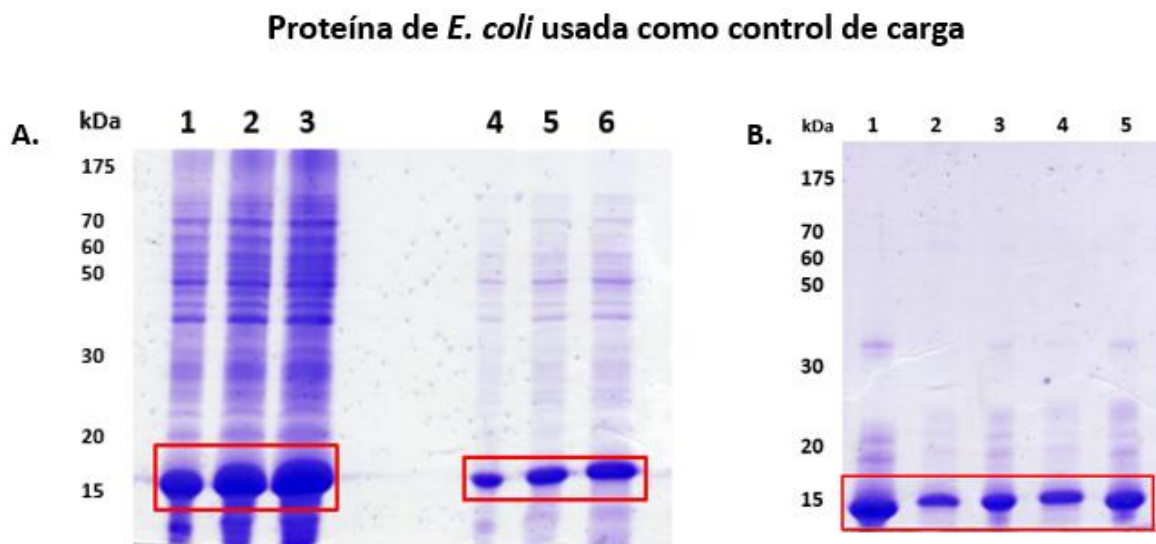


Figura 11. Electroelución de la proteína usada como control de carga. a) Homogenizado de proteínas de *E. coli*. El gel de la izquierda (carriles 1 – 3) corresponde a una muestra de *E. coli* concentrada. El gel de la derecha (carriles 4 – 6) corresponde a una muestra de *E. coli* más diluida. La banda enmarcada en rojo en los carriles 1-6

fue cortada del gel y electroeluida para usar como control de carga de los siguientes experimentos. **b)** Proteína de *E. coli* electroeluida (recuadro rojo).

Una vez obtenida la proteína para el control de carga, y antes de procesar cada una de las 11 muestras de paraquat por separado, se corrió un gel BN con todas las muestras y se tiñó con nitrato de plata para ver el patrón de bandeo y la homogeneidad de las muestras (Figura 12). En este gel se puede ver que el patrón de bandeo de las 11 muestras es muy similar; aparecen esencialmente las mismas bandas mayoritarias en la mitad del gel y en la parte inferior de éste. Lo anterior nos garantiza que se trabajó con muestras de proteínas muy similares y que ninguna de las muestras estaba degradada.

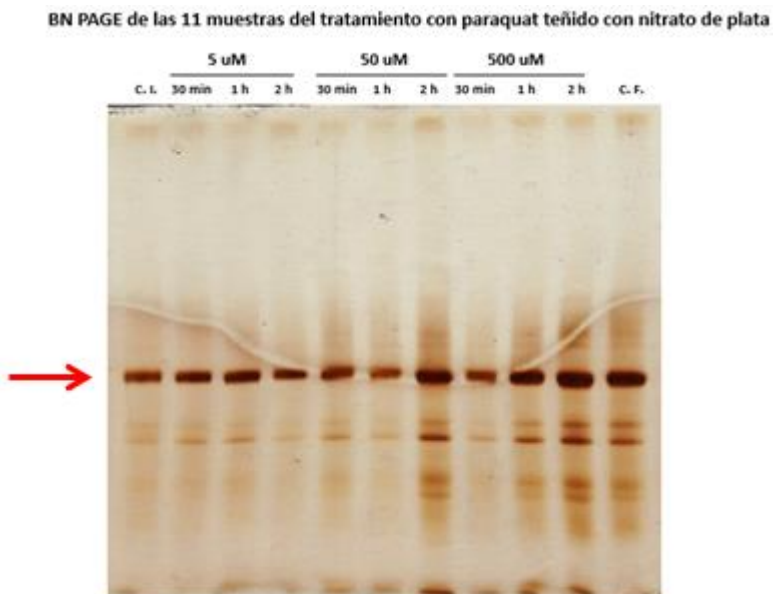


Figura 12. Tinción con nitrato de plata de las muestras del tratamiento con paraquat. Se observa la tinción con plata de un gel nativo azul. Los carriles de los extremos corresponden al control inicial (C.I.) y al control final (C.F.). Los otros carriles corresponden a las muestras tratadas con las diferentes concentraciones de paraquat (5 μ M, 50 μ M y 500 μ M) a diferentes tiempos (30 min, 1 h y 2 h). La banda mayoritaria que se observa corresponde al 20S (indicada por la flecha roja).

Las 88 rebanadas de los geles BN preparativos de las 11 muestras provenientes del tratamiento de las células en cultivo con paraquat (8 rebanadas por muestra) fueron electroeluidas. Se procedió a correr cada muestra de proteasomas tratada con paraquat, y los controles, en geles SDS-PAGE. Al gel de cada muestra se le hizo su respectivo western blot con anticuerpo anti-20S.

La utilización de la proteína bacteriana de bajo peso molecular es un parámetro que nos sirvió para ver que las diferencias que observamos entre las diferentes versiones del proteasoma son directamente atribuibles a cambios de las poblaciones y no a artificios de las técnicas de electroelución, electroforesis y transferencia. Con el fin de comprobar la eficiencia de la electroelución de las muestras, todas las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau y se observó la homogeneidad del control de carga en la parte inferior de éstas. En la Figura 9 se observa una membrana, de una de las muestras teñidas con rojo Ponceau, como ejemplo de la eficiencia en el control de carga de electroelución, electroforesis y transferencia. Se puede observar que en cada fracción aparecen diferentes proteínas. Este resultado no es un artificio de la técnica dado que el control de electroelución, la proteína de *E. coli*, muestra un nivel constante en la parte inferior de la membrana (flecha roja en la Fig. 13 que corresponde a 15 kDa). Por el contrario, las diferencias que se observan únicamente pueden atribuirse a la presencia de diferentes proteínas y complejos distribuidos a lo largo del gel con base a sus diferencias de peso molecular.

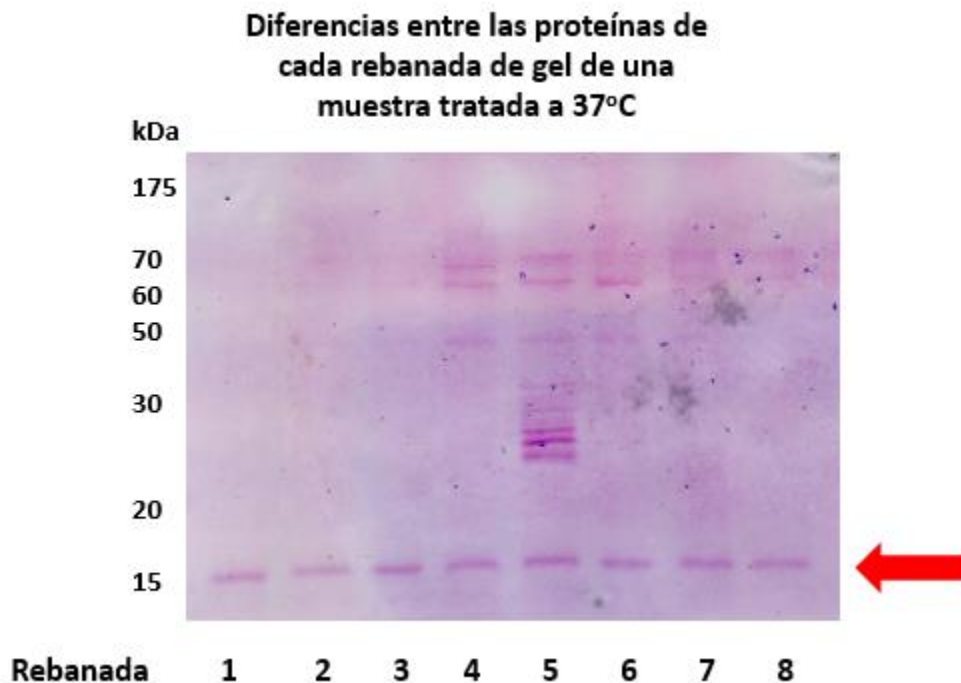


Figura 13. Tinción con Rojo Ponceau de una muestra tratada a 37°C. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, donde se ven las 8 rebanadas previamente electroeluidas (carriles 1 – 8). Esta membrana corresponde a la muestra de células tratadas a 37°C durante 30 min. En el carril 5 se observan bandas entre los 20 y 30 KDa que corresponden a las diferentes subunidades del proteasoma 20S que, como se verá más adelante, corresponden a la señal del 20S en los western blot. El control de electroelución, carga y transferencia está señalado por una flecha roja y pesa alrededor de 15 kDa.

Diversos estudios genéticos se han realizado sobre el proteasoma de *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2012; Sako *et al.*, 20012; Kurepa *et al.*, 2009; Sonoda *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004; Kwok, 1999; Vierstra, 1996). Estos han sido enfocados principalmente en identificar subunidades del 19S y caracterizar su función para correlacionarlos con las diferentes etapas de su desarrollo, sus órganos o el papel en la regulación de distintos procesos celulares. Estos estudios han sido realizados en plantas o plántulas de *A. thaliana*. Sin embargo en ninguno de estos dos estadios ni en células en cultivo de *A. thaliana* hay estudios acerca de las modificaciones que pueden sufrir los proteasomas bajo diferentes condiciones de estrés. El interés del presente estudio fue precisamente analizar los cambios que pueden experimentar las poblaciones y las diferentes versiones de proteasomas de células en cultivo de *A. thaliana* en respuesta a un estado de estrés oxidativo promovido por la presencia de paraquat en el medio de cultivo o el aumento de la temperatura.

Anteriormente en nuestro laboratorio recibimos la línea celular T87 de *A. thaliana* con la cual se iniciaron los estudios preliminares sobre el proteasoma. Una de las principales ventajas de los cultivos celulares es su homogeneidad en cuanto al tipo celular y su sincronidad, lo cual nos permite considerar que las poblaciones proteasomales son homogéneas. Una ventaja adicional es que los cultivos celulares pueden escalarse fácilmente para obtener material suficiente para el análisis bioquímico propuesto. Esto tiene una clara ventaja con respecto a utilizar plantas de *A. thaliana* ya que se corre el riesgo que las poblaciones proteasomales varíen de acuerdo a la parte de la planta.

El estrés oxidativo se define como una perturbación en el estado redox normal de los tejidos causada por un agente biótico o abiótico; es decir cuando hay un desbalance entre la producción de especies reactivas y defensa antioxidante. Este tipo de estrés produce

especies reactivas de oxígeno, peróxidos y radicales libres que pueden destruir todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y el mismo ADN (Chang *et al.*, 2013; Yoshinaga *et al.*, 2005; Halliwell & Whiteman, 2004). Uno de los agentes abióticos causantes de estrés oxidativo es el paraquat. El paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) es uno de los herbicidas generalista más comunes usados para controlar pastos y malezas en la agricultura, y así clasificado como uno de los herbicidas más tóxicos y peligrosos para plantas, animales y humanos (Moustaka & Moustakas, 2014). Este herbicida es rápidamente absorbido por las hojas de las plantas. Su modo de acción bloquea la fotosíntesis capturando electrones del fotosistema I y transfiriéndolos al oxígeno molecular (O₂) con lo que se producen radicales superóxido (Moustaka & Moustakas, 2014; Yoshinaga *et al.*, 2005), y se promueve un estado de estrés oxidativo en la planta.

En plantas son pocos los estudios que se han realizado sobre el proteasoma y las proteínas que interactúan con éste. En uno de ellos, Yoshinaga *et al.*, (2005) estudiaron el efecto del paraquat y otros agentes causantes de estrés oxidativo (H₂O₂ y menadiona) en plantas de *A. thaliana* y células en cultivo de soya y tabaco. Sus resultados muestran que estos agentes inducen muerte celular en células en cultivo, afectan la función y morfología de las mitocondrias y estimulan la producción de diferentes especies reactivas de oxígeno adicionales. Basándonos en este antecedente en plantas de *A. thaliana* y en células en cultivo de otras especies vegetales, nosotros quisimos estudiar la influencia del paraquat, como un promotor de estrés oxidativo, en las distintas poblaciones proteasomales de las células en cultivo de *A. thaliana*.

Un aspecto a tener en cuenta para los experimentos con paraquat fue determinar si las células estaban vivas durante el ensayo. Esto fue importante establecerlo para garantizar que los resultados que se obtuvieron estaban ocurriendo en células funcionales. Para tal fin empleamos el ensayo de vitalidad celular con azul de tripán (ver metodología). Se analizaron cinco cultivos: dos controles y tres con paraquat (5 µM, 50 µM y 500 µM). Todos se incubaron por 3 h, que fue el tiempo mayor en los ensayos de paraquat. El resultado se puede ver en la Tabla 2, donde se plasmaron los datos del conteo en la cámara de Neubauer. En todos los tratamientos, el número de células vivas excedió por

mucho al de células muertas. De ahí que el porcentaje de células vivas (última columna de tabla 2) fuera tan alto para todos los tratamientos; incluso a 500 μM , la concentración más alta usada, donde el porcentaje de células vivas fue del 88,5%.

Vitalidad de las células tratadas con paraquat

	Vivas	Muertas	Total	% células vivas
C. inicial	51	4	55	92,70%
5 μM	106	2	108	98%
50 μM	95	4	99	96%
500 μM	77	10	87	88,50%
C. final	91	3	94	96,80%

Tabla 2. Determinación de cuentas viables de los cultivos en presencia de paraquat. Datos del conteo de células de *A. thaliana* en cámara de Neubauer, con azul de tripán. La última columna corresponde al porcentaje de vitalidad para cada tratamiento. La primera columna de la izquierda corresponde a las concentraciones de paraquat evaluadas (todas a 2 horas) y a los controles.

Para ver si el paraquat tiene algún efecto en la redistribución de las poblaciones proteasomales, se diseñó un experimento en el cual se trataron células en cultivo de *A. thaliana* con tres diferentes concentraciones de paraquat: 5 μM , 50 μM y 500 μM . Las células fueron recuperadas, se extrajeron los proteasomas, y las diferentes versiones del proteasoma se separaron con base a su peso molecular en los BN-PAGE. Inmediatamente después de la corrida los geles fueron cortados en ocho rebanadas horizontales para electroeluir los complejos presentes en cada fracción. Las muestras obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y western blot para detectar la presencia del proteasoma 20S y con base a su peso molecular asignar las distintas versiones de proteasoma presentes en cada condición. La Figura 14 muestra los controles de células sin la adición de paraquat. Los controles de este experimento fueron células que se mantuvieron en condiciones de cultivo estables. En los controles, el inicial y a las 2 h sin paraquat, se puede ver que en el carril 5, que corresponde a la partícula 20S

independiente, se observa la señal con mayor intensidad, mientras que la señal disminuye de manera dramática hacia las regiones correspondientes a los proteasomas de mayor peso molecular (carriles 2 al 4, Fig. 14).

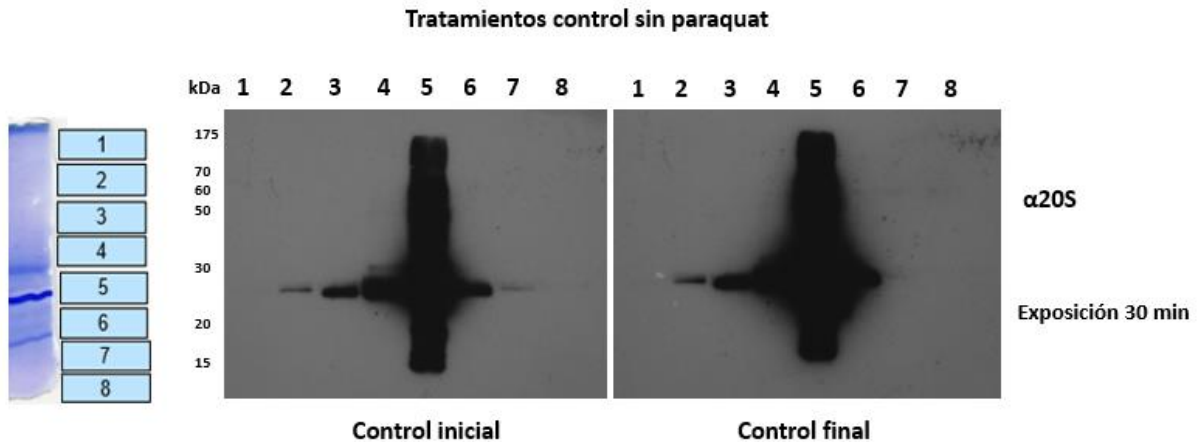


Figura 14. Tratamientos control sin adición de paraquat. Western blots de los controles inicial (tiempo 0) y final (2 horas sin paraquat) del tratamiento de células de *A. thaliana* con paraquat. Los carriles 1 – 8 en ambos controles corresponden a las rebanadas en las que fueron cortadas los geles BN. El carril 1 corresponde a la parte superior del gel (alto peso molecular) y la 8 a la parte inferior (bajo peso molecular), como lo muestra el esquema del gel a la izquierda de la figura. El tiempo de exposición de los film fue de 30 min.

Resultados previos de nuestro laboratorio realizados con la línea celular T87, también de *A. thaliana*, mostraron resultados semejantes. Los análisis de espectrometría de masas y microscopía electrónica revelaron que los complejos de peso molecular mayor que el 20S corresponden al proteasoma 20S asociado a diferentes proteínas (esto se discutirá más adelante). En los carriles 6 y 7 también se observa señal de 20S; algunas evidencias nos sugieren que estas bandas corresponden a hemiproteasomas, ya que, además de su reactividad con el anti-20S, las subunidades que detectamos se encuentran en las rebanadas de los BN-PAGE que corresponden en peso molecular a la mitad de un proteasoma 20S independiente.

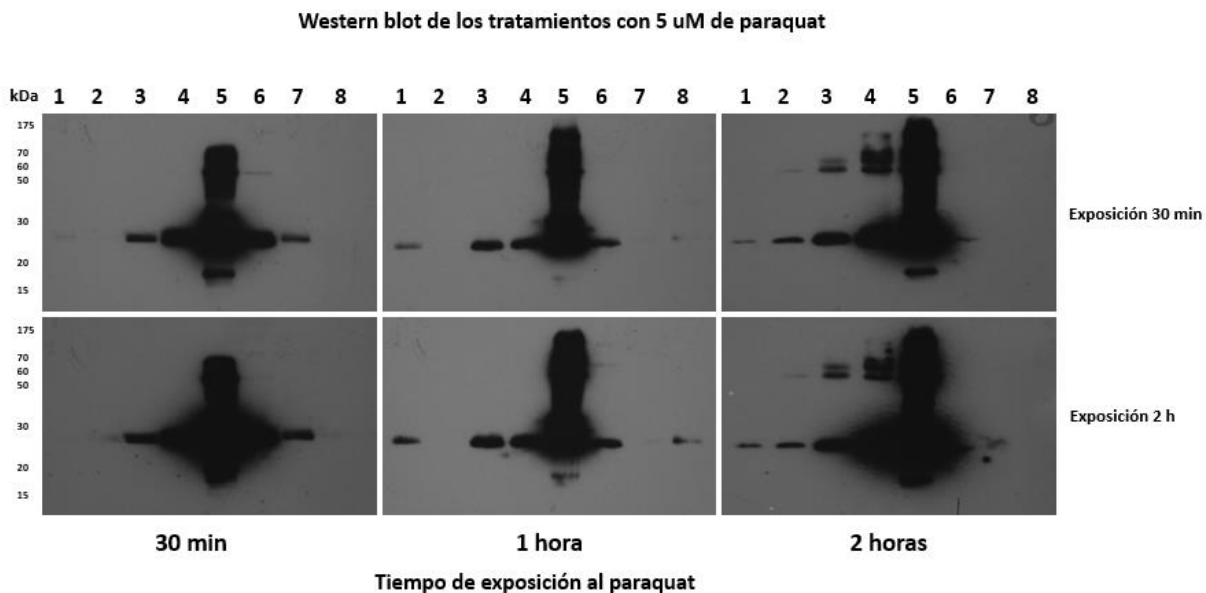


Figura 15. Western blot de las células tratadas con 5 μ M de paraquat a diferentes tiempos. Western blot de las células tratadas con 5 μ M de paraquat a diferentes tiempos. Los tiempos de exposición al sustrato de revelado fueron de 30 min y 2 horas. Los carriles 1 – 8 en cada muestra corresponden a las rebanadas en las que fueron cortadas los geles BN. La 1 corresponde a la parte superior del gel (alto peso molecular) y la 8 a la parte inferior (bajo peso molecular). Los tiempos que aparecen a la derecha de cada imagen son los tiempos de exposición de los films a la reacción de luz.

Para el caso de los tratamientos con paraquat, el revelado del western blot se hizo a la misma concentración de sustrato que para los controles (Fig. 14) pero a dos diferentes tiempos de exposición (30 min y 2 h) para observar con mayor claridad las posibles diferencias en las poblaciones proteasomales entre tratamientos. En las células tratadas con la concentración más baja de paraquat (5 μ M), se observan cambios en las poblaciones proteasomales (Figura 15). A los 30 min de tratamiento desaparece la banda del carril 2 que se aprecia en los controles (Fig. 14 carril 2). Esto puede ser por una degradación o desensamblaje de las versiones proteasomales de alto peso molecular del carril 2 de los controles de la Fig. 14, que quizás pierden proteínas con las cuales interactuaban para enriquecer la fracción de 20S independiente, ya que al parecer esta es la versión predominante durante el estrés oxidativo (Jung *et al.*, 2014). Aunque aún hay discrepancia sobre el tema, se ha visto que durante eventos de estrés oxidativo el proteasoma 26S se desensambla (pierde el complejo 19S) y el sistema de ubiquitinación se desactiva, y da paso a la acción independiente del 20S (Jung *et al.*, 2014). Conforme

aumenta el tiempo de exposición al agente oxidante se puede evidenciar la aparición de poblaciones de alto peso molecular en la Fig. 15. A la hora y dos horas de exposición se ve claramente la aparición de bandas en el carril 1, mientras que a las dos horas reaparece la banda del carril dos observada en los controles y una banda adicional en el carril 4 que están entre 70 y 100 KDa.

Al tratar las células con una concentración más alta de paraquat (50 μ M), se puede observar que a los 30 min no hay bandas correspondientes a proteasomas de alto peso molecular (Figura 16 carriles 1 y 2 a los 30 min). Se observa que bajo esta condición a los 30 min predomina la población de 20S (Fig. 16, a los 30 min de tratamiento con paraquat y a las 2 h de exposición del film a la reacción). A medida que aumenta el tiempo de exposición al agente oxidante se observa la aparición de poblaciones proteasomales de alto peso molecular (carriles 1 y 2 a las 1 y 2 horas en la Fig. 16). Aun con la controversia entre si el 26S o el 20S es el encargado de la degradación de proteínas durante el estrés oxidativo, se han identificado otros reguladores que interactúan con el 20S bajo condiciones de estrés oxidativo. Se sabe que en levaduras la proteína reguladora Ecm29 incrementa su asociación con el 19S durante el estrés oxidativo y facilita su separación del 20S, para así incrementar la capacidad de las células para remover las proteínas oxidadas (Chang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). En mamíferos se ha visto que el inmunoproteasoma (19S-20S-PA28) se induce durante el estrés oxidativo, presenta mayor actividad hacia las proteínas oxidadas y las degrada con alta eficiencia, por lo que al parecer no sólo está involucrado en presentación antigénica (Jung *et al.*, 2014). Es factible que las poblaciones de alto peso molecular que detectamos en nuestros ensayos con paraquat, correspondan a interactores que se asocian al 20S y predominan durante esta condición de estrés oxidativo. Estos resultados dejan abierta la posibilidad que en plantas existan homólogos de Ecm29 o del inmunoproteasoma que se enriquezcan durante el estrés oxidativo. Para confirmar esto se deben hacer futuros análisis de espectrometría de masas a las muestras correspondientes a estas versiones de proteasoma de alto peso molecular.

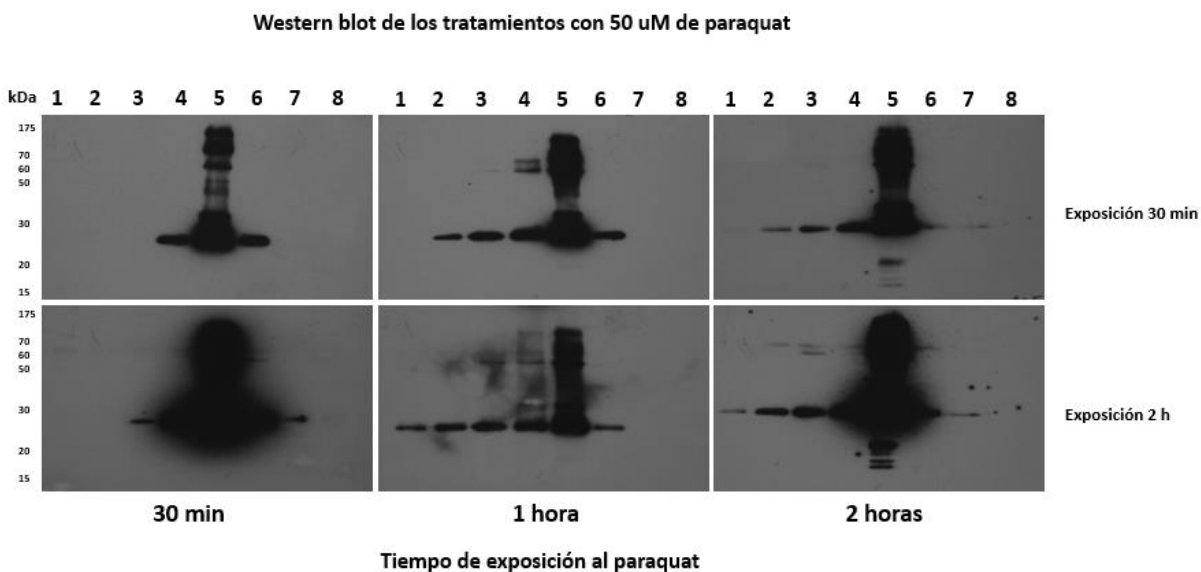


Figura 16. Western blot de las células tratadas con 50 μ M de paraquat a diferentes tiempos. Los tiempos que aparecen a la derecha de cada imagen son los tiempos de exposición de los films a la reacción de luz.

Por último, las células fueron tratadas con una elevada concentración de paraquat (500 μ M) a los mismos tres tiempos (Figura 17). Los resultados del western blot indican que a los 30 min no hay poblaciones proteasomales de alto peso molecular, pero sí hay mayor presencia de 20S independiente (Fig. 17, a los 30 min de tratamiento con paraquat y a las 2 h de exposición del film a la reacción), tal y como ocurre a los 30 min del tratamiento de 50 μ M de paraquat. Al igual que a las otras dos concentraciones de paraquat (5 y 50 μ M) a 500 μ M hay aparición de proteasomas de alto peso molecular a medida que avanza el tiempo de exposición de las células (1 y 2 h) al agente oxidante. En plantas aún no se han identificado reguladores que interactúen con el 20S durante el estrés oxidativo. Sin embargo, Book *et al.*, (2010) identificó una serie de reguladores que interactúan con el proteasoma de plántulas *A. thaliana* en condiciones control, entre los cuales se encuentra PA200, y otras chaperonas, enzimas y proteínas. De acuerdo al estudio anterior, parece que en las plantas se puede ensamblar una población proteasomal muy diversa y dinámica. Bajo esta premisa, y según los resultados obtenidos en nuestro estudio, se pueden estar formando diferentes poblaciones proteasomales en las células de *A. thaliana* en respuesta a una condición de estrés oxidativo. Con base a los resultados de los western blot a las diferentes concentraciones de paraquat y a la aparición de bandas de alto peso molecular en los diferentes tiempos de exposición al herbicida, se puede pensar que estos

reguladores y proteínas (PA200 y las proteínas identificadas por Book *et al.*, en 2010) podrían unirse al 20S para conformar nuevas versiones de proteasoma y así responder a los efectos del estrés oxidativo degradando las proteínas oxidadas en la célula.

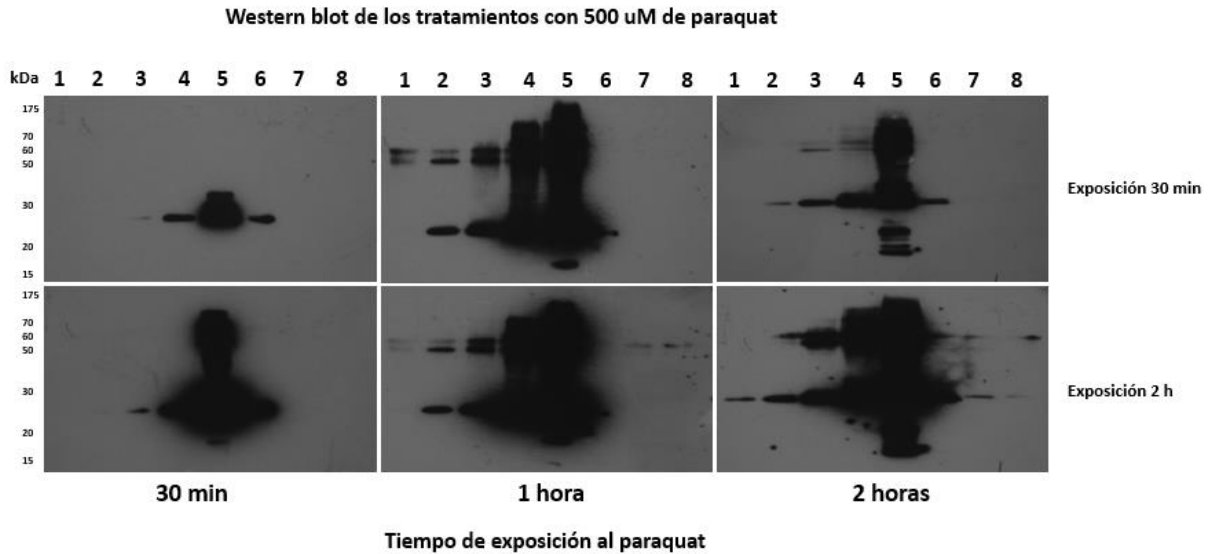


Figura 17. Western blot de las células tratadas con 500 μ M de paraquat a diferentes tiempos. Los tiempos que aparecen a la derecha de cada imagen son los tiempos de exposición de los films a la reacción de luz.

El estrés oxidativo puede dañar las proteínas de diversas maneras. Una de ellas es causando la oxidación irreversible de los aminoácidos y la formación de derivados carbonilados e hidroxilados (Kurepa *et al.*, 2008). También puede causar el plegamiento anómalo de las proteínas, con lo que sus aminoácidos hidrofóbicos (normalmente dirigidos hacia el interior de la estructura en las proteínas nativas) quedan expuestos. La exposición de los parches hidrofóbicos “marca” a las proteínas oxidadas para su degradación, como se explicará más adelante (Davies, 2001). Existen versiones encontradas acerca de la degradación de proteínas oxidadas por el proteasoma. Por un lado, se sabe que las proteínas oxidadas no necesitan una cola de poli-ubiquitina ni ATP para su degradación por el proteasoma y que el reconocimiento de estas proteínas oxidadas se lleva a cabo por el proteasoma 20S independiente (Kriegenburg *et al.*, 2011; Shringarpure *et al.*, 2003; Ferrington *et al.*, 2001; Grune *et al.*, 1997), ya que el dominio de unión hidrofóbico en las subunidades α exteriores del 20S tiene la capacidad de reconocer y unir los parches hidrofóbicos expuestos de las proteínas mal plegadas (Jung *et al.*, 2014; Kurepa *et al.*,

2008; Davies, 2001). Por otro lado, algunos estudios han reportado que el sistema ubiquitina-proteasoma está involucrado en la degradación de proteínas oxidadas (Farout & Friquet, 2006; Shang *et al.*, 2001). En 2009, Baugh *et al.* sugirieron que aunque el 20S es responsable de aproximadamente el 20% de la degradación proteasoma-dependiente, algunos sustratos no-ubiquitinados también son degradados por el 26S con igual o mayor eficiencia. Recientemente también se demostró la importancia del proteasoma 26S en la degradación de proteínas oxidadas, al estudiar la enzima deubiquitinante Usp14 en mamíferos y su homóloga Ubp6 en levadura (Lee *et al.*, 2010), y varios componentes de la subunidad 19S que resultaron ser relevantes para la degradación por 26S (Medicherla & Goldberg, 2008). La inhibición de Usp14 aceleró la degradación de proteínas oxidadas por el proteasoma 26S y le confirió a la célula resistencia al estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2010), mientras que la exposición de células de *S. cerevisiae* al paraquat genera la degradación de las proteínas citosólicas oxidadas, por mediación del SUP, incluyendo la E2 UBC4/UBC5, la subunidad del 19S RPN10 y el complejo CDC48-Ufd1-NPL4 (una enzima tipo chaperona y selectiva para ubiquitina) (Medicherla & Goldberg, 2008). De acuerdo a nuestros resultados, donde podemos ver la aparición de proteasomas de alto peso molecular (Fig. 15 carriles 1, 2 y 3), algunas de estas poblaciones posiblemente pueden ser proteasoma 26S que está actuando en respuesta a la acumulación de proteínas oxidadas por efecto del paraquat. Así mismo, proteínas que interactúan con el 20S y el mismo 26S pueden expresarse de manera preferencial bajo estas condiciones de estrés y favorecer la aparición de las poblaciones de alto peso molecular. Esta posibilidad de explotará mediante mediante futuros estudios de espectrometría de masas.

En el análisis por western blot de las muestras 5 μ M de paraquat a las 2 h (Fig. 15), 50 μ M de paraquat a 1 y 2 h (Fig. 16) y 500 μ M de paraquat a 1 y 2 h (Fig. 17) se observaron bandas localizadas en la región de alto peso molecular (entre 50 y 70 kDa). Diversos estudios han reportado que muchas proteínas mal plegadas que no pueden ser renaturalizadas ni destruidas por el sistema SUP forman agregados insolubles. Esta condición favorece la formación de una gran estructura llamada el agresoma (Kriegenburg *et al.*, 2011; Johnston *et al.*, 1998). El agresoma contiene diversos tipos de chaperonas y componentes del sistema SUP, como proteasomas y ubiquitinas. Esta puede ser una

explicación para las bandas entre 50 y 70kDa de peso, ya que pueden corresponder a subunidades del proteasoma 20S ubiquitinadas o agregadas, de ahí su alto peso molecular. En nuestro laboratorio, cuando purificamos los proteasomas de *A. thaliana*, el de humano, el de *Agave americana* y el de levadura con ayuda de columnas de intercambio iónico, vemos que la fracción con mayor actividad con un sustrato sintético y reactividad al anti-20S, es decir que es prácticamente solo 20S, muestra bandas de alto peso molecular, como recién mencionadas de entre 50 y 70 KDa. Estas bandas que reaccionan con el anticuerpo α -20S también reaccionan con el anticuerpo α -ubiquitina (α -Ub). La interpretación de esto es que hay proteasomas ubiquitinados aún en condiciones estables de crecimiento y que los 20S ubiquitinados pueden aumentar con la exposición al paraquat. El hecho que se observen con mayor claridad en las formas proteasomales de mayor peso molecular es porque hay abundancia de estas formas.

En plantas se ha descrito la formación de agresomas en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental, entre ellos el aumento de temperatura (Nakajima & Suzuki, 2013), y se da al poco tiempo de exposición al estrés (5 min para el aumento de temperatura). La presencia de estas bandas de alto peso molecular también se puede explicar debido a que; como posiblemente el sistema ubiquitina-proteasoma está desactivado (Zhang et al., 2008), las proteínas ubiquitinadas no son degradadas y por tanto se van acumulando en la célula. Precisamente esta acumulación de proteínas ubiquitinadas se pudo observar al determinar el contenido total de proteínas ubiquitinadas mediante el ensayo de slot blot y utilizando el anticuerpo α -Ub (Fig. 18a), donde en los tratamientos a 5 μ M de paraquat a las 2 h, 50 μ M de paraquat a 1 y 2 h y 500 μ M de paraquat a 1 y 2 h se aprecia que los niveles de ubiquitinación aumentan en comparación con las células control. Lo anterior puede estar ocurriendo por la posible formación de agresomas debido a las condiciones de estrés generadas por el paraquat. Es decir, a mayor estrés oxidativo aumentan las proteínas ubiquitinadas; el estrés oxidativo aumenta la actividad de conjugación y promueve la formación de conjugados de ubiquitina (Zhang et al., 2008; Shang et al., 1997). Como las proteínas oxidadas son el sustrato preferido para la ubiquitinación (Dudek et al., 2005), el estrés oxidativo leve incrementa la disponibilidad de sustrato para ubiquitinación (Zhang et al., 2008; Shang et al., 1997). Adicionalmente, agentes causantes de estrés

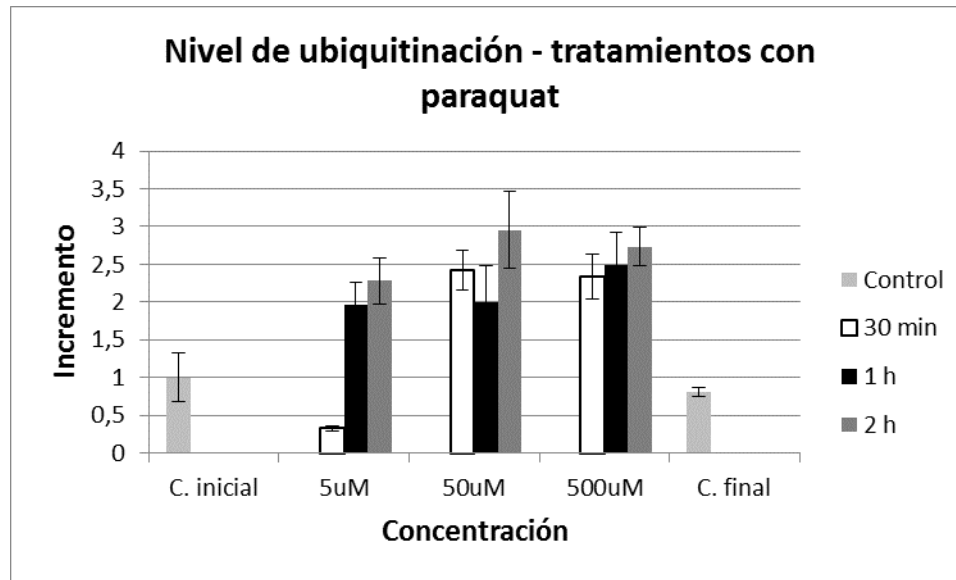
oxidativo (menadione, CdCl₂, paraquat, entre otros) estimulan fuertemente la ubiquitinación, siendo uno de los primeros marcadores en aumentar una vez dado el estímulo oxidante (McDonagh & Sheehan, 2006). Sin embargo, un estado de estrés oxidativo severo puede reducir los niveles de conjugados de ubiquitina en la célula mediante la inactivación de las enzimas conjugadoras de ubiquitina. Como la formación de conjugados de ubiquitina es dependiente de ATP, la depleción del ATP por un estrés oxidativo severo también contribuye a la disminución en los niveles de conjugados de ubiquitina (Jahngen-Hodge *et al.*, 1997; Shang & Taylor, 1995). Por lo tanto, los niveles elevados de ubiquitina indican un estrés oxidativo leve, mientras que la reducción en los niveles de conjugados de ubiquitina puede ser el resultado de un estrés oxidativo severo. Todo lo anterior hace de la ubiquitinación uno de los mejores marcadores de estrés oxidativo (Chora *et al.*, 2008).

En los carriles 6 y 7 correspondientes al análisis por western blot de los tratamientos con 5 µM de paraquat a 30 min, 1 h y 2 h (Fig. 15), 50 µM de paraquat a las 2 h (Fig. 16) y 500 µM de paraquat a 1 h y 2 h (Fig. 17), se observa la presencia de bandas (de entre 20 y 30 kDa). En ensayos previos desarrollados en nuestro laboratorio (Lledías *et al.*, sin publicar) con la línea celular T87 de *A. thaliana*, y siguiendo la misma metodología que en este trabajo, se encontró que estas bandas corresponden a hemiproteasomas. Algunas evidencias nos sugieren que estas bandas corresponden a hemiproteasomas, de los cuales ya hablamos anteriormente. Los estudios de espectrometría de masas realizados a las muestras indicaron que estos complejos están formados por las subunidades alfa y beta del 20S. Los hemiproteasomas han sido reportados como intermediarios de la maduración del 20S, pesan alrededor de 420 kDa y están formados por un anillo de subunidades α y un anillo de subunidades β no procesadas (Li *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2006; Burri *et al.*, 2000). Estos hemiproteasomas no tienen actividad proteolítica, por lo que se requiere la unión de dos de éstos para formar un proteasoma 20S maduro y con actividad proteolítica (Pegoraro *et al.*, 2012; Burri *et al.*, 2000).

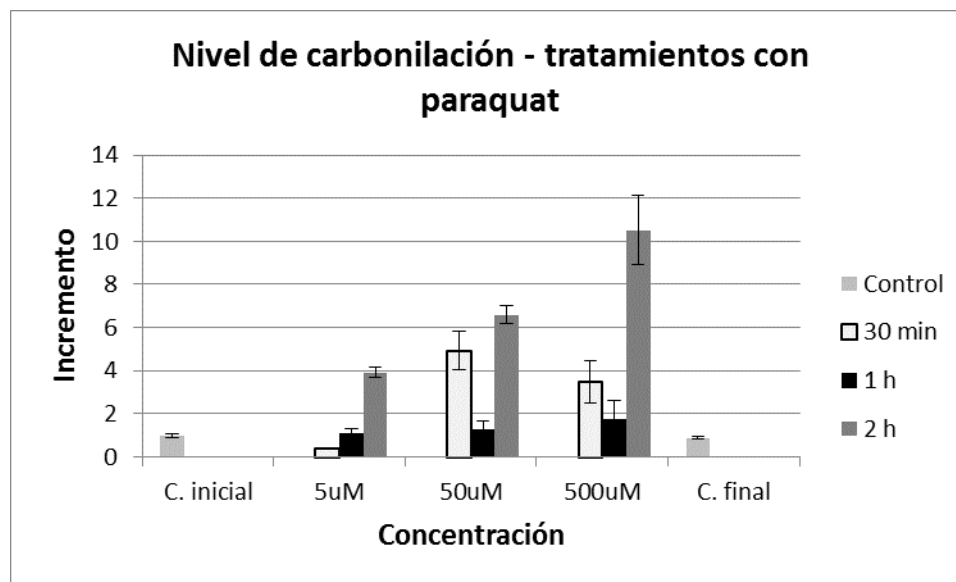
Los resultados obtenidos de los western blot para el tratamiento con paraquat de células en cultivo de *A. thaliana* sugieren que en respuesta a las condiciones de estrés oxidativo

generadas se generan o estabilizan versiones proteasomales de alto peso molecular. Los ensamblajes en complejos de alto peso molecular y consecuentes cambios en diferentes poblaciones proteasomales, se pueden deber a la interacción de uno o varios reguladores con el 20S. Para verificar la presencia de reguladores proteasomales y proteínas interactoras de proteasoma, los complejos de alto peso molecular identificados en los western blot serán analizados por espectrometría de masas y microscopía electrónica.

Adicional a los resultados obtenidos por western blot de los tratamientos con paraquat, para detectar la formación de proteasomas de alto peso molecular, se evaluaron dos marcadores de estrés oxidativo: la ubiquitinación y la carbonilación de proteínas, con la idea de relacionar sus niveles con las versiones del proteasoma encontradas. La determinación de los niveles de proteínas conjugadas a Ub y de proteínas oxidadas se realizaron de manera independiente con el homogenizado total de las células de *A. thaliana*; las muestras se tomaron de los cultivos previos a la extracción y enriquecimiento de los proteasomas (ver metodología). Brevemente, se tomó una muestra de 200 uL del homogenizado de cada tratamiento, se precipitó con metanol/cloroformo y se solubilizó con buffer de muestra de Laemmli para determinar el contenido de proteína para realizar un ensayo de slot blot (por triplicado). Los niveles de los conjugados de ubiquitina y de carbonilación de proteína en las muestras se llevó a cabo por medio de anticuerpos α -ubiquitina y α -dihidrofenilhidrazona respectivamente (para mayor detalle, ver metodología). Los resultados de ubiquitinación se observan en la Figura 18a. Al resultado obtenido por densitometría del control inicial se le asignó el valor de 1. Con base a esta asignación, se calculó el incremento o decremento de cada uno de los tratamientos y del control final. El control final fue un cultivo de células al cual no se le añadió paraquat pero se dejó en agitación las dos horas que duró el experimento. Como se observa en la Figura 18a, los niveles de ubiquitinación de éste son prácticamente iguales a los del control inicial.



a.



b.

Figura 18. Medición de marcadores de estrés. a) ubiquitinación y **b)** carbonilación. C. inicial: control inicial. Concentración: concentración de paraquat a la que fueron sometidas las células de *A. thaliana*. C. final: control final. Al valor cuantificado por densitometría para el control inicial le fue asignado el valor de 1 y con base a este se calculó el incremento para los tratamientos. El experimento se realizó por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Diversos estudios han demostrado que la capacidad de ubiquitinación y la cantidad de proteínas ubiquitinadas se ven afectados durante el estrés oxidativo. Bajo condiciones de oxidación leve, las proteínas son más susceptibles a proteólisis, mientras que a niveles elevados de oxidación la proteólisis se reduce debido a la formación de agregados proteicos

(Farout & Friquet, 2006). En la Fig. 18a, a 5 μM de paraquat durante 30 min se puede ver que en comparación con el control, la ubiquitinación se redujo a más del 50%; en este caso es posible que las proteínas estén siendo degradadas y que esta concentración de paraquat y a este tiempo tan solo se genere un estrés leve para las células. El descenso en el nivel de ubiquitinación puede deberse a que el SUP está degradando las proteínas ubiquitinadas en respuesta a la condición de estrés generada. Sin embargo, al analizar la concentración de 5 μM a 1 y 2 horas, se puede ver un aumento en la ubiquitinación, el cual puede ocurrir a que, de acuerdo a lo demostrado en estudios recientes, el proteasoma 26S se inactiva bajo condiciones de estrés oxidativo antes de la inactivación del sistema de ubiquitinación, lo cual puede explicar el aumento en los niveles de ubiquitinación en respuesta a la adición de paraquat (Shang & Taylor, 2011; Shang *et al.*, 2006; Dudek *et al.*, 2005).

Al analizar la concentración de 50 μM (Fig. 18a) se puede ver un aumento considerable de ubiquitinación a los tres tiempos. Se ha encontrado que a niveles fisiológicos constantes de estrés oxidativo se puede perjudicar la actividad del proteasoma y reducir la degradación de sustratos ubiquitinados, razón por la cual se acumulan (Shang & Taylor, 2011). Es precisamente esta acumulación de conjugados de ubiquitina lo que ocurre a 50 μM y por lo tanto se evidencia un aumento en los niveles de estos conjugados, como se ve en la gráfica. Recientemente un estudio en células de retina humana demostró que el proteasoma es más susceptible a inactivación por oxidación que las enzimas ubiquitinadoras. Estas células fueron expuestas a 50 μM de H_2O_2 , un agente causante de estrés oxidativo al igual que el paraquat; bajo estas condiciones el proteasoma (posiblemente el 26S) sufrió inactivación del 30 – 50%, mientras que el sistema de ubiquitinación no sufrió efectos adversos (Shang & Taylor, 2011; Zhang *et al.*, 2008). El anterior estudio aporta una posible explicación al comportamiento de estas células de *A. thaliana* expuestas a 50 μM , ya que se observa un aumento en la ubiquitinación y esto puede corresponder a una inactivación de proteasoma a esta concentración.

Los niveles de conjugados de ubiquitina a la concentración de paraquat de 500 μM siguen un patrón similar que a 50 μM . En la Fig. 18a se puede ver que a 500 μM los niveles de conjugados de ubiquitina aumentan considerablemente (casi tres veces) con respecto al

control inicial. Trabajos previos han identificado que un estrés oxidativo severo reduce los niveles de conjugación de ubiquitina en las células, ya que se inactivan las enzimas conjugadoras de ubiquitina (enzimas E2) (Shang & Taylor, 2011; Obin *et al.*, 1998; Jahngen-Hodge *et al.*, 1997). En otras palabras, se inactiva el sistema SUP pero aún hay proteínas ubiquitinadas acumuladas que no se pudieron degradar. Esto es precisamente lo que puede estar ocurriendo en la Fig. 18a a la concentración de paraquat de 500 μM (la más alta usada en este trabajo). Contrario a las concentraciones de paraquat de 5 μM y 50 μM , a 500 μM hay un incremento progresivo de ubiquitinación a medida que avanza el tiempo de exposición al paraquat. Quizás esta concentración ya es muy tóxica para la célula y los sistemas de degradación se encuentran casi inactivos. Posiblemente a esta concentración el sistema SUP ya no sea funcional, siendo acorde con lo ya reportado en estudios previos (Chen *et al.*, 2009). Estos resultados de ubiquitinación acercan más los resultados de este proyecto al modelo que involucra al proteasoma 20S como el encargado de degradar las proteínas durante eventos de estrés oxidativo.

Como lo reportan Kriegenburg *et al.* (2011) en mamíferos, el aumento de ubiquitinación debido a la agregación de proteínas puede ocurrir por dos razones: una es que las proteínas agregadas se unan directamente e inhiban el proteasoma, y bloquean la puerta de entrada a éste y afectando su función de degradación; la otra es que el agregoma tiene un efecto inhibitorio en la degradación de proteínas ya que atrapa componentes del sistema SUP reduciendo su disponibilidad.

Bajo condiciones celulares óptimas, el proteasoma 26S es muy estable; sin embargo bajo condiciones de estrés oxidativo éste se disocia en 20S y 19S que quedan libres e inactivan el SUP (Kriegenburg *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque el 20S queda activo, puede haber reguladores proteasomales que se unen a éste durante el estrés oxidativo y que pueden conformar diferentes versiones de proteasoma como posiblemente sean los proteasomas de alto peso molecular detectados en las Fig. 15 – 17 en respuesta al estrés.

El otro marcador de estrés evaluado fue la carbonilación, ya que éste es un muy buen marcador de oxidación de proteínas debido a su estabilidad y temprana-detección (Wong *et*

al., 2010; Irazusta *et al.*, 2008; Nystrom, 2005). Aparte de las proteínas en general, se ha encontrado que el proteasoma 20S también se puede carbonilar en las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 3$ durante eventos de estrés oxidativo (Ahmed *et al.*, 2010; Zong *et al.*, 2008). La cuantificación de grupos carbonilo es hasta ahora el método más aceptado para medir el daño oxidativo en proteínas, bajo condiciones de estrés oxidativo.

En la concentración de paraquat de 5 μM se puede ver un aumento gradual de la carbonilación (Figura 18b). A los 30 min el nivel de carbonilos es inferior al control. Sin embargo, a la hora y a las 2 horas hay un incremento hasta cuatro veces mayor. Al comparar los resultados de ubiquitinación y carbonilación a 5 μM a 30 min, se puede ver que ambos descienden en comparación al control inicial; esto sugiere que puede haber mecanismos que en estas condiciones degradan las proteínas ubiquitinadas y las oxidadas simultáneamente. El aumento en los niveles de carbonilación a 1 y 2 h se puede explicar posiblemente debido a un desequilibrio del sistema de degradación proteasomal y a la formación de agregomas que bloquean la actividad del proteasoma.

Para el tratamiento de 50 μM de paraquat, desde los 30 min hay un incremento de carbonilación cinco veces mayor con respecto al control inicial. Sin embargo, a la hora de tratamiento hay una reducción drástica que alcanza los niveles del cultivo control. A las dos horas el nivel de carbonilación vuelve a aumentar hasta casi seis veces más que el control. Diversos estudios han reportado que la carbonilación es, hasta cierto punto, una señal para la degradación de proteínas; el aumento en la carbonilación y el número de proteínas que sufren este proceso provoca que se formen agregados de alto peso molecular que no pueden ser degradados por el proteasoma y bloquean su actividad (Grune *et al.*, 2004; Grune *et al.*, 2003; Bota *et al.*, 2002). Esto es algo que puede estar ocurriendo a las dos horas, donde posiblemente el ritmo de oxidación de proteínas está siendo mucho mayor que el ritmo de degradación de éstas y se están formando agregados que impiden la degradación proteica.

Para completar estos resultados obtenidos de la carbonilación están los datos de 500 μM de paraquat. El comportamiento de las células a esta concentración sigue el mismo patrón que

a 50 μ M, ya que hay un incremento inicial de la carbonilación a los 30 min, seguido de un decremento del 50% a la hora. Finalmente, a las 2 h el nivel de carbonilación se dispara a 10 veces más que el control. Esta disminución en la proteólisis entre la hora y las dos horas puede ser una consecuencia de la formación de agregados proteicos que actúen con el proteasoma, lo obstruyen y causan la acumulación de otros sustratos dañados originalmente susceptibles a degradación proteasomal y terminan siendo tóxicos para la célula (Grune *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la concentración de 500 μ M de paraquat causa estragos significativos en el sistema de degradación proteica, ya que los niveles de proteínas oxidadas son muy altos y la célula no es capaz de degradarlas a la misma velocidad a la que se producen y causan su acumulación (a las 2 h). Al ser sometidas a este estrés, es posible que en las células se estén conformando y enriqueciendo versiones de proteasoma de alto peso molecular (Fig. 17) como medida de emergencia para contrarrestar el desbalance que se ha generado.

Algo muy destacable que muestra la Fig. 18b es la conducta de los niveles de carbonilación a una hora de tratamiento a las tres concentraciones. Como se observa, para las tres concentraciones el nivel de carbonilación a la hora es prácticamente el mismo. Esto nos indica que quizás sea una ventana de tiempo en la cual las células están respondiendo efectivamente ante el estrés oxidativo generado por el paraquat, de ahí que los niveles de carbonilación se reducen al nivel del control. Este proceso de degradación ocurre independiente de la ubiquitinación, y solo basta que las proteínas estén carboniladas para que sean degradadas (Díaz & Membrillo, 2006). Sin embargo, también se observa que pasada la hora, parece que las células ya son capaces de mantener ese equilibrio y su sistema de degradación empieza a tener problemas para cumplir su función. Se está siguiendo un esquema de respuesta negativa inicial al evento de estrés (30 min), seguido de una respuesta eficaz de degradación de proteínas oxidadas (1 h), y por último un desequilibrio y una pérdida de función de la maquinaria de degradación proteasomal (2 h). Como la carbonilación es una modificación irreversible e irreparable, esta es una señal para que las proteínas oxidadas entren a la vía de degradación en vez de ser enviadas a la vía de reparación asistida por chaperonas (Nystrom, 2005); esto indica que las proteínas oxidadas

que no se pueden degradar se siguen acumulando con el tiempo y terminan causando los estragos ya mencionados.

En este trabajo se encontró que los proteasomas de células de *A. thaliana* sometidas a estrés oxidativo sufren modificaciones y pueden conformar diferentes versiones proteasomales de alto peso molecular. Esto puede estar dado por ensamblajes de proteasomas 20S en tándem (como se explica más adelante para los resultados de microscopía) o bien por la interacción del mismo 20S con diferentes reguladores en sus extremos (uno de ellos puede ser Ecm29). Es posible que esta reacción celular ocurra gracias al aumento de proteínas oxidadas y a la necesidad de degradarlas en respuesta al estrés presente. Comparando los controles inicial y final con los tratamientos de paraquat, se evidencia una clara presencia en estos últimos de proteasomas de alto peso molecular. Se puede ver que las poblaciones de 20S se distribuyen en componentes nuevos de diferentes pesos. A mayor concentración de paraquat y tiempo de exposición al estrés, se observa la presencia de proteasomas de mayor peso molecular al 20S, así como de un aumento en los niveles de ubiquitinación y una disminución en los niveles de carbonilación. A la menor concentración de paraquat (5 μM) ocurre este fenómeno, lo que nos sugiere que las células responden incluso a concentraciones muy bajas del agente causante del estrés oxidativo. Por lo tanto los resultados hasta ahora obtenidos en este proyecto pueden aportar indicios nuevos sobre estas modificaciones y sobre nuevas conformaciones de proteasoma que se puedan dar. Considerando la concentración de paraquat de 50 μM a 1 h de tratamiento, los niveles de ubiquitinación son altos mientras que los de carbonilación disminuyen, sugiriendo que hay degradación de proteínas oxidadas pero no de las ubiquitinadas; en este caso las versiones proteasomales de alto peso molecular identificadas en esta concentración (Fig. 16, 1 h carriles, 1 y 2) pueden estar influyendo para que esto ocurra dentro de la célula en respuesta a las condiciones dadas.

Se sabe que en levaduras cada subunidad del proteasoma 20S y del regulador 19S está codificada por un solo gen, mientras que la mayoría de las subunidades en *Arabidopsis* y arroz están codificadas por pares de genes. Muchos de estos pares de genes tienen

secuencia e impacto genético diferente, siendo esto una fuente de alta variabilidad en la función y composición de las subunidades (Book *et al.*, 2010; Kurepa & Smalle, 2008). Teniendo en cuenta esta afirmación, y junto con los datos obtenidos en este trabajo, no se descarta la hipótesis que haya reguladores y proteínas aún no conocidos que estén interactuando con el 20S en *A. thaliana* debido a la alta variabilidad que puede haber en la formación de subunidades y reguladores del proteasoma. Futuros estudios de espectrometría de masas y microscopía electrónica podrían ayudar a dilucidar mejor qué reguladores y/o proteínas interactúan con el 20S, bajo estas condiciones, que hacen que haya diferentes poblaciones proteasomales de variado peso molecular. Por medio de la espectrometría de masa podremos saber exactamente qué proteínas están presentes en las poblaciones proteasomales analizadas y si es posible, identificar la presencia de reguladores proteasomales. Estas mismas poblaciones proteasomales serán analizadas por microscopía electrónica para comprobar visualmente los resultados de la espectrometría y ver bajo qué condiciones hay 20S o 20S con reguladores unidos a uno o ambos extremos de éste.

En este trabajo se analizó de manera sistemática la formación de las diferentes versiones del proteasoma en respuesta al paraquat, y se encontró que se forman poblaciones proteasomales de diferentes pesos moleculares dependiendo de la condición a la que son sometidas las células. Previamente en nuestro laboratorio (Lledías *et al.*, sin publicar) se hicieron experimentos con tratamientos similares pero con células distintas (una línea celular de *A. thaliana* diferente) y se obtuvieron datos preliminares donde se observaron también diferentes versiones proteasomales. El hecho de que en células distintas (con tratamientos semejantes) se hayan observado resultados similares a los de este estudio es una indicación de que esto puede ser una respuesta ante condiciones adversas (estrés oxidativo en este caso).

Tratamiento por aumento de temperatura

El otro tipo de estrés que se analizó en este proyecto fue el aumento de temperatura. La exposición de las células a altas temperaturas genera afecta la estructura del citoesqueleto,

la morfología de la superficie celular, el estado redox, la síntesis de ADN y el metabolismo y estabilidad de las proteínas. Precisamente este tipo de estrés ocasiona un daño molecular y genera proteínas con plegamiento anormal, las cuales pueden formar agregados tóxicos o inhibir el proceso de degradación normal por el SUP (Verghese *et al.*, 2012; Verbeke *et al.*, 2001).

La exposición de células u organismos a temperaturas elevadas inducen una respuesta que involucra transcripción y traducción de HSP (del inglés Heat Shock Proteins), las cuales ayudan a contrarrestar los efectos adversos causados por la condición de estrés (Verbeke *et al.*, 2001). Algunas de las HSP son chaperonas que ayudan a la renaturalización y al correcto plegamiento de proteínas desnaturalizadas. Estas chaperonas reconocen y se unen a las proteínas que no están en su estado nativo y que exponen parches hidrofóbicos en la superficie. La partícula reguladora de proteasoma, PA28, tiene actividad de chaperona y se cree que se une y captura a las proteínas mal plegadas para dirigir las al replegamiento o a la degradación por el proteasoma (Connell *et al.*, 2001; Luders *et al.*, 2000). Mediante este mecanismo las chaperonas ayudan a disminuir la formación de agregados proteicos (Verbeke *et al.*, 2001; Arrigo, 1998). Este impedimento para que se formen agregados proteicos es una ventaja para la célula y para el sistema SUP ya que éste no se satura y puede continuar su actividad de degradación.

Para los experimentos de exposición a alta temperatura, en este caso se cultivaron las células a 37°C, cuando la temperatura óptima del cultivo es de 25°C. El objetivo fue estudiar si había variación en las poblaciones proteasomales en células en cultivo de *A. thaliana* en estas condiciones. Para esto se diseñó un experimento en el cual se crecieron las células en cultivo de *A. thaliana* a 37°C y a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 2 h, 3 h). Las células fueron recuperadas por filtración, se extrajeron los proteasomas y se trataron como está indicado en la metodología para detectar las diferentes versiones de proteasoma presentes en cada condición.

Se realizó la determinación de proteína de cada una de las cuatro muestras sometidas al aumento de temperatura y los dos controles, por el método de Bradford (Bradford, 1976),

y con base en los datos obtenidos se corrieron dos SDS-PAGE; uno para ver el patrón de bandeo de las muestras y el otro para realizar western blot con el fin de observar la presencia de 20S en todas las muestras (Figura 19).

SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y western blot de los tratamientos con aumento de temperatura

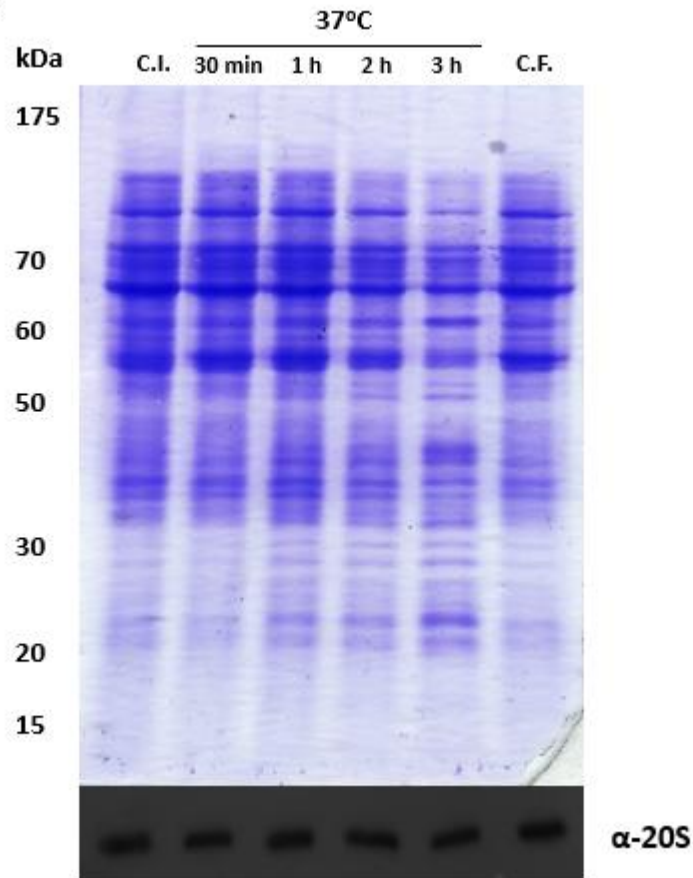


Figura 19. Tinción con Azul de Coomassie y western blot. SDS-PAGE de las muestras sometidas a aumento de temperatura y los controles teñido con Azul de Coomassie y el western blot del gel. En el gel observa el patrón de bandeo de las muestras sometidas a aumento de temperatura a diferentes tiempos. En la parte inferior el western blot muestra la presencia de 20S en cada una de las muestras.

Con el fin de observar el patrón de proteínas y la detección de 20S por western blot (Figura 19), a cada una de las seis muestras de células (cuatro sometidas a aumento de temperatura y dos controles) se le hizo el protocolo de extracción y enriquecimiento de proteasomas. De cada purificación se tomó una alícuota de 100 μ L y se le aplicó el protocolo de extracción de proteínas con metanol y cloroformo (ver Metodología). El pellet obtenido de la precipitación de proteínas fue resuspendido en 50 μ L de buffer Laemmli y se cuantificó la proteína total de cada una de las muestras por el método de

Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Los datos obtenidos de la cuantificación de proteína para las seis muestras fueron usados para cargar la misma cantidad de proteína en los dos SDS-PAGE que se corrieron (con las seis muestras); uno para ver el patrón de proteínas de las muestras y el otro para realizar western blot (Figura 19).

En el gel de las seis muestras de células sometidas a aumento de temperatura, teñido con azul de Coomassie (Fig. 19), se puede ver que el patrón de bandeo de las seis muestras es prácticamente el mismo, lo cual sugiere que el método de enriquecimiento de los proteasomas además de eficiente (Fig. 8b), se centra en el mismo juego de proteínas a pesar de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células. El western blot (Fig. 19 debajo del gel) se realizó con un anticuerpo anti-20S, y el resultado obtenido fue cuantificado por densitometría, usando el software gratuito ImageJ, para en los siguientes experimentos cargar la misma cantidad de 20S por muestra.

Adicionalmente, antes de analizar las poblaciones proteasomales de cada muestra por separado, se corrió un gel BN-PAGE con las seis muestras y se tiñó con nitrato de plata (Figura 20). En este gel se pudieron ver las similitudes en el patrón de proteínas, asegurándonos que se trabajó con el mismo juego de proteínas y que ninguna muestra estaba degradada.

BN PAGE de las seis muestras del tratamiento con aumento de temperatura teñido con nitrato de plata

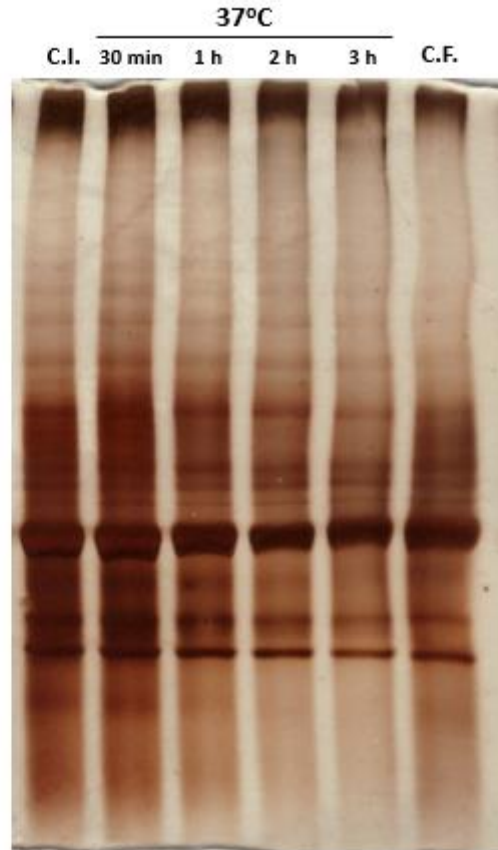


Figura 20. Tinción con nitrato de plata del BN-PAGE de las muestras del tratamiento con aumento de temperatura. Los carriles de los extremos corresponden al control inicial (C.I.) y al control final (C.F.). Los otros carriles corresponden a las muestras de células cultivadas a 37°C a diferentes tiempos. La banda mayoritaria corresponde a la población de 20S independiente.

El análisis de las versiones proteasomales presentes en cada condición se hizo corriendo cada muestra por separado en un BN/PAGE. Los datos de la densitometría fueron usados para cargar la misma cantidad de proteasoma total en todas las muestras. El gel de cada muestra fue cortado en 8 rebanadas horizontales como lo muestra la Figura 9. Esto se hizo para ver cómo, en forma nativa, los proteasomas se dividen en núcleos 20S individuales o en proteasomas de alto peso molecular distinto. Las proteínas fueron electroeluidas y posteriormente procesadas para su análisis por SDS-PAGE y western blot.

Las proteínas de las 48 rebanadas de los geles BN preparativos de las seis muestras provenientes del tratamiento por aumento de temperatura de las células en cultivo (8 rebanadas por muestra) fueron electroeluidas; a cada rebanada a electroeluir se le agregaron 10 uL de la proteína de *E. coli* como control de electroelución, electroforesis y transferencia (ver metodología). Se procedió a separar cada muestra sometida al aumento de temperatura y los controles por separado en geles SDS-PAGE. A cada una se le realizó su respectivo western blot con anticuerpo anti-20S. Los tiempos que aparecen debajo de cada imagen son los tiempos de cultivo de las células a 37°C (Figuras 21 y 22). Todos los western blot fueron revelados con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce).

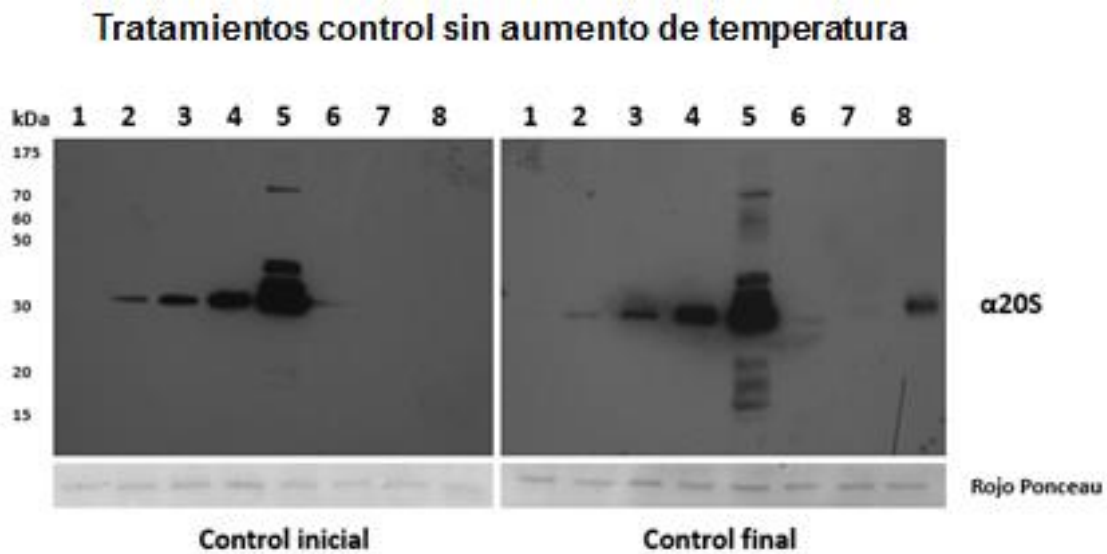


Figura 21. Tratamientos control sin aumento de temperatura. Western blot del control inicial y final del experimento por aumento de temperatura, con su respectivo control de electroelución, electroforesis y transferencia (marcado como Rojo Ponceau en la figura). Los carriles 1 – 8 en ambos controles corresponden a las rebanadas en las que fueron cortadas los geles BN (como en la Fig. 10). El carril 1 corresponde a la parte superior del gel (alto peso molecular) y la 8 a la parte inferior (bajo peso molecular). Aunque no se indica en la figura, el tiempo de exposición de los film a la reacción de luz fue de 30 min.

En la Figura 21 se observa el western blot de los dos controles para el experimento de aumento de temperatura. El control inicial fueron las células en cultivo a 25°C y a un

tiempo cero, es decir que se colectaron previo a iniciar el experimento por aumento de temperatura. El control final fueron células en cultivo a 25°C que se dejaron en agitación durante las tres horas que duró el experimento. Como se observa en la Fig. 21, el análisis por western blot de los controles inicial y final arroja resultados similares. En el carril 5 se evidencia la banda más abundante, la cual corresponde al proteasoma 20S independiente. Es en esta rebanada 5 donde se concentra la mayoría del proteasoma en su forma fundamental (20S). Sin embargo también hay versiones de proteasoma de mayor peso molecular (carriles 2, 3 y 4), aunque éstas se presentan en menor cantidad.

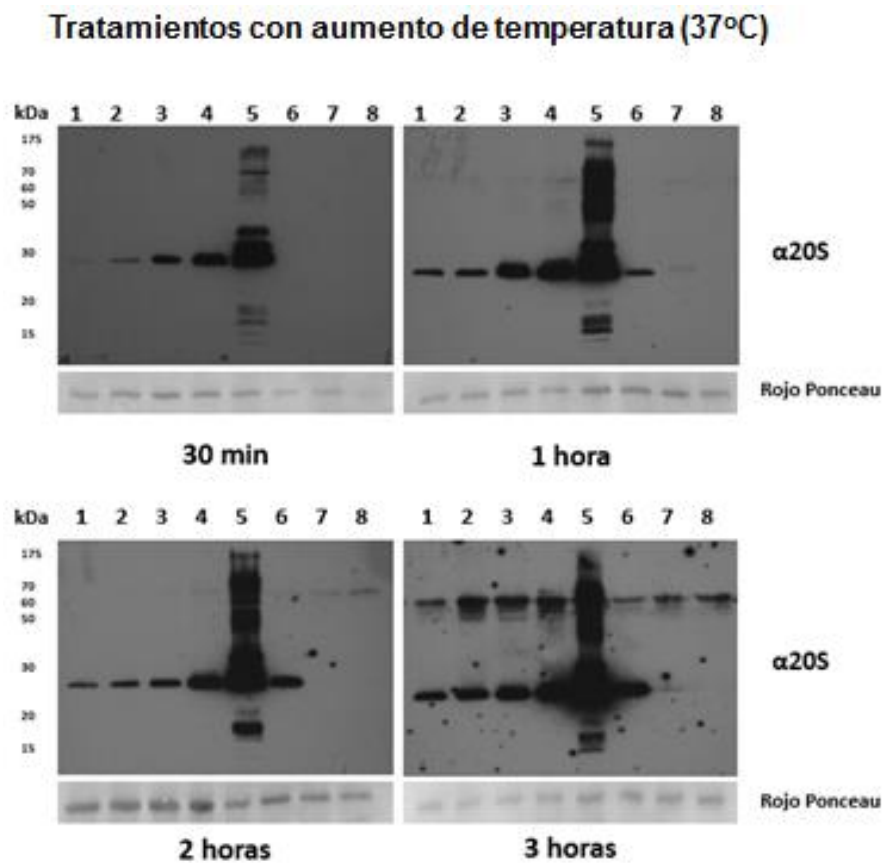
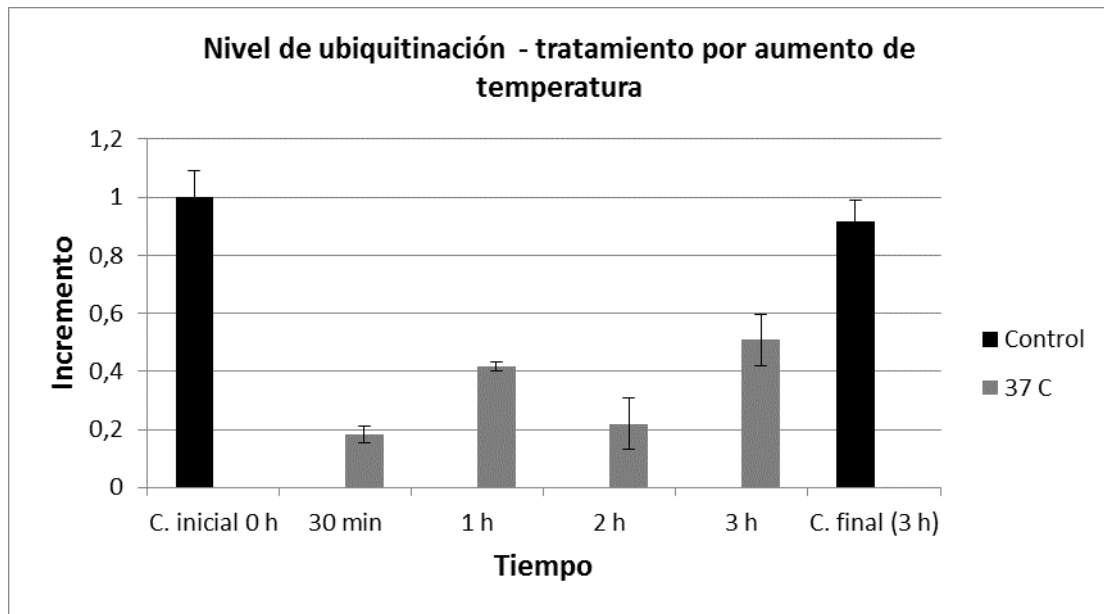
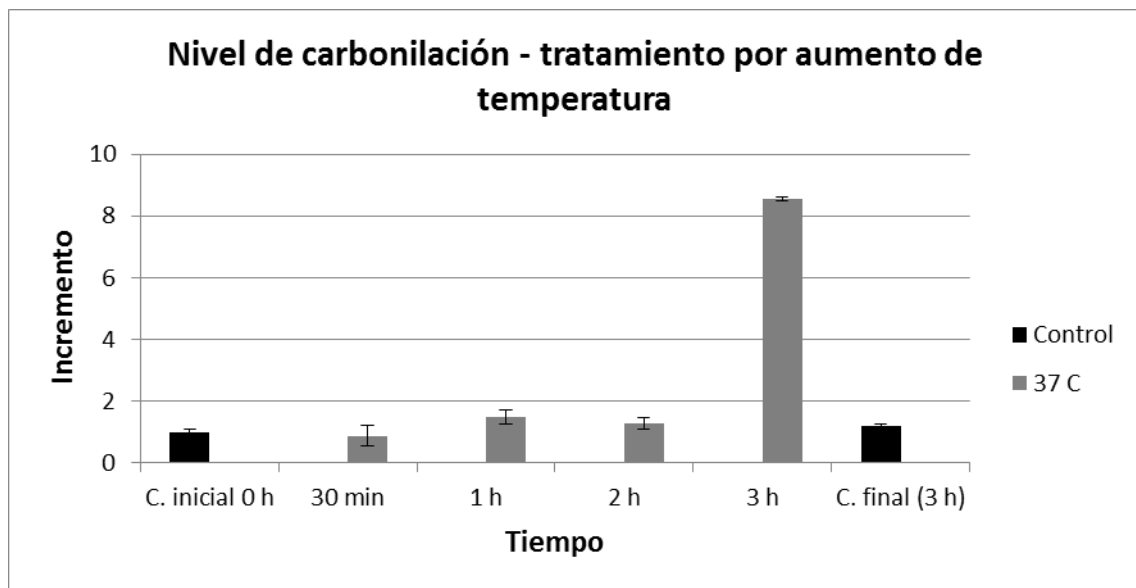


Figura 22. Tratamientos sometidos al aumento de temperatura. Western blot de las muestras de células sometidas a un aumento de temperatura (37°C), con su respectivo control de electroelución, electroforesis y transferencia (marcado como Rojo Ponceau en la figura). El tiempo que aparece debajo de cada western blot fue el tiempo al que se dejó cada muestra a 37°C. Los carriles 1 – 8 en ambos controles corresponden a las rebanadas en las que fueron cortadas los geles BN (como en la Fig. 9). El carril 1 corresponde a la parte superior del gel (alto peso molecular) y la 8 a la parte inferior (bajo peso molecular). Aunque no se indica en la figura, el tiempo de exposición de los film a la reacción de luz fue de 30 min.

La Figura 22 muestra el resultado del experimento al exponer los cultivos a 37°C a los diferentes tiempos. Como patrón general se observa que a medida que avanza el tiempo de exposición a la temperatura elevada las poblaciones proteasomales de alto peso molecular, que corresponden a las rebanadas (carriles) 1 - 4 se van enriqueciendo. El perfil que muestran los análisis de western blot que corresponden al tratamiento a 30 min es semejante a los controles (Fig. 22), salvo que en el carril 1 se empieza a evidenciar la aparición de los proteasomas de mayor peso molecular. A 1 y 2 h de tratamiento las bandas del carril 1 se enriquecen aún más, sugiriendo que hay un aumento en la conformación de las versiones proteasomales allí presentes. Por último, a las 3 h se ve mayor señal de las poblaciones de alto peso molecular que corresponden a las rebanadas (carriles) 1 y 2 posiblemente como respuesta de la célula a la prolongada exposición al estrés por temperatura. Además, se pueden observar unas bandas de alrededor de 60 kDa, las cuales pueden ser subunidades de 20S ubiquitinadas o bien entrecruzadas por la modificación oxidativa.



a.



b.

Figura 23. Medición de marcadores de estrés. a) ubiquitinación y **b)** carbonilación. C. inicial: control inicial. C. final: control final. Los tiempos (30 min, 1 h, 2 h y 3 h) corresponden a lo que se mantuvieron los cultivos celulares a 37°C. Al valor cuantificado por densitometría para el control inicial le fue asignado el valor de 1 y con base a este se calculó el incremento para los tratamientos. El experimento se realizó por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Adicional a los resultados obtenidos por western blot de los tratamientos con aumento de temperatura para detectar la formación de proteasomas de alto peso molecular, se evaluaron dos marcadores de estrés oxidativo: la ubiquitinación y la carbonilación de proteínas, con la idea de relacionar sus niveles con las versiones del proteasoma

encontradas. La determinación de los niveles de proteínas conjugadas a Ub y de proteínas oxidadas se realizaron de manera independiente con el homogenizado total de las células de *A. thaliana* recién lisadas con perlas de vidrio; las muestras se tomaron de los cultivos previos a la extracción y enriquecimiento de los proteasomas (ver metodología). Brevemente, se tomó una muestra de 200 μ L del homogenizado de cada tratamiento, se precipitó con metanol/cloroformo y se solubilizó con buffer de muestra de Laemmli para determinar el contenido de proteína para realizar un ensayo de slot blot (por triplicado). Los niveles de los conjugados de ubiquitina y de carbonilación de proteína en las muestras se llevó a cabo por medio de anticuerpos α -ubiquitina y α -dihidrofénilhidrazona respectivamente (para mayor detalle, ver metodología). Los resultados del ensayo de ubiquitinación se observan en la Figura 23a, donde se puede ver el nivel de ubiquitinación para los tratamientos por aumento de temperatura. El resultado es muy llamativo ya que el nivel de ubiquitinación para los cuatro tratamientos por aumento de temperatura es menor (hasta en un 50% a los 30 min, 1 h y 2 h) que los controles. Se sabe que la ubiquitinación es un componente muy importante en la respuesta a estrés por temperatura ya que el SUP elimina eficientemente, con ayuda de HSPs y chaperonas, las proteínas mal plegadas (Flick & Kaiser, 2012). Una explicación para lo anterior puede ser que las células estudiadas en este proyecto activan la respuesta al aumento de temperatura y expresan HSPs y chaperonas, que pueden potenciar la actividad del SUP para contrarrestar el estado de estrés, como se ve en la Fig. 23a con la disminución de los niveles de ubiquitinación a 30 min, 1 h, 2 h y 3 h. Hay que resaltar que, al ser los niveles de ubiquitinación menores en los tratamientos de temperatura que en los controles, se puede inferir que la maquinaria de degradación de las proteínas ubiquitinadas está funcionando con mayor efectividad que en condiciones óptimas de cultivo. Es así como en respuesta a altas temperaturas puede que se produzcan proteasomas de alto peso molecular que posiblemente tengan mayor eficiencia para degradar las proteínas ubiquitinadas. Sin embargo, futuros estudios de funcionalidad del proteasoma y degradación de sustratos servirán para confirmar la anterior suposición.

Uno de los reguladores proteasomales identificados en plántulas de *A. thaliana* y coliflor que participan en la respuesta a estrés es la partícula PR500 (Peng *et al.*, 2001). Este

regulador comparte al menos tres subunidades con el 19S y está asociado con la proteína HSP70, aunque en plantas no estresadas se encuentra como partícula libre. Aunque se desconoce con exactitud su función, una hipótesis es que sea un reservorio de subunidades de la partícula 19S disponibles cuando se requiere mayor síntesis de 26S para contrarrestar los efectos del mal plegamiento de proteínas causados por el estrés calórico (Kurepa *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2001). Los resultados de western blot y ubiquitinación para el ensayo de aumento de temperatura mostrados en este trabajo muestran el ensamblaje de proteasomas de alto peso molecular donde el regulador PR500 podría estar involucrado durante la condición de estrés; sería necesario hacer estudios adicionales usando anticuerpo anti – PR500 y espectrometría de masas para confirmar si este regulador está presente. Los bajos niveles de ubiquitinación de los tratamientos de aumento de temperatura en comparación con los controles sugieren la existencia de mecanismos que aceleran la degradación de proteínas ubiquitinadas; posiblemente esto tenga algo que ver con las versiones proteasomales de alto peso molecular identificadas en la Fig. 22 en los carriles 1, 2, 3 y 4 de todos los tiempos. Así mismo puede haber presencia de uno a varios reguladores proteasomales, como PR500, que interactúen con el 20S y promuevan una respuesta bajo esta condición de aumento de temperatura.

Aparte de la ubiquitinación, el otro marcador de estrés analizado fue la carbonilación de proteínas. Este ensayo se realizó para conocer los niveles de daño oxidativo en las proteínas en el tratamiento con aumento de temperatura. Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 23b, donde se observan los niveles de proteínas carboniladas para los controles inicial y final, y para los cuatro tiempos analizados. Los niveles de carbonilación de proteínas a 30 min, 1 h y 2 h son prácticamente iguales al control inicial. Se ha demostrado la relación entre el estrés oxidativo (producción de radicales libres) y el estrés por aumento de temperatura (Pappolla *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1990). En plantas, el estrés por aumento de temperatura afecta el metabolismo y varios procesos fisiológicos incluidos la fotosíntesis y la respiración (Hossain *et al.*, 2013). Para contrarrestar este tipo de estrés, las plantas han desarrollado diversos mecanismos, dos de los cuales son la captura de ROS y la síntesis de antioxidantes (Al-Whaibi, 2010; Wahid *et al.*, 2007). Los resultados de carbonilación de proteínas a 30 min, 1 h y 2 h se podrían explicar a la luz de esta premisa. Los bajos niveles

se carbonilación observados sugieren que la captura de ROS y/o la síntesis de enzimas antioxidantes pueden ocurrir y por lo tanto impide la oxidación de proteínas o bien otra posibilidad es que las proteínas oxidadas se degradan a mayor velocidad. Lo anterior también apoyado en que las HSPs reconocen y previenen la acumulación de proteínas dañadas (por ejemplo las oxidadas) ya sea ayudando a que vuelvan a su conformación nativa o a que sean degradadas aquellas que tienen daños irreversibles (Feder & Hofmann, 1999); este fenómeno de acumulación también puede estar ocurriendo en el tratamiento por aumento de temperatura a 30 min, 1 h y 2 h como se muestra en el ensayo de carbonilación de proteínas.

Contrario a lo ocurrido en los tiempos anteriores, a las 3 h hay una elevación abrupta en el nivel de proteínas oxidadas que llega a ser 8.5 veces mayor que lo mostrado por los controles. Este elevado nivel de proteínas carboniladas se podría explicar por una posible disminución en la síntesis o un daño en las enzimas anti-oxidantes, como se ha podido ver en otros modelos. En varios estudios en células de ovario de hámster chino (CHO) se encontró que la producción de ROS a 37°C es una consecuencia normal del metabolismo celular y que a 43°C se da un punto de inflexión ya que al parecer las enzimas antioxidantes se desnaturalizan (Freeman *et al.*, 1990; Shrieve *et al.*, 1986). Un estudio en células de *A. thaliana*, tratadas a 37°C durante 2 h, reveló que a esta temperatura las células están protegidas de la muerte inducida por calor gracias a la síntesis de Hsp101, Hsp70 y proteínas de choque térmico pequeñas, las cuales pueden estar cumpliendo un papel anti – apoptótico en la célula (Rikhvanov *et al.*, 2007). Lo encontrado en el anterior estudio nos puede ayudar a explicar la disminución en los niveles de ubiquitinación observados en la Fig. 23a (a los 30 min y a 1, 2 y 3 h), ya que posiblemente en las células sometidas a 37°C está ocurriendo síntesis de diferentes HSPs que pueden estar ayudando a contrarrestar el efecto de la elevación de temperatura. Siendo que las células en cultivo de *A. thaliana* se mantienen en condiciones estables de crecimiento a 25°C, el aumento de la temperatura a 37°C durante 3 h en este caso, puede estar ocasionando la desnaturalización de las enzimas antioxidantes y evitando el catabolismo de las ROS. Por lo tanto se puede estar favoreciendo la oxidación de las proteínas y su progresiva acumulación, por lo que no

pueden ser degradadas, siendo esto una posible explicación para el alto nivel de carbonilación a las 3 h en la Fig. 23b.

Los datos de este experimento apoyan la relación entre el aumento de temperatura y el estrés oxidativo, algo bien descrito en otros modelos. Por ejemplo, se ha encontrado que en la nuez de la india (*Anacardium occidentale*) las altas temperaturas modulan la protección al estrés oxidativo mediante la activación de algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa (Ferreira *et al.*, 2011). En levaduras, el estrés por aumento de temperatura inicialmente induce estrés oxidativo ya que afecta el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria; sin embargo posteriormente se da la expresión de numerosas HSPs, factores de transcripción de heat shock y enzimas que finalmente inducen resistencia al estrés oxidativo (Morano *et al.*, 2012; Vergheze *et al.*, 2012). Davidson *et al.* (1996), demostraron que células de levadura que carecían de catalasa y de superóxido dismutasa (enzimas antioxidantes) fueron hipersensibles al aumento de temperatura. Rikhvanov *et al.*, (2007) también demostraron en su estudio que el tratamiento de células en cultivo de *A. thaliana* con inhibidores mitocondriales y con desacopladores durante un estrés leve por aumento de temperatura disminuye la síntesis de HSPs, lo cual es importante para la termotolerancia inducida en plantas. Así mismo encontraron que la exposición a una temperatura elevada indujo un aumento en el consumo de oxígeno por la célula y la hiperpolarización de la membrana interna de la mitocondria. En conjunto, estos hechos sugieren que las funciones mitocondriales son esenciales para la síntesis de HSP inducida por calor y el desarrollo de termotolerancia inducida en un cultivo celular de *A. thaliana*. A futuro se podría experimentar con la línea celular de *A. thaliana* usada en este proyecto para ver, bajo condiciones de estrés por aumento de temperatura, la acumulación y la actividad de varias de las enzimas antioxidantes que se sabe participan en la respuesta a estrés. Además se hace necesario la realización de estudios adicionales sobre las poblaciones proteasomales observadas en los western blot de la Fig. 22 para identificar si alguna/s de éstas tienen algo que ver con el aumento del estrés oxidativo causado por el aumento de la temperatura.

Nuestros resultados del ensayo por aumento de temperatura sugieren que esta condición de estrés promueve el ensamblaje o bien, la estabilización de diferentes versiones del proteasoma de pesos moleculares mayores al 20S, lo cual genera importantes cambios entre las diferentes poblaciones proteasomales en las células de *A. thaliana* en cultivo. Además, durante esta condición de estrés posiblemente hay aumento en la actividad del sistema SUP, lo que favorece la degradación de proteínas ubiquitinadas y de proteínas oxidadas. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios de este tipo usando otras temperaturas y diferentes tiempos de exposición, para validar estos resultados preliminares.

Microscopía electrónica de proteasomas de alto peso molecular

En nuestro laboratorio se han realizado estudios de microscopía electrónica de proteasomas aislados de células en cultivo de la línea T87 de *A. thaliana* (en el presente trabajo estudiamos una línea celular diferente). Brevemente, las células de *A. thaliana* fueron mantenidas en condiciones estables de cultivo. Estas células fueron recuperadas, lisadas y se hizo el protocolo de extracción de proteasomas (ver metodología). Posteriormente, la fracción recuperada de proteasomas enriquecidos se corrió en un gel nativo, el cual se cortó en ocho rebanadas (como lo muestra la figura 9). Los complejos contenidos en cada fracción se electroeluyeron para su análisis por microscopía electrónica de transmisión mediante tinción negativa. Entre las imágenes obtenidas de las rebanadas 1 y 2 del gel (ver figura 9) se destacan versiones de proteasomas de alto peso molecular, cuyas formas sugieren la presencia de posibles reguladores unidos al 20S o ensamblajes en tándem de varios proteasomas 20S (Figura 24d). En la Fig. 24d también se observa, en la esquina superior derecha, una versión de proteasoma que se asemeja a un 26S, así como una especie de “codos” que se forman en la parte superior e inferior del megacomplejo y le dan un ángulo. Otras imágenes sugieren también la presencia de reguladores unidos al 20S en uno o ambos extremos (Fig. 24a – c). Al analizar los complejos electroeluidos de la rebanada que contiene la banda mayoritaria (rebanada 5 en la Fig. 9) obtuvimos una imagen con vista superior de un proteasoma 20S, donde se identifican las siete subunidades que componen los anillos (Fig. 24e, paneles superiores). Con base en los resultados

obtenidos en este proyecto, se plantea la idea de analizar por microscopía electrónica algunas muestras de proteasomas de células tratadas con paraquat o sometidas a aumento de temperatura con el fin de detectar y describir posibles nuevas poblaciones proteasomales o reguladores que se puedan unir al 20S bajo diferentes condiciones de estrés.

Imágenes de proteasomas obtenidas por microscopía electrónica

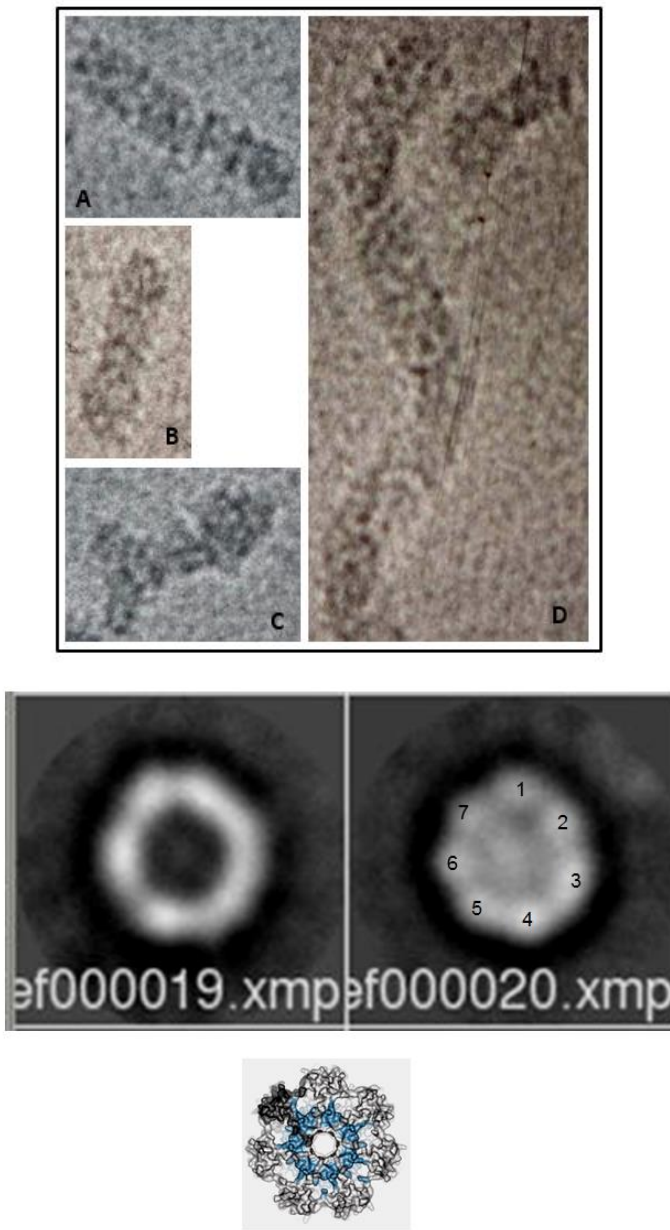


Figura 24. Microscopía electrónica del proteasoma. Imágenes de diferentes versiones proteasomales obtenidas por microscopía electrónica a partir de muestras de proteasomas de células mantenidas en condiciones estables de crecimiento. a-c) se observan proteasomas que posiblemente tienen reguladores

unidos en los extremos. **d)** megacomplejo conformado por posibles proteasomas organizados en tándem. Se observan dentro de la misma figura unos complejos que parecen codos y dan un ángulo al megacomplejo. En la esquina superior derecha se observa una versión que se asemeja a un proteasoma 26S. **e)** imagen obtenida de los complejos electroeluidos de la rebanada de un BN-PAGE que contenía la banda mayoritaria. Se observa la vista superior de un proteasoma 20S (paneles superiores), en el cual se identifican las siete subunidades que componen cada uno de los anillos.

Conclusiones

La mayoría de estudios sobre el proteasoma se han realizado en células de mamíferos y de levaduras. Este trabajo es la primera aproximación al estudio (bioquímico y estructural) de las diferentes versiones proteasomales de células en cultivo de *A. thaliana* sometidas a estrés; específicamente estrés oxidativo y por aumento de temperatura.

Según los resultados obtenidos, pudimos concluir preliminarmente que el proteasoma de células en cultivo de *A. thaliana* sufre modificaciones estructurales cuando es sometido a estrés oxidativo y a aumento de temperatura, ya que se favorece la formación y estabilidad de distintas poblaciones proteasomales de alto peso molecular (mayor al 20S independiente). Para el caso del estrés oxidativo (adición de paraquat) pudimos concluir que se favorece la formación de proteasomas de alto peso molecular (sugiriendo posibles nuevas poblaciones proteasomales no descritas antes en plantas), y que esto tiene una relación directa con el aumento en los niveles de conjugados de ubiquitina y de proteínas carboniladas. Esta relación directa nos sugiere que la adición de paraquat está generando una respuesta celular (aumento en los marcadores de estrés) y que posiblemente el ensamblaje de estas poblaciones proteasomales de alto peso molecular puede estar ocurriendo en respuesta a la condición de estrés generada. En resumen, la generación de estrés oxidativo a través de la adición de paraquat genera en células en cultivo de *A. thaliana* la formación de proteasomas de alto peso molecular (mayor al 20S independiente) y el aumento en los niveles celulares de proteínas ubiquitinadas y carboniladas.

El aumento de temperatura en los cultivos de células de *A. thaliana* ocasionó la formación de poblaciones proteasomales de alto peso molecular (mayores al 20S

independiente), las cuales pudimos identificar en los diferentes tiempos de exposición a la elevación de temperatura (de 25 a 37°C). Para el caso de estrés por aumento de temperatura pudimos concluir que la elevación de la temperatura del cultivo celular a 37°C causa un estrés leve en las células, ya que los niveles de ubiquitinación disminuyeron en todos los tiempos de exposición al insulto, lo cual coincide con reportes de estudios previos que afirman que bajo condiciones de estrés calórico leve, los niveles de ubiquitinación tienden a disminuir. Así mismo pudimos observar que a pesar de la disminución en el nivel de ubiquitinación, el estrés por aumento de temperatura no generó cambios en el nivel de proteínas carboniladas (salvo a las 3 h), por lo que pudimos concluir que bajo este tipo de estrés, y durante las primeras dos horas de tratamiento, solo se ve afectado el SUP.

En general, a partir de los resultados de este trabajo, podemos concluir que al someter las células en cultivo de *A. thaliana* a diferentes condiciones de estrés, las poblaciones proteasomales de estas células sufren cambios conformacionales y estructurales que se ven reflejados en la aparición de versiones de proteasoma de alto peso molecular, las cuales deberán ser analizadas con otro tipo de técnicas experimentales para identificar sus componentes, aun cuando nuestros estudios de microscopía electrónica confirman su presencia en la célula y su variación en tamaño y forma respecto al proteasoma 20S independiente. Los resultados de este trabajo apoyan lo encontrado previamente en nuestro laboratorio en la línea celular T87 de *A. thaliana* con tratamientos semejantes, por lo que podemos concluir que ésta puede ser una respuesta general de la célula vegetal ante condiciones adversas. Este trabajo es la primera aproximación al estudio de las modificaciones que pueden sufrir las poblaciones proteasomales de células vegetales en cultivo sometidas a diferentes condiciones de estrés.

Referencias bibliográficas

Ahmed, E.K., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., *et al.* 2010. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell.* 9: 252-272.

Aiken, C.T., Kaake, R.M., Wang, X., Huang, L. 2011. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & Cellular Proteomics.* 10: 1-11.

Al-Whaibi M.H. 2010. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University (Science).* 23(2): 139-150.

Arrigo, A.P. 1998. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *The Journal of Biological Chemistry.* 379(1): 19-26.

Babbitt, S.E., Kiss, A., Deffenbaugh, A.E., *et al.* 2005. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell.* 121(4): 553-565.

Baugh, J.M., Viktorova, E.G., Pilipenko, E.V. 2009. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *Journal of Molecular Biology.* 386: 814-827.

Belknap, W.R., Garbarino, J. E. 1996. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends in Plant Science.* 1(10): 331-335.

Book, A.J., Gladman, N.P., Lee, S., *et al.* 2010. Affinity purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome reveals a diverse array of plant proteolytic complexes. *J. Biol. Chem.* 285: 25554-25569.

Bota, D.A., VanRemmen, H., Davies, K.J.A. 2002. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Letters.* 532: 103-106.

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: 248-254.

Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., *et al.* 2000. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 97(19): 10348-10353.

Cascio, P., Call, M., Petre, B., *et al.* 2002. Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *The EMBO Journal.* 21(11): 2636-2645.

Chang, T., Lin, S., Wu, S., Hong, C. 2013. Regulation of ubiquitin and 26S proteasome mediated by phenolic compounds during oxidative stress. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 24: 1970-1981.

- Chen, R., Sun, S., Wang, C., *et al.* 2009. The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Research*. 19: 1377-1387.
- Chora, S., McDonagh, B., Sheehan, D., *et al.* 2008. Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative stress in *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*. 66: 95-97.
- Connell, P., Ballinger, Ca., Jiang, J., *et al.* 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Natural Cell Biology*. 3: 93-96.
- Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H., Schiestl, R.H. 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 93: 5116-5121.
- Davies, K.J.A. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 83: 301-310.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. 109: 212-228.
- Díaz-Villanueva, J.F., Díaz-Molina, R., García-González, V. 2015. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Internacional Journal of Molecular Science*. 16: 17193-17230.
- Díaz-Acosta, A.E., Membrillo-Hernández, J. 2006. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 9(1): 34-44.
- Dudek, E.J., Shang, F., Valverde, P., *et al.* 2005. A selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified: relevance to protein precipitation diseases. *The FASEB Journal*. 19: 1707-1709.
- Farout, L., Friguet, B. 2006. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8(1 & 2): 205-216.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews in Physiology*. 61: 243-282.
- Ferreira-Silva, S.L., Voigt, E.L., Silva, E.N., *et al.* 2011. High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stresses cashew plants. *Environmental and Experimental Botany*. 74: 162-170.
- Ferrington, D.A., Sun, H., Murray, K.K., *et al.* Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20S proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 937-943.
- Finley, D., Chau, V. 1991. Ubiquitination. *Annual Review of Cell Biology*. 7: 25-69.
- Finley, D. 2012. Ubiquitin chained and crosslinked. *Nature Cell Biology*. 4: E121-E123.
- Flick, K., Kaiser, P. 2012. Protein degradation and the stress response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 23: 515-522.
- Freeman, M.L., Spitz, D.R., Meredith, M.J. 1990. Does heat shock enhance oxidative stress? Studies with ferrous and ferric iron. *Radiation research*. 124: 288-293.

Gentier, R.J., van Leeuwen, F.W. 2015. Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 8(47): 1-12.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley D. 1998. The Regulatory Particle of the *Saccharomyces cerevisiae* Proteasome. *Molecular and Cellular Biology*. 18(6): 3149-3162.

Gomes, A.V. 2013. Genetics of Proteasome Diseases. *Scientifica*. 30 p.

Grune, T., Jung, T., Merker, K., Davies, K.J.A. 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid and aggresomes during oxidative stress. *Aging and disease*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36: 2519-2530.

Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K.J.A. 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305: 709-718.

Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal*. 11: 526-534.

Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142: 231-255.

Hendil, K.B., Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K. 2002. 26S proteasomes function as stable entities. *Journal of Molecular Biology*. 315(4): 627-636.

Hossain, M.A., Mostofa, M.G., Fujita, M. 2013. Heat-shock positively modulates oxidative protection of salt and drought-stressed mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. *Journal of Plant Science & Molecular Breeding*. 14 p.

Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Ros, J., *et al.* 2008. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *Proteómica*. 2: 51-58.

Iwanczyk, J., Sadre-Bazzaz, K., Ferrell, K., *et al.* 2006. Structure of the Blm 10-20 S proteasome complex by cryo-electron microscopy; insights into the mechanism of activation of mature yeast proteasomes. *Journal of Molecular Biology*. 363: 648-659.

Jentsch, S. 1992. The ubiquitin-conjugation system. *Annual Review of Genetics*. 26: 179-207.

Jahngen-Hodge, J., Obin, M., Gong, X., *et al.* 1997. Regulation of ubiquitin conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 28218-28226.

Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *Journal of Cell Biology*. 143: 1883-1898.

Jung, T., Grune, T. 2012. Structure of the Proteasome. Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University, Jena, Germany. 39 p.

- Jung, T., Hohn, A., Grune, T. 2014. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II – protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biology*. 2: 99-104.
- Kaake, R. M., Milenkovic, T., Przulj, N., *et al.* 2010. Characterization of cell cycle specific protein interaction networks of the yeast 26S proteasome complex by the QTAX strategy. *Journal of Proteome Research*. 9: 2016-2029.
- Kohler, A., Bajorek, M., Groll, M., *et al.* 2001. The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie*. 83: 325-332.
- Kriegenburg, F., Poulsen, E.G., Koch, A., *et al.* 2011. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15(8): 2265-2299.
- Kurepa, J., Smalle, J.A. 2008. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*. 90: 324-335.
- Kurepa, J., Toh-e, A., Smalle, J.A. 2008. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *The Plant Journal*. 53: 102-114.
- Kurepa, J., Wang, S., Li, Y., *et al.* 2009. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 4(10): 924-927.
- Kwok, S.F., Staub, J.M., Deng, X. 1999. Characterization of two subunits of *Arabidopsis* 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J. Mol. Biol.* 285: 85-95.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., *et al.* 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 482: 186-193.
- Lee, B.H., Lee, M.J., Park, S., *et al.* 2010. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 467: 179-184.
- Lee, K., Marshall, R.S., Slivicke, L.M., *et al.* 2012. Genetic analyses of the *Arabidopsis* 26S proteasome regulatory particle reveal its importance during light stress and a specific role for the N-terminus of RPT2 in development. *Plant Signaling & Behavior*. 7(8): 973-978.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., *et al.* 2002. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Molecular Cell*. 10: 495-507.
- Lehmann, A., Niewianda, A., Jechow, K., *et al.* 2010. Ecm29 fulfils quality control functions in proteasome assembly. *Molecular Cell*. 38: 879-888.
- Li, B., Fu, J., Chen, P., *et al.* 2015. The nuclear factor (Erythroid-derived-2)-like 2 and proteasome maturation protein axis mediates Bortezomib resistance in multiple myeloma. *Journal of Biological Chemistry in Press*. 29 p.
- Lin, G., Hu, G., Tsu, C., *et al.* 2006. *Mycobacterium tuberculosis* *prcBA* genes encode a gated proteasome with broad oligopeptide specificity. *Molecular Microbiology*. 59(5): 1405-1416.

- López, A.D., Tar, K., Krugel, U., *et al.* 2011. Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Blm10. *Molecular Biology of the Cell*. 22: 528-540.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luders, J., Demand, J., Hohfeld, J. 2000. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 4613-4617.
- McCarthy, M.K., Weinberg, J.B. 2015. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Frontiers in Microbiology*. 6(21): 1-16.
- McDonagh, B., Sheehan, D. 2006. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Aquatic Toxicology*. 79: 325-333.
- Medicherla, B., Goldberg, A.L. 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *Journal of Cell Biology*. 182: 663-673.
- Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Signaling & Development*. 190: 1157-1195.
- Morrow, J.K., Lin, H.K., Sun, S.C., Zhang, S. 2015. Targeting ubiquitination for cancer therapies. *Future Medicinal Chemistry*. 7(17): 2333-2350.
- Moustaka, J., Moustakas, M. 2014. Photoprotective mechanism of the non-target organism *Arabidopsis thaliana* to paraquat exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 111: 1-6.
- Nakajima, Y., Suzuki, S. 2013. Environmental stresses induce misfolded protein aggregation in plant cells in a microtubule-dependent manner. *International Journal of Molecular Science*. 14: 7771-7783.
- Nystrom, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal*. 24: 1311-1317.
- Obin, M., Shang, F., Gong, X., *et al.* 1998. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *The FASEB Journal*. 12: 561-569.
- Pappolla, M.A., Sos, M., Omar R.A., Sambamurti, K. 1996. The heat shock/oxidative stress connection. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 28: 21-34.
- Pegoraro, G., Voss, Ty.C., Martin, S., *et al.* 2012. Identification of mammalian protein quality control factors by high-throughput cellular imaging. *PLoS One*. 7(2): 1-13.
- Peng, Z., Jeffrey, S., Serino, G., *et al.* 2001. The cellular level of PR500, a protein complex related to the 19S regulatory particle of the proteasome, is regulated in response to stresses in plants. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 383-392.

- Pick, E., Berman, T.S. 2013. Formation of alternative proteasomes: Same lady, different cap? FEBS Letters. 587: 389-393.
- Pickart, C.M., Cohen, R.E. 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. Nat Rev Mol Cell Biol. 5(3):177-187.
- Rechsteiner, M. 2013. Proteasomes, Overview. Protein/Enzyme Structure Function and Degradation. 3: 464-468.
- Rikhvanov, E.G., Gamburg, K.Z., Varakina, N.N., *et al.* 2007. Nuclear – mitochondrial cross – talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. The Plant Journal. 52: 763-778.
- Rocha, M. 2013. El sistema ubiquitina/proteasome en la interacción planta-patógeno. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 16(2): 121-131.
- Saeki, Y., Tanaka, K. En: Dohmen, R.J., Scheffner, M. 2012. Ubiquitin Family Modifiers and the Proteasome: Reviews and Protocols. Methods in Molecular Biology. Chapter 22. 832: 315-337.
- Sako, K., Maki, Y., Kanai, T., *et al.* 2012. Arabidopsis RPT2a, 19S proteasome subunit, regulates gene silencing via DNA methylation. PLoS ONE. 7(5): 1-8.
- Schmidt, M., Haas, W., Crosas, B., *et al.* 2005. The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. Nature Structural & Molecular Biology. 12(4): 294-303.
- Schreiber, A., Peter, M. 2014. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. Biochimica et Biophysica Acta. 1843: 163-181.
- Schwartz, A.L., Ciechanover, A. 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. Annu Rev Med. 50: 57-74.
- Shang, F., Gong, X., Taylor, A. 1997. Activity of ubiquitin dependent pathway in response to oxidative stress: ubiquitin activating enzyme (E1) is transiently upregulated. Journal of Biological Chemistry. 272: 23086-23093.
- Shang, F., Taylor, A. 1995. Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells. Biochemical Journal. 307: 297-303.
- Shang, F., Taylor, A. 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine. 51: 5-16.
- Shang, F., Dudek, E., Liu, Q., *et al.* 2006. Protein quality control by the ubiquitin proteolytic pathway: roles in resistance to oxidative stress and disease. Israel Journal of Chemistry. 46: 145-158.
- Shang, F., Nowell, T.R. Jr., Taylor, A. 2001. Removal of oxidatively damaged proteins from lens cells by the ubiquitin-proteasome pathway. Experimental Eye Research. 73: 229-238.

- Shibatani, T., Carlson, E.J., Larabee, F., *et al.* 2006. Global Organization and Function of Mammalian Cytosolic Proteasome Pools: Implications for PA28 and 19S Regulatory Complexes. *Molecular Biology of the Cell*. 17: 4962-4971.
- Shrieve, D.C., Li, G.C., Astromoff, A., Harris, J. W. 1986. Cellular glutathione, thermal sensitivity, and thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts and their heat resistant variants. *Cancer Research*. 46: 1684-1687.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., *et al.* 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 311-318.
- Sonoda, Y., Sako, K., Maki, Y., *et al.* 2009. Regulation of leaf organ size by the *Arabidopsis* RPT2a 19S proteasome subunit. *The Plant Journal*. 60: 68-78.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R., Ovchinnikov, L.P. 2009. Proteasome System of Protein Degradation and Processing. *Biochemistry (Moscow)*. 74(13): 1411-1442.
- Verbeke, P., Fonager, J., Clark, B.F.C., Rattan, S.I.S. 2001. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biology International*. 25(9): 845-857.
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K. 2012. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(2): 115-158.
- Vierstra, R.D. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology*. 32: 275-302.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, S.M., Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*. 61: 199-223.
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., Huang, L. 2010. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Science Signaling*. 3(151): 1-10.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(3): 169-178.
- Wittig, I., Braun, H-P., Schagger, H. Blue Native PAGE. *Nature Protocols*. 1(1): 418-428.
- Wolf, D.H., Hilt, W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta*. 1695(1-3): 19-31.
- Wong, C.M., Marcocci, L., Liu, L., *et al.* Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal*. 12(3): 393-404.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., *et al.* 2004. Purification of the *Arabidopsis* 26S proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(8): 6401-6413.

Yoshinaga, K., Arimura, S., Niwa, Y., *et al.* 2005. Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*. 96: 337-342.

Zamudio, J.M., Peña, M.T., Riesgo, J.F. 2012. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(2): 133-141.

Zhang, X., Zhou, J., Fernandes, A.F., *et al.* 2008. The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49: 3622-3630.

Zong, C., Young, G.W., Wang, Y., *et al.* 2008. Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics*. 8: 5025-5037.

