



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Análisis de la estequiometría de la ubiquitinación en líneas celulares de  
cáncer cérvico-uterino”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
RAMIRO ALONSO BASTIDA

TUTOR PRINCIPAL

DR. SERGIO ENCARNACIÓN GUEVARA,  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. DIEGO CORTEZ QUEZADA  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

DR. GERARDO CORZO BURGUETE  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos formales**

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la oportunidad de cursar estudios de maestría en ciencias bioquímicas en esta gran institución.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt) por la beca que me fue otorgada y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto IN207519, ya que parte de este Proyecto fue realizado con su apoyo.

Agradezco también a mi tutor principal el Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara por la asesoría, los consejos, el apoyo y soporte para la realización de este proyecto.

Agradezco a los Doctores Diego Cortez Quezada y Gerardo Corzo Burguete por sus comentarios y asesoría que me brindaron durante el desarrollo de esta maestría.

Agradezco al Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM) y sus miembros por la infraestructura y el ambiente científico para desarrollar investigación científica de muy alta calidad.

Muchas gracias.

## Dedicatoria

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Marco teórico</b> .....	5
<b>2.1 El cáncer cérvico-uterino</b> .....	5
<b>2.2 El virus del papiloma humano</b> .....	5
<b>2.3 Las modificaciones postraduccionales</b> .....	7
<b>2.4 Acetilación en residuos de lisina</b> .....	7
<b>2.5 Enzimas que controlan la acetilación</b> .....	8
2.5.1 <i>Acetiltransferasas</i> .....	8
2.5.2 <i>Desacetilasas de lisina</i> .....	8
2.5.3 <i>Acetilación no enzimática</i> .....	9
<b>2.6 Ubiquitinación</b> .....	10
2.6.1 <i>Ubiquitina</i> .....	10
2.6.2 <i>Ubiquitinasas</i> .....	11
2.6.3 <i>Código de Ubiquitina</i> .....	11
2.6.4 <i>Desubiquitinasas</i> .....	12
2.6.5 <i>USP</i> .....	12
2.6.6 <i>USP2</i> .....	12
<b>2.7 El proteasoma</b> .....	13
2.7.1 <i>Inhibidores de proteasoma</i> .....	14
2.7.2 <i>MG132</i> .....	14
<b>2.8 Antecedentes para el estudio de la ubiquitinación</b> .....	15
<b>2.9 El proteoma</b> .....	15
<b>2.10 La proteómica</b> .....	16
<b>2.11 La espectrometría de masas</b> .....	16
2.11.1 <i>Proteómica por shotgun</i> .....	17
2.11.2 <i>Uso de isotopos en espectrometría de masas</i> .....	17
2.11.3 <i>Análisis de datos en espectrometría de masas</i> .....	18
<b>2.12 El análisis multivariante</b> .....	18
2.12.1 <i>Análisis de componentes principales</i> .....	19

<b>3. Justificación.</b> .....	20
<b>4. Hipótesis</b> .....	20
<b>5. Objetivos</b> .....	20
<b>6. Metodología</b> .....	21
<b>6.1 Cultivo de células.</b> .....	21
<b>6.2 Extracción de proteínas.</b> .....	21
<b>6.3 Acetilación química y Desubiquitinación.</b> .....	22
<b>6.4 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.</b> .....	23
<b>6.5 Identificación/cuantificación de péptidos/proteínas y análisis bioinformático.</b> .....	23
<b>7. Resultados</b> .....	25
<b>8. Discusión de resultados.</b> .....	42
<b>9. Conclusiones.</b> .....	48
<b>10. Perspectivas.</b> .....	49
<b>Bibliografía.</b> .....	50
<b>Anexos.</b> .....	56

## Resumen.

El cáncer es un grupo de enfermedades con un alto nivel de complejidad, lo que significa que es necesario conocer más a fondo los detalles para llegar a una posible solución. A nivel mundial el cáncer de cérvico-uterino es la cuarta causa de muerte en mujeres. Un enfoque es a través de la proteómica, que nos permite analizar todas las proteínas expresadas en una célula en un momento dado. Las modificaciones postraduccionales (PTM por sus siglas en inglés) de las proteínas, como la ubiquitinación, son una forma de aumentar la complejidad y la variedad de funciones de sus proteínas objetivo. En consecuencia, es posible encontrar diferencias entre las proteínas de una célula sana con respecto a una cancerosa mediante el análisis de PTM. El análisis de estequiometría es un enfoque emergente para medir la abundancia fraccional de PTM. El objetivo de este proyecto es conocer las diferencias en la estequiometría de ubiquitinación en las células cancerosas con respecto a las células sanas.

Se utilizaron líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (HeLa y SiHa), endometrial (C33A) y una línea de control sin cáncer (HaCaT). Se utilizó un inhibidor de proteasoma, MG132, para mantener la mayor cantidad de proteínas ubiquitinadas. Siguiendo nuestra experiencia exitosa anteriormente en el análisis estequiométrico de la acetilación de lisina, diseñamos una estrategia de cuantificación para el análisis estequiométrico de la ubiquitinación. Posteriormente, por cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas fue posible identificar estas proteínas.

Identificamos 1621 proteínas de las cuales 333 proteínas ubiquitinadas fueron detectadas. Los péptidos tenían una estequiometría que oscilaba entre 0,25 y 100%. Analizando sólo proteínas ubiquitinadas de líneas celulares tratadas con MG132, realizamos un análisis de patrones de expresión y ontología para caracterizar las relaciones de estas proteínas, lo que nos permite saber más sobre los procesos en los que está presente la ubiquitinación, como la homeostasis redox y la regulación de las vías de señalización apoptótica.

Con nuestro enfoque, pudimos determinar la estequiometría de una modificación, como la ubiquitinación, que nos permite conocer más acerca de sus proteínas blanco y sus funciones en diferentes vías, que desempeña funciones vitales en la fisiología celular y la homeostasis de proteínas en células cancerosas y sanas. Los resultados de este trabajo contribuirán a abrir nuevas líneas de investigación sobre ubiquitinación en nuevos casos de estudio.

## Abstract.

Cancer is a group of diseases with a high level of complexity, which means that it is necessary to know more fully the details of this in order to reach a possible solution. Worldwide Cervical-uterine cancer is the fourth leading cause of death in women. One approach is through proteomics, which let us analyze all proteins expressed in a cell at a given time. Post-translational modifications (PTMs) of proteins, such as ubiquitination, are a way to increase the complexity and variety of functions of their proteins target. In consequence it is possible to find differences between the proteins of a healthy cell with respect to a cancerous one by analyzing PTMs. Stoichiometry analysis is an emerging approach to measure the fractional abundance of PTMs. The objective of this project is to know the differences in the stoichiometry of ubiquitination in cancer cells with respect to healthy cells.

Cervical cancer (HeLa and SiHa), endometrial (C33A) cell lines and a non-cancer control line (HaCaT) were used. A proteasome inhibitor, MG132, was utilized to maintain the highest amount of ubiquitinated proteins. Following our previously successful experience in stoichiometry analysis of lysine acetylation, we designed a quantification strategy for stoichiometry analysis of ubiquitination. Subsequently by liquid chromatography coupled to mass spectrometer was possible to identify these proteins.

We identified 1621 proteins of which 333 ubiquitinated proteins were detected. The peptides had a stoichiometry ranging from 0.25 to 100%. Analyzing only ubiquitinated proteins from cell lines treated with MG132, we perform an analysis of expression patterns and ontology to characterize these proteins, which let us know more about processes where ubiquitination is present, such as redox homeostasis and regulation of apoptotic signaling pathways.

With our approach we were able to determine the stoichiometry of a modification such as ubiquitination, which let us know more about its targets and their roles in different pathways, which plays vital roles in cellular physiology and protein homeostasis in cancerous and healthy cells. The results of this work will contribute to open new investigation lines about ubiquitination in new study cases.

## 1. Introducción.

Las modificaciones postraduccionales (PTMs por sus siglas en inglés) de proteínas son uno de los principales mecanismos que utiliza la célula para incrementar el número de especies de proteínas y su diversidad de funciones sin incrementar la cantidad de secuencias primarias de estas. Se ha descrito que existen más de 200 tipos de PTMs, con implicaciones para la funcionalidad de sus proteínas blanco. Entre la amplia distribución de PTMs, la fosforilación ha sido la más estudiada y ha sido implicada en la regulación de casi todos los procesos celulares. En un grado menor otras PTMs como la glicosilación, acilación y ubiquitinación, también han sido estudiadas y algunos de sus papeles se han dilucidado. La mayoría de estas modificaciones están involucradas en el funcionamiento óptimo de la célula. Una gran variedad de residuos de aminoácidos son susceptibles de ser modificados postraduccionamente. Particularmente, el grupo épsilon amino de la cadena lateral de los residuos de lisina es blanco de muchas de estas modificaciones, entre ellas la acetilación y la ubiquitinación.

La acetilación en el grupo épsilon amino de los residuos de lisina, fue descubierto como una PTM de histonas hace más de 50 años<sup>1</sup>. La acetilación de histonas ha sido extensamente estudiada desde su descubrimiento, y su papel ha sido asociado con el re-modelamiento de la cromatina y la activación de la transcripción. De manera inversa, la desacetilación permite una interacción con el DNA más estrecha, lo cual conlleva a una cromatina más condensada que previene el acceso de la maquinaria de transcripción. En los últimos treinta años, la información de la presencia de la acetilación en residuos de lisina se ha expandido de histonas a un gran número de proteínas, y esta que aún está en crecimiento, involucrando proteínas presentes en casi todos los procesos celulares.

La acetilación en residuos de lisina es una PTM reversible típicamente controlada por los siguientes dos grupos de enzimas: acetiltransferasas de lisina (KATs por sus siglas en inglés) y las deacetilasas de lisina (KDACs por sus siglas en inglés)<sup>2</sup>. El proceso enzimático de acetilación involucra la transferencia de un grupo acetilo del Acetil-coenzima A al grupo épsilon amino en la cadena lateral de los residuos de lisina. De manera inversa, la desacetilación es realizada por dos grupos de KDACs uno de ellos utiliza Zn<sup>2+</sup> como cofactor (HDAC1-11) y el grupo que se conoce como sirtuinas, que son dependientes de NAD<sup>+</sup>. La incorporación del grupo acetilo neutraliza la carga positiva de este residuo, cambia la estructura del aminoácido y también bloquea otras modificaciones que podrían ocurrir en el mismo residuo<sup>3</sup>.

La dinámica de la abundancia de proteínas en la célula está en flujo constante. En gran medida la estabilidad de las proteínas depende de las vías de degradación. Los dos sistemas fundamentales de degradación de las proteínas son el lisosoma y el ubiquitina-proteasoma (SUP). Este último es el sistema primario de degradación que lleva a cabo la degradación de proteínas reguladoras de corta vida y la remoción

de proteínas solubles. La señal de reconocimiento para la degradación proteasomal es una cadena de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos de longitud que se une covalentemente a los residuos de lisina en las proteínas sustrato. La formación de un enlace entre el grupo epsilon amino de las lisinas del sustrato y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de la ubiquitina<sup>4</sup>. Este es un proceso dependiente de ATP y es realizado por una cadena enzimática que involucra tres distintas clases de enzimas: Enzimas activadoras, enzimas conjugadoras y las ligasas de ubiquitina. La misma reacción une además moléculas adicionales que ubiquitan a la ubiquitina primaria vía residuos de lisina, creando una cadena de ubiquitina<sup>5</sup>.

Una cadena de al menos cuatro ubiquitinas ligadas mediante la lisina 48 es el motivo de reconocimiento clásico para la degradación proteasomal<sup>6</sup>, aunque cadenas con otro tipo de unión son ahora reconocidas como motivos de orientación fisiológica, y para algunos sustratos modificaciones de múltiple monoubiquitina son suficientes para mandar al proteasoma<sup>7</sup>. El proteasoma 26S consiste de dos entidades: una estructura cilíndrica central con actividad hidrolítica de péptidos (partícula núcleo o proteasoma 20S) y una partícula regulatoria (también conocida como la tapa regulatoria o la partícula 19S), requerida para el reconocimiento, remoción de la cadena de ubiquitina y el desdoblamiento dependiente de ATP<sup>4</sup>.

Sin embargo, se ha descubierto que la ubiquitinación tiene otras funciones además de la degradación, y que el fenómeno en su conjunto es más complejo, controla casi cada proceso en la célula, incluyendo degradación de proteínas, reparación de ADN, endocitosis, autofagia, transcripción, inmunidad e inflamación. La especificidad de la señalización por ubiquitina es llevada a cabo por señales de conjugación alternativa (monoubiquitina y cadenas de ubiquitina) e interacciona con proteínas de unión a ubiquitina (conocidas como receptores de ubiquitina) que decodifican las señales de ubiquitinación en cascadas bioquímicas en la célula<sup>5</sup>.

## 2. Marco teórico.

### 2.1 El cáncer cérvico-uterino.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte en mujeres con aproximadamente 570000 nuevos casos y cerca de 312000 muertes en 2018<sup>8</sup>. El CaCu es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial. En países con un alto índice de desarrollo humano ocupa el sexto lugar, mientras que en países en vías de desarrollo es el segundo padecimiento más frecuente en la población femenina. Por ende la incidencia de esta enfermedad esta relacionada con la infraestructura médica de los diferentes países para la detección y el tratamiento de la misma.

La mayor proporción de los casos de CaCu están asociados al Virus del Papiloma Humano (HPV por sus siglas en inglés)<sup>9</sup>. La infección por HPV es una de las más comunes y contagiosas a nivel mundial. La mayoría de las infecciones por HPV son transitorias, con una tasa de persistencia (más de dos años) de menos del 10% para infecciones por genotipos de HPV de alto riesgo<sup>10</sup>.

Las cepas oncogénicas de HPV de alto riesgo tienen la mayor contribución a la aparición de lesiones precancerosas y cancerosas<sup>11</sup>. Las tendencias de edad en la adquisición y persistencia del HPV cervical han revelado que, con la edad, la incidencia de nuevas infecciones disminuye, mientras que la persistencia aumenta, lo que enfatiza la utilidad de la detección del HPV en mujeres mayores. Esto puede deberse a la senescencia inmune relacionada con la edad que afecta el aclaramiento del HPV, la reducción del tamaño de las uniones escamocolumnares y la sustitución de la mucosa cervical por epitelio escamoso estratificado atrófico<sup>12</sup>.

### 2.2 El virus del papiloma humano.

Los virus del papiloma humano son un pequeño grupo de virus no envueltos y con un diámetro aproximado de 52-55 nm. Estos virus pertenecen a la familia Papillomaviridae, la cual es muy heterogénea y tejido específica<sup>13</sup>. Las partículas virales consisten de un genoma de forma circular de DNA de doble cadena, que abarca ocho marcos de lectura abiertos, así como una cápside icosaédrica no envuelta, la cual está compuesta por 72 capsómeros pentaméricos<sup>14</sup>.

Se ha descrito que existen más de 200 tipos de HPV o genotipos, de los cuales 40 pueden infectar mucosas (epitelios “húmedos”) como es el epitelio del tracto genital. Existe la suficiente evidencia biológica y epidemiológica de que 14 de estos genotipos (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) son carcinogénicos para humanos. Se le ha clasificado como de “alto riesgo” u oncogénicos<sup>15</sup>. En tanto, otros genotipos que no tienen la capacidad de transformar

a la célula son considerados de “bajo riesgo”, de estos últimos los genotipos 6 y 11 están relacionados con el desarrollo de verrugas anogenitales (condilomas acuminados). A pesar de la gran variedad de genotipos de HPV de alto riesgo, el 70% del total de los casos de CaCu es producido por los HPV 16 y 18<sup>16</sup>.

El HPV es adquirido mediante transmisión sexual a través del contacto piel con piel. Mediante pequeñas lesiones en el epitelio es como el HPV ingresa a las capas basales de este tejido, donde infecta a las células. La mayoría de las infecciones son transitorias y son erradicadas en aproximadamente ocho meses, especialmente en mujeres menores de treinta años. La carga viral es usualmente reducida a niveles indetectables después de dos años<sup>10</sup>.

A pesar del hecho de que HPV es responsable del desarrollo de CaCu, las infecciones por este virus son usualmente asintomáticas, irreconocibles y subestimadas. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) resalta el hecho de que la mayoría de los individuos sexualmente activos se infectan con HPV al menos una vez en su vida<sup>17</sup>, usualmente sin estar conscientes y sin presentar algún síntoma. La infección por HPV es considerada la enfermedad de transmisión sexual más común tanto entre hombres como mujeres. Además, el CaCu asociado a HPV es uno de los tipos de cáncer más prevalentes en los últimos años y la tercera causa principal de muerte entre adultos relacionada con cáncer<sup>17</sup>.

Los HPV se caracterizan por la presencia de tres regiones codificantes funcionales en su genoma: La región E que codifica la función viral temprana, la región L que es responsable de la función viral tardía y la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) que está situada entre las regiones descritas previamente. La densidad de un virión intacto es de aproximadamente 1.34 g/ml en cloruro de cesio y tiene un coeficiente de sedimentación de 300<sup>18</sup>.

HPV infecta las capas basales de epitelio escamoso. Los productos génicos E6 y E7 del genoma viral interactúan e inhiben los supresores tumorales p53 y retinoblastoma, respectivamente<sup>19</sup>. Estas proteínas son importantes para el control del ciclo celular y la apoptosis, y la inactivación de estas proteínas que ocurre en infecciones de HPV de alto riesgo, pueden inducir a transformaciones malignas.

La oncoproteína E6 de los HPV de alto riesgo interactúa con la ubiquitina ligasa E6AP y con p53. Cuando hay daño al DNA, las lisinas de p53 son acetiladas por distintas acetiltransferasas como p300/CBP, PCAF, Tip60, MOF y MOZ para evitar la degradación vía proteasoma<sup>20</sup>. La interacción entre E6, E6AP y p53 provoca que p53 sea marcada con ubiquitina y se degrade, evitando así la apoptosis de la célula infectada con HPV<sup>21</sup>.

Este es solo uno de los casos en los que las modificaciones post-traduccionales participan para la regulación de los distintos procesos celulares, así como la interrelación de las mismas para el funcionamiento correcto de la célula.

### 2.3 Las modificaciones postraduccionales.

Las PTM pueden ser tan variadas como la formación de puentes disulfuro, cortes en la proteína precursora para hacerla funcional o la adición o remoción de moléculas de bajo peso molecular, lo cual puede llevar a modificaciones como la fosforilación, biotinilación, amidación, cisteinilación, glicosilación, formilación, metilación, acetilación, ubiquitinación, entre muchas otras.

Se han descrito más de 200 tipos diferentes de PTM<sup>22</sup> y estas juegan un papel muy importante en la interacción de ligandos con proteínas, en la regulación del plegamiento de proteínas, la regulación de vías metabólicas, la transducción de señales, entre muchos otros procesos en los que participan.

El porcentaje de ocupación de una PTM en un sitio específico o la fracción de ocupación es conocida como estequiometría<sup>23</sup>. Los primeros estudios de PTM tenían una baja sensibilidad, por lo que no era posible conocer su estequiometría a menos que esta fuera muy alta. Para contender con estas limitaciones se utilizan proteínas que son modificadas en sitios específicos con algún mimético de la PTM, sin embargo estas técnicas usualmente son irreversibles e impiden la descripción correcta de la función de la modificación.

El desarrollo de nuevas técnicas de fragmentación para la identificación de péptidos mediante espectrometría de masas ha incrementado la capacidad para detectar la estequiometría de las PTM, con lo cual se ha logrado identificar ocupación de hasta 0.1% en distintas proteínas. El conocimiento de la estequiometría de las PTM es de gran relevancia para la interpretación de la afectación en la proteína que provoca la modificación.

Sin embargo aún hay mucho de las PTM que no se conoce y por eso es necesario ampliar su estudio así como las técnicas que se utilizan actualmente para el mismo, por lo que en este trabajo se aborda una nueva propuesta para el estudio de la ubiquitinación valiéndose de algunas propiedades que comparte con la acetilación.

### 2.4 Acetilación en residuos de lisina.

La acetilación es una modificación postraducciona que ocurre en el grupo épsilon amino de los residuos de lisina de las proteínas y está presente en todos los reinos de la vida. Mediante esta PTM se neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina a pH fisiológico, lo que altera las propiedades del residuo con relación a la actividad de la proteína diana. En eucariotes la transferencia del grupo acetilo puede ser realizada mediante dos vías, una enzimática por la acción de enzimas acetil transferasas y la otra manera es mediante la vía química. El donador del grupo

acetilo en ambos casos es el Acetil-CoA. La remoción de esta modificación es realizada exclusivamente por enzimas desacetilasas.

Los residuos de lisina son blancos de distintas PTMs por lo que en muchos casos la ocupación de estos residuos es resultado de una competición entre las diferentes PTMs. Existen estudios que han reportado que la acetilación y la ubiquitinación comparten aproximadamente el 30% de los residuos de lisina<sup>24</sup>. La metilación, que puede ser desde mono hasta trimetilación, es otra PTM que también puede competir con la acetilación por los residuos de lisina<sup>25</sup>. Otras PTM como Sumoilacion, succinilación, hidroxilacion, crotonilación, entre otras, también tienen como blancos los residuos de lisina dentro de las proteínas<sup>26</sup>. La gran variedad de modificaciones que puede ocurrir en estos residuos ayudan a la célula a tomar la decisión correcta acerca del destino de la proteína blanco.

## 2.5 Enzimas que controlan la acetilación

### *2.5.1 Acetiltransferasas*

La acetilación de histonas y la participación de las acetiltransferasas de lisina (KAT por sus siglas en inglés) fue descrita en 1964 por Allfrey y colaboradores<sup>27</sup>. Las KATs son un tipo de enzima que transfiere un grupo acetilo proveniente de acetil coenzima A al grupo épsilon amino de los residuos de lisina. En la actualidad se conoce la existencia de más de 30 KATs. Las KAT usualmente son proteínas que además de su sitio de transferencia del grupo acetilo poseen otro de interacción con otras proteínas, lo que otorga a estas la especificidad y diversidad de sustratos<sup>28</sup>.

Las KATs pueden ser agrupadas en tres familias principales: El primer grupo es la familia GNAT (GCN5 (general control non-derepressible 5)-related acetyltransferase), el segundo grupo es la familia MYST (monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ), Tip60, Sas2, Ybf2/Sas3) y la tercer familia es la p300/CREB-binding protein (CBP)<sup>29</sup>

A pesar de que las funciones biológicas y sustratos de estas enzimas aún esperan ser definidos, algunas KATs han sido implicadas en diferentes procesos patológicos como el desarrollo de cáncer<sup>3</sup> y Alzheimer<sup>30</sup> entre otros.

### *2.5.2 Desacetilasas de lisina.*

Las enzimas que controlan la desacetilación de los residuos de lisina son conocidas como desacetilasas de lisina (KDAC por sus siglas en inglés). En humano se han descrito 18 diferentes KDAC, las cuales están divididas en cuatro grupos según su homología con proteínas desacetilasas de levadura. Las clases I, II y IV, son KDAC

dependientes de  $Zn^{2+}$ , mientras que la clase III, conocidas como Sirtuinas, utiliza a  $NAD^+$  como cofactor.

La clase I, está compuesta por cuatro miembros (HDAC1, 2, 3 y 8) los cuales son homólogos a Rpd3 de levadura. Están localizadas en el núcleo y son las HDACs más abundantes y ubicuamente expresadas<sup>31</sup>.

Las HDACs de la clase II son homólogos con Hda1 de levadura y son más grandes en tamaño que las otras dos clases. Basado en la homología de su secuencia y la organización de su dominio, estas pueden ser subdivididas. La clase IIa (HDACs 4,5,7 y 9) contienen un dominio catalítico desacetilasa C-terminal altamente conservado homólogo con Hda1, pero tienen un dominio N-terminal disímil al presente en HDACs de otras clases. La clase IIb (HDACs 6 y 10) está caracterizada por tener dos dominios de desacetilasa. Las HDACs de la clase II pueden cambiar su localización entre núcleo y citoplasma y su expresión es tejido específica<sup>32</sup>.

A diferencia de otras HDACs, HDAC6 se localiza principalmente en el citoplasma y posee una especificidad por sustrato única por proteínas no histonas como  $\alpha$ -tubulin (un heterodimero de los microtubulos), heat shock protein 90 (HSP90; una chaperona molecular) y cortactina (una proteína de unión a los filamentos de actina)<sup>33-35</sup>. A pesar de eso, HDAC6 regula múltiples procesos biológicos como migración celular, formación de sinapsis inmunológica, y degradación de proteínas mal plegadas<sup>36</sup>.

La clase III, también llamadas Sirtuinas (SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), son una familia de lisinas desacetilasas dependientes de  $NAD^+$  que regulan procesos claves de procesos biológicos de mamíferos, incluyendo metabolismo. Tres sirtuinas de mamífero (SIRT3, SIRT4 y SIRT5) se localizan mayormente o exclusivamente en la matriz mitocondrial. SIRT3 representa la mayor actividad de desacetilasa mitocondrial. La deficiencia de SIRT3 en el ratón resulta en un incremento dramático de la acetilación de proteínas mitocondriales<sup>37</sup>. Lo cual conduce a múltiples defectos celulares y de organismos. Poco se conoce acerca de la función de SIRT4 y SIRT5, las cuales, a diferencia de SIRT3, no impacta en la acetilación de proteínas mitocondriales<sup>37</sup>. SIRT5 promueve la función del ciclo de la urea mediante la regulación de la carbamoil fosfato sintasa<sup>38</sup> y el metabolismo de purinas por medio de la urato oxidasa<sup>39</sup>.

HDAC11 es el único miembro de la clase IV y se encuentra presente tanto en el núcleo como en el citoplasma<sup>31</sup>. Comparte secuencia homóloga exclusivamente con el dominio catalítico de la clase I y II de las HDACs. HDAC11 regula la estabilidad de la proteína del factor de replicación del ADN CDT1<sup>40</sup> y la expresión de interleucina 10.

### *2.5.3 Acetilación no enzimática.*

La incorporación del grupo acetilo en residuos de lisina no solo ocurre por la vía enzimática. En bacterias se ha demostrado que la mayoría de las acetilaciones ocurren por vía no enzimática y que el principal agente alquilante es el grupo acetil-fosfato<sup>41</sup>.

En células eucariotas, la molécula de acetil-CoA se ha determinado como la responsable de la acetilación no enzimática. Los altos niveles de Acetil-CoA (0.1-1.5 mM) y el pH alcalino de la matriz mitocondrial (pH 7.9-8) favorecen la reacción de acetilación química. Estas condiciones son suficientes para que ocurra la acetilación no enzimática en residuos de lisina<sup>42</sup>.

## 2.6 Ubiquitinación.

El sistema de ubiquitinación de proteínas fue descrito por el grupo del Dr. Ciechanover<sup>43</sup>, y que los hizo merecedores de un premio Nobel. Este grupo caracterizó la función de la ubiquitina como una marca para la subsecuente degradación de las proteínas en el proteasoma, en especial para proteínas de vida media corta. Existen dos caminos para la degradación de proteínas en la célula: la vía vesicular mediada por los lisosomas y la vía citosólica mediada por la ubiquitinación. Pero esta no es la única función que cumple esta modificación, se ha descubierto que la ubiquitinación tiene otras funciones además de la degradación, controla casi cada proceso en la célula, incluyendo degradación de proteínas, reparación de ADN, endocitosis, autofagia, transcripción, inmunidad e inflamación. La especificidad de la señalización por ubiquitina es llevada a cabo por señales de conjugación alternativa (monoubiquitina y cadenas de ubiquitina) e interacciona con proteínas de unión a ubiquitina (conocidas como receptores de ubiquitina) que decodifican las señales de ubiquitinación en cascadas bioquímicas en la célula<sup>5</sup>. En la ubiquitinación en general, una molécula de ubiquitina es activada mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal, en donde existe el motivo Leu-Arg-Gly-Gly.

### 2.6.1 Ubiquitina

La ubiquitina fue descubierta en 1975 y, como su nombre lo indica, es ubicua en las células eucariotas. Es una proteína pequeña de 76 aminoácidos que forman una estructura compacta globular con una cola C-terminal que puede ser unida covalentemente a otras proteínas. La mayoría de los residuos del núcleo son rígidos, pero la vuelta  $\beta 1/\beta 2$  que contiene Leu8 presenta flexibilidad que es importante para el reconocimiento por las proteínas de unión a ubiquitina<sup>44</sup>. Esta proteína conservada evolutivamente tiene un dominio característico " $\beta$ -grasp" consistente en cuatro o cinco dominios de hoja  $\beta$ -plegada junto con un dominio  $\alpha$ -helicoidal. La ubiquitina es casi invariable desde la levadura hasta el humano. Esto

sugiere una alta presión evolutiva para conservar la estructura de la ubiquitina e implica una gran parte de la superficie de esta proteína, la cual es reconocida por dominios de unión a ubiquitina

### *2.6.2 Ubiquitinasa.*

La ubiquitinación de proteínas involucra la acción jerárquica de tres familias de enzimas de ubiquitina. Una enzima E1 debe en primer lugar activar a la ubiquitina, de una manera dependiente de ATP. La E1 forma un enlace covalente entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y un residuo de cisteína en su sitio activo.

La ubiquitina tioesterificada pasa del sitio activo de E1 al siguiente miembro de la cascada, E2 la cual es la enzima de conjugación de ubiquitina. Finalmente, la ubiquitin ligasa E3 une a ambos componentes, a la E2 unida a la ubiquitina y a la proteína blanco, promoviendo la transferencia de la ubiquitina, mediante su C-terminal, al residuo de lisina del sustrato<sup>45</sup>

Cabe destacar que en mamíferos, en la cascada de ubiquitina E1-E2-E3, solo dos miembros de la familia E1 son necesarios para marcar todas las E2 con ubiquitina, y aproximadamente 40 E2 existentes en la célula son suficientes para entregar la ubiquitina a las más de 600 E3 conocidas.

En la poliubiquitinación, se forman polímeros de ubiquitina en donde participan las lisinas de la posición 48 o de la posición 63. Sin embargo, utilizando técnicas como espectroscopía de masas se ha determinado que las lisinas de las posiciones 6, 11, 27, 29 y 33 también son susceptibles de formar enlaces isopeptídicos en diferentes porcentajes. Este tipo de ubiquitinación "atípica" parece estar involucrada en respuesta a daño al ADN, daño mitocondrial o como una segunda señal de proteólisis

### *2.6.3 Código de Ubiquitina.*

Con respecto al código de ubiquitinas, las características más importantes son su N terminal (Met1) y sus siete lisinas (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63), las cuales son los sitios de unión para el ensamblaje de cadenas. Estos residuos cubren toda la superficie de la ubiquitina y apuntan en distintas direcciones<sup>7</sup>.

La caracterización estructural de cinco tipos de cadenas revela que diferentes tipos de unión resultan en diferentes tipos de conformaciones de estas cadenas. Las cadenas de ubiquitinas pueden adoptar tanto conformaciones "compactas", donde los motivos adyacentes interaccionan entre ellos, como conformaciones "abiertas", donde no hay interacciones más que en el sitio de unión. La unión canónica de la cadena Lys48 adopta una conformación compacta. Mientras que las cadenas de unión por Met1 y Lys63 presentan conformaciones abiertas.

En conjunto, las estructuras revelan un largo arreglo de geometrías que pueden ser utilizados por colaboradores de unión para distinguir entre modificaciones. La diversidad estructural de estas forma el código de ubiquitina.

Este código puede estar compuesto por la unión de una sola ubiquitina (monoubiquitinación) o muchas moléculas de ubiquitina independientes (múltiple monoubiquitinación) a la proteína diana.

A pesar de que las cadenas de ubiquitina unidas por Lys48 han sido clásicamente estudiadas en el contexto de la degradación de proteínas, las cadenas unidas por Lys63 están implicadas en una variedad de funciones no proteolíticas. Los papeles de otros tipos de cadenas de ubiquitina no han sido estudiados en detalle pero sus posibles papeles están siendo dilucidados. Mediante espectrometría de masas se ha revelado que las siete lisinas y Met1 pueden participar en la formación de uniones ubiquitina-ubiquitina<sup>7</sup>.

#### *2.6.4 Desubiquitinadas.*

La remoción de las señales de ubiquitina es realizada por desubiquitinadas, las cuales otorgan la vasta complejidad del sistema de ubiquitina. El número de desubiquitinadas varía en los distintos organismos.

A la fecha seis familias estructuralmente distintas de desubiquitinadas han sido descritas. Estas incluyen cinco familias de cistein proteasas: las proteasas ubiquitin específicas (USP por sus siglas en inglés, 54 de estas enzimas están presentes en humanos), las proteasas de tumor de ovario (OTU por sus siglas en inglés, 16 miembros de estas enzimas en humanos), las hidrolasas de ubiquitina C-terminal (UCH por sus siglas en inglés, 4 miembros de esta familia encontrada en humanos), la familia Josephin (4 miembros de esta familia en humanos) y las interactuantes de motivo con ubiquitina (MIU) que contienen a la nueva familia de desubiquitinadas (MINDY, 4 miembros presentes en humanos). Adicionalmente, existe una familia Zn dependiente JAS1/MPN/MOV34 metaloproteasa desubiquitinada, (JAMM también conocida como MPN+, 16 miembros descritos en humanos)<sup>46</sup>.

#### *2.6.5 USP.*

Las proteasas ubiquitina específicas (USPs por sus siglas en inglés) son proteasas multidominio que varían en tamaño y complejidad pero que comparten un cierto grado de homología por sus unidades catalíticas, es decir, dentro de tres regiones denominadas la caja Cys-, His- y QQD-. En la mayoría de las USP, la unidad catalítica es precedida y seguida por dominios adicionales que se cree que determinan la localización subcelular y el reconocimiento del sustrato<sup>47</sup>.

#### *2.6.6 USP2.*

USP2 es uno de los 54 miembros humanos de la familia de las proteasas ubiquitina específicas. USPs pertenecen a las cisteína proteasas de las proteasas tipo papaína, las cuales están caracterizadas por residuos de aminoácidos con la función catalítica en el orden Cys, His, Asp/Asn en secuencia, con la cisteína del sitio activo localizada al inicio de la  $\alpha$  hélice central<sup>47</sup>.

Las USPs se diferencian fundamentalmente de otras proteasas tipo papaína porque estas requieren reconocer la ubiquitina para alcanzar su actividad catalítica. Solo cuando la ubiquitina está unida la enzima adopta una conformación catalíticamente competente. En ausencia de ubiquitina, los residuos del sitio activo y los residuos que delimitan los sitios de unión al sustrato están desalineados. Así pues, los arreglos estructurales están restringidos a la vecindad del sitio activo, donde los residuos del C-terminal de la ubiquitina se unen<sup>48</sup>.

## 2.7 El proteasoma.

La ubiquitinación es una de las señales que indican si las proteínas han de experimentar la proteólisis. Este proceso es llevado a cabo por el proteasoma, que es un complejo proteico con una velocidad de sedimentación de 26S. Es una estructura compleja integrada por muchas subunidades proteicas. La energía para su funcionamiento es generada mediante la hidrólisis de ATP. La ubiquitina es reciclada una vez que la proteína marcada es digerida. El complejo proteico está formado por dos componentes principales: un conjunto de dos subunidades multiproteicas, una con función catalítica y otra con función reguladora, de 20S y 19S respectivamente<sup>49</sup>.

El primer complejo, el de 20S, consta de dos copias de 14 subunidades cada una, con un peso molecular global de 700 kiloDaltons. Las 14 subunidades son homólogas y adoptan la misma estructura en conjunto. Las 28 subunidades del complejo 20S están formadas por cuatro anillos de 7 subunidades cada uno. La estructura espacial adopta un aspecto de barril.

Los componentes de los anillos exteriores del barril se denominan  $\alpha$ ; y los de los anillos internos del barril se denominan  $\beta$ . Los centros activos de la proteasa se sitúan en los anillos  $\beta$  del interior del barril que contienen los aminoácidos treonina o serina en el extremo N-terminal. Los grupos hidroxilo (-OH) de treonina o serina se convierten en nucleofílicos (-O-) con la ayuda de los grupos amino convertidos en amonio (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Los grupos nucleofílicos reaccionan con los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos formando derivados acilos de las enzimas (acil-enzima). Este proceso permite secuestrar los centros activos proteolíticos de los sustratos potenciales difundiendo en el interior del barril. Se produce la digestión de la proteína hasta la formación de péptidos de entre 7 y 9 aminoácidos.

El complejo regulador, de 19S, se acopla a ambos lados del complejo catalizador para formar un complejo con una velocidad de sedimentación de 26S, esto es el proteasoma. Son las subunidades que forman el complejo 19S las que reconocen a la proteína etiquetadora ubiquitina. Las subunidades clave del complejo 19S son seis enzimas con actividad ATP-asa. La hidrólisis del ATP aporta la energía precisa para la ubiquitinación; la unión de varias ubiquitinas a las subunidades del complejo 19S provoca cambios en la conformación del complejo 20S que hace posible que la proteína que ha de ser degradada “entre en el barril”<sup>50</sup>.

#### *2.7.1 Inhibidores de proteasoma.*

Estudios iniciales destinados a comprender el mecanismo de acción del proteasoma demostraron que este es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis proteica, incluyendo proteínas vinculadas con el ciclo celular, proliferación celular y señalización pro- y anti-apoptótica.

Los inhibidores del proteasoma se perfilan como fármacos terapéuticos contra enfermedades como el cáncer, y un amplio uso en investigación. Bortezomib, Velcade, y MG-341, fueron aprobados por la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma de células de manto. También se utiliza en experimentos de laboratorio para inhibir la actividad del proteosoma<sup>51</sup>. Muchos otros inhibidores del proteasoma se han propuesto como fármacos o se encuentran en fase de evaluación y ensayos clínicos, incluyendo Disulfiram, Epigallocatechin-3-gallate, Salinosporamide A, carfilzomib, ONX 0912, CEP-18770, y MLN9708.

#### *2.7.2 MG132.*

MG132, también conocido como carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal, Z-LLL-CHO, es un péptido aldehído que pertenece a un grupo de reactivos capaces de inhibir diferentes tipos de proteasas, incluyendo proteasas de serina, calpaínas, entre otras. Se ha demostrado que MG132 inhibe fuertemente las actividades de los proteasomas, y también la de calpaína<sup>52</sup>.

El MG132 y otros inhibidores del proteasoma presentan toxicidad para las células y los tejidos, y causan la muerte celular en altas concentraciones o tras tratamientos prolongados. Por lo que es aconsejable ajustar la concentración óptima a un rango significativo (por ejemplo, 10  $\mu$ M). La concentración óptima no sólo depende del tipo celular, sino también de parámetros del cultivo celular como la confluencia, la concentración del suero y la composición del medio.

## 2.8 Antecedentes para el estudio de la ubiquitinación.

La ubiquitinación es una PTM muy complicada de estudiar debido a que el tamaño de esta hace imposible analizarla mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida. Se han desarrollado distintas estrategias para su estudio, la más utilizada actualmente consta de la digestión de las proteínas utilizando tripsina, la cual lleva a cabo su actividad en lisinas y argininas. La ubiquitina se une de manera covalente al residuo épsilon amino de las lisinas libres con su carboxilo terminal, siendo este una glicina. La tripsina también corta las ubiquitinas, este corte provoca que en la lisina modificada se queden unidos dos aminoácidos de la ubiquitina, los cuales son dos glicinas. Con esto en consideración se hace un enriquecimiento por inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra las dos glicinas unidas al grupo épsilon amino de la lisina<sup>24</sup>.

Existen nuevas estrategias que constan del bloqueo de las lisinas disponibles para el posterior uso de desubiquitininas<sup>53</sup>. En este método se bloquean las lisinas utilizando N-hidroxy succiacetato, posteriormente se utiliza la desubiquitinasa USP2 para remover la ubiquitina de las lisinas, quedando estas últimas libres. Las lisinas libres se marcan con N-tert-butoxycarbonyl glicina para poder ser analizados mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida.

Sin embargo es necesario el desarrollo de nuevos métodos de detección de la modificación así como su estequiometría para poder entender más acerca de su regulación y de los procesos en los que participa en el proteoma.

## 2.9 El proteoma.

El término proteoma se acuñó en 1994 cuando Marc Wilkins unió los términos de proteína con genoma<sup>54</sup>. Este término se utiliza para describir el conjunto completo de proteínas que pueden ser expresados por una célula u organismo. En los organismos pluricelulares el genoma de cada una de sus células es idéntico, sin embargo lo que confiere características específicas para cada uno de los tipos celulares es su proteoma. Existen proteínas que no cambian su expresión en la mayoría de las células de un organismo, sin embargo hay otras que son necesarias solo en algunos tipos celulares por lo que su expresión esta solo en esas células. Un ejemplo de esto es la expresión de proteínas que se pueden encontrar en las neuronas pero que no se encontraran en otras células como las epiteliales. Es por eso que el conocer solo los genes que se encuentran en una célula no nos permite conocer más acerca de su fenotipo en cuestión. De esta manera es necesario conocer las características químicas, físicas y bioquímicas de las proteínas que son codificadas por los genes. Esto involucra la secuencia de aminoácidos que la conforman, el tipo de estructura, la capacidad de interactuar con otras moléculas, la

velocidad de síntesis y degradación, su procesamiento proteolítico, la presencia de modificaciones post-traduccionales, entre otras características. Es indudable entonces que la dilucidación completa del proteoma de un organismo es una tarea mucho más compleja y difícil que la dilucidación de su genoma.

## 2.10 La proteómica.

La proteómica es la rama de la ciencia encargada del estudio de las proteínas que se encuentran expresadas en un momento en el tiempo, ya sea en una célula, un tejido u organismo, es decir el proteoma. La cantidad y el tipo las proteínas presentes varía en respuesta a cambios en el ambiente celular, situaciones de estrés, requerimientos de metabolitos para el funcionamiento, entre otras situaciones.

A diferencia del genoma, que es una colección fija de secuencias que no cambia con el tiempo, la dinámica del proteoma provoca que el estudio de este adquiera un nivel más alto de complejidad, esto debido a que un RNAm puede traducirse en más de una proteína debido a los procesos de corte y empalme que este puede sufrir, además las proteínas pueden modificarse postraduccionalmente con distintas moléculas como grupos metilo, acetilo, fosfatos entre otros. Estas condiciones provocan que el proteoma humano este constituido por más de 100 mil proteínas<sup>55</sup>.

## 2.11 La espectrometría de masas.

La herramienta fundamental para el estudio de la proteómica es la espectrometría de masas, la cual además de permitir conocer la masa de las proteínas también nos permite conocer su secuencia primaria de aminoácidos. Desde el descubrimiento de los métodos suaves de ionización en espectrometría de masas, se abrieron las puertas al análisis de macromoléculas no volátiles como péptidos y proteínas. Los métodos suaves de ionización que se emplean en espectrometría de masas aplicada a estudios de proteómica son: Ionización por Electronebulización (ESI por sus siglas en inglés) e Ionización y Desorción por Láser Asistida por Matriz (MALDI por sus siglas en inglés). En las últimas dos décadas los sistemas de Cromatografía Líquida acoplados a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS) con fuente de ionización ESI, han tenido un desarrollo vertiginoso convirtiéndose cada vez más precisos y exactos en las mediciones, a su vez que se han vuelto más rápidos y sensibles. Estas características hacen que la proteómica basada en espectrometría de masas de alta resolución, no solo sea la herramienta ideal para la identificación y cuantificación de péptidos y proteínas, sino también para identificar con exactitud el

sitio exacto de sus modificaciones postraduccionales y poder realizar cuantificaciones exactas y relativas de las mismas

#### *2.11.1 Proteómica por shotgun.*

La proteómica por shotgun es uno de los métodos más utilizados para el estudio de proteomas complejos y fue desarrollado por el grupo de John Yates III<sup>56</sup>. Para esta técnica de estudio de la proteómica se utiliza una enzima de digestión como la tripsina para digerir las proteínas de la muestra y los péptidos resultantes se analizan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y la comparación con espectros teóricos que se obtienen a partir de bases de datos. La información obtenida por este tipo de análisis se refiere a pequeñas secuencias peptídicas cuya asignación a una proteína en específico que no siempre es posible debido a que la secuencia descrita puede ser compartida entre distintas proteínas.

El análisis cuantitativo a gran escala de los proteomas mediante la proteómica de perdigonada constituye uno de los retos más importantes, debido a la elución de los péptidos con una misma masa y un mismo tiempo de elución en la cromatografía. Los distintos procedimientos para el análisis cuantitativo de proteomas se pueden dividir en dos grandes grupos en base al uso o no de isótopos estables.

#### *2.11.2 Uso de isótopos en espectrometría de masas.*

La espectrometría de masas se ha utilizado de manera cuantitativa en moléculas pequeñas desde hace mucho tiempo. En la investigación farmacéutica se utilizan análogos isotópicamente marcados de la molécula de interés y agregan una cantidad conocida de la molécula a la muestra para el análisis. Esto debido a que la espectrometría de masas no es cuantitativa como tal por la variación de la respuesta del detector, los campos de ionización diferencial de distintas sustancias, entre otros factores. Sin embargo la observación de distintos picos producidos por análogos isotópicos es una manera muy precisa de cuantificación ya que no hay diferencias químicas entre las especies y se pueden analizar en el mismo experimento.

El marcaje isotópico de las proteínas se puede realizar usando reactivos especiales como el ICAT(Isotope-coded affinity tag)<sup>57</sup> o el cICAT(cleavable isotope coded affinity tagged)<sup>58</sup>, que son etiquetas con diferentes masas para poder diferenciar y cuantificar los péptidos. Las proteínas también se pueden marcar in vivo a partir de moléculas que se encuentran en el medio como es el caso de SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture)<sup>59</sup>. También se pueden marcar los péptidos con ayuda de etiquetas utilizando reactivos como iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation)<sup>60</sup> o TMT (Tandem mass tag)<sup>61</sup>. O mediante

procedimientos usados clásicamente para la derivatización química de péptidos como la acetilación.

Josue Baeza y su grupo desarrollaron una estrategia para el estudio de la estequiometría de la acetilación sin necesidad de un paso de enriquecimiento<sup>62</sup>. Este acercamiento utiliza isótopos estables para marcar las lisinas libres, este isótopo es un grupo acetilo marcado con deuterio, lo cual provoca una ganancia de tres Dalton, esto provoca que las lisinas queden marcadas con acetilación “pesada” o “ligera” en el proteoma completo, lo cual permite el análisis de la estequiometría de esta modificación.

Utilizando la misma técnica Gil y colaboradores lograron analizar la estequiometría de la acetilación en líneas celulares humanas<sup>63</sup>. Sin embargo modificaron el reactivo para la acetilación química, optando por el uso de N-acetoxy-succinimida, ya que tenía un mismo rendimiento de reacción y era menos violenta.

### *2.11.3 Análisis de datos en espectrometría de masas.*

A pesar de todos los avances que se han realizado en espectrometría de masas para la facilidad de su uso, el aumento de la potencia y la sensibilidad, y el refinamiento de las bases de datos que se utilizan aún existen algunos puntos débiles a considerar para la mejora de los estudios proteómicos, y estos son el diseño experimental y el análisis de datos.

El diseño experimental debe de ser un paso crucial puesto que es lo que determina qué preguntas se esperan responder utilizando nuestro sistema y que tipo de análisis estadístico se debe hacer con los datos para su interpretación.

Los datos obtenidos en los experimentos de proteómica usualmente son estudiados utilizando métodos estadísticos univariados, como la prueba de t o de ANOVA, sin embargo éstos no son los más óptimos porque aumentan la posibilidad de obtener falsos positivos o relaciones entre proteínas que no tienen nada en común entre ellas.

Sin embargo actualmente se está empezado a optar por la utilización de análisis multivariante, como Análisis de componentes principales o Regresión de mínimos cuadrados parciales, este tipo de métodos son más efectivos debido a su capacidad de reducir la complejidad de los datos y para predecir tendencias entre las variables.

## 2.12 El análisis multivariante.

La implicación de más de dos variables en un problema a analizar adquiere una nueva dificultad debido a que se incrementa el número de relaciones entre las variables. Por lo tanto los cálculos que conlleva el tratamiento conjunto de un

número mayor de variables han presentado una de las mayores limitantes para los investigadores en las ciencias.

El análisis multivariado es un conjunto de técnicas estadísticas que tiene como finalidad el analizar simultáneamente conjuntos de datos con más de tres variables<sup>64</sup>. Su utilización se basa en obtener un mejor entendimiento de los fenómenos de estudio al conseguir mayor información que los métodos estadísticos univariante y bivariantes, ya que los métodos multivariados pueden, al igual que los dos métodos mencionados, probar hipótesis que comparan múltiples poblaciones. Sin embargo los métodos multivariados poseen particulares que los hacen únicos, por ejemplo el poder medir la fuerza de la interacción entre varias mediciones.

Según Cattell (1968), las ventajas del análisis multivariado comparado con el bivariado son: “economía en el almacenamiento de datos, mayor consistencia en la inferencia estadística, desarrollo de conceptos teóricos más adecuados y mayor precisión y perspectiva conceptual”<sup>65</sup>.

Este tipo de instrumentos facilitan el análisis y síntesis de datos así como la validación de los conceptos. Ya que al ser métodos reduccionistas permiten el análisis de un número muy grande de variables al agruparlas en un menor número de nuevas variables dependiendo de la normalidad de los valores, lo cual permite obtener una mayor consistencia en la información que se infiere de este tipo de análisis.

#### *2.12.1 Análisis de componentes principales.*

El método de componentes principales (CP) tiene por objeto transformar un conjunto elevado de variables métricas independientes, que se denomina originales, en un nuevo conjunto de variables conocidas como componentes principales, si son observables, o factores, si son inobservables. Esta técnica se caracteriza por tratar de explicar la interrelación entre las variables y, además, se pueden ordenar con respecto a la información que llevan incorporada<sup>66</sup>. El análisis de componentes principales se basa en la obtención de valores y vectores propios para cada una de las variables, también conocidos como eigenvalores y eigenvectores, a partir de los cuales se calculan nuevos conjuntos de variables no correlacionados entre si en el cual sus varianzas van decreciendo progresivamente.

### 3. Justificación.

El estudio de la ubiquitinación es muy complejo debido a que la modificación posee un tamaño muy grande para poder ser analizada de forma nativa mediante espectrometría de masas. Los métodos de digestión triptica y el posterior paso de enriquecimiento por inmunoprecipitación es la técnica utilizada de manera predilecta en la mayoría de los estudios realizados, sin embargo este tipo de aproximaciones no permiten conocer su estequiometría, por lo que se necesita desarrollar nuevos métodos para su estudio.

### 4. Hipótesis

Empleando técnicas de acetilación química con isotopos pesados es posible determinar, con herramientas de proteómica basada en espectrometría de masas de alta resolución, los sitios de ubiquitinación en las proteínas de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. Los resultados nos van a permitir identificar la estequiometría de esta modificación así como las diferencias en la expresión de proteínas entre células.

### 5. Objetivos

- Determinar los sitios de ubiquitinación en proteínas de líneas celulares humanas de cérvix.
  - Desarrollo de una nueva metodología para la identificación de los sitios de ubiquitinación utilizando acetilación química e isotopos pesados.
  - Identificación de nuevos sitios de ubiquitinación en líneas celulares humanas de cérvix.
- Determinar la estequiometría de la ubiquitinación en líneas celulares humanas de cérvix.
  - Comparar la ubiquitinación y la abundancia relativa de las proteínas en las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT al ser tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132.
  - Analizar las proteínas ubiquitinadas mediante análisis multivariado para poder obtener patrones de expresión para cada línea celular

## 6. Metodología

### 6.1 Cultivo de células.

Las líneas celulares seleccionadas para el estudio fueron SiHa (proveniente de carcinoma escamoso de cérvix positivo a HPV 16), HeLa (proveniente de carcinoma escamoso de cérvix positivo a HPV 18), C33A (proveniente de carcinoma escamoso de cérvix negativo a la infección por HPV) y HaCaT (una línea celular no cancerígena de cérvix inmortalizada). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomina. El ambiente de cultivo fue controlado a una temperatura de 37°C, saturado de humedad y bajo una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub>.

Cuando las células alcanzaron una confluencia de entre 70 y 90%, el suero fetal bovino fue retirado del medio y las células se incubaron en medio RPMI-1640 suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomina por 24 h.

El reactivo MG-132 fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO), quedando a una concentración de 10µg/µL. Las células se sometieron a tratamiento con MG-132 10 µM y su correspondiente control, solo DMSO, ambos disueltos en el medio sin suero durante 24 horas<sup>67</sup>. Una vez que pasadas las 24 horas, las células se lavaron con PBS (Cloruro de Sodio (NaCl) 137mM, Cloruro de Potasio (KCl) 2.7mM, Fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 10mM y Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.8mM) dos veces y se despegaron de la caja agregando Verseno (PBS 1X, EDTA 0.5mM) e incubando a 37°C durante 15 minutos. Las células se despegaron por agitación y se colectaron en un tubo cónico de 15 mL. Los tubos se centrifugaron a 3082g durante 10 minutos para formar un botón de células. El botón se lavó dos veces con PBS frío.

### 6.2 Extracción de proteínas.

La solución de ruptura que se utilizó es RIPA, el cual al no contener dodecilsulfato sódico (SDS) mantiene a las proteínas en su estructura nativa, esta solución está compuesta de 10mM de Tris Base pH 7.7, 1mM EDTA, 1% Octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL), 0.1% Desoxicolato de sodio (SDC) y 140mM de NaCl. A cada vial de células, aproximadamente  $1.2 \times 10^6$  células, se le agregó 1mL de RIPA, 10µL de inhibidores de proteasas, 10µL de DNAsa1, 20mM de N-etilmaleimida (inhibidor de desubiquitinasas) y 0.1M de Dithiothreitol (DTT). Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Los viales se centrifugaron a 12000g por 15 minutos, una vez terminada la centrifugación se retiró el sobrenadante y se colocó en un tubo

cónico de 15mL. El botón se resuspendió en 100µL de RIPA para obtener las proteínas de membrana que se hayan quedado en el pellet, se centrifugó a 12000g por 15 minutos y el sobrenadante se coloca en un tubo cónico. Posteriormente la muestra se incubó a 40°C por 30 minutos para reducir completamente los puentes disulfuro en las proteínas. Seguidamente, los residuos de cisteína libres fueron modificados añadiendo iodoacetamida (IAA) a una concentración final de 0.2 M e incubando la muestra a temperatura ambiente, en la oscuridad por 30 minutos. Para precipitar las proteínas se agregaron al tubo cónico nueve volúmenes de etanol al 100% y se dejó a -20°C toda la noche. Se centrifugó el tubo cónico a 10000g por 30 segundos para formar un botón y se retiró el exceso de etanol, se realizaron tres lavados con etanol al 90%, para quedarse con el botón que contiene a las proteínas. El contenido proteico y la calidad de la extracción fueron estimados mediante análisis por SDS-PAGE y tinción con coomassie coloidal. Las imágenes fueron procesadas con el programa Quantity One.

### 6.3 Acetilación química y Desubiquitinación.

Las proteínas se solubilizaron con una solución que contiene SDS 0.5%, desoxicolato de sodio (SDC) 0.5% y Bicarbonato de Tri-etil-amonio (TEAB) 0.1M pH 8.0. Una vez disueltas las proteínas se hicieron reaccionar sus grupos aminos libres con N-acetoxysuccinimida sin isotopo pesado (NAS-d0), este reactivo reaccionó con los residuos de Lisina libres. La reacción se llevó a cabo con la adición de un exceso de 100 veces más NAS-d0, disuelto en Metanol, que grupos aminos en la muestra proteica. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y al finalizar se repitió el paso anterior para asegurar que todos los residuos de Lisina reaccionaran. Posteriormente se incubó la muestra en 5% de hidroxilamina durante 20 minutos para revertir las posibles reacciones colaterales de O-acetilaciones en residuos como tirosina, serina y treonina. El exceso de reactivos y detergentes que pueden afectar el tratamiento con la enzima se eliminan mediante precipitación con etanol, posteriormente se añadió el buffer para la desubiquitinasa, que contiene 10mM de MES, 0.5mM de DTT, 50 mM de TRIS-HCl, pH7.5. Se añadió el dominio catalítico de la USP2 (USP2cc) a una proporción de 1:50 – 1:100 (enzima: sustrato), la cual removió la ubiquitina unida a residuos de Lisina. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. Se detuvo la reacción con SDS caliente. Se precipitaron las proteínas utilizando etanol como se describió anteriormente. Una vez desubiquitinadas las proteínas se hicieron reaccionar los grupos aminos que quedaron libres después de la reacción que se mencionó anteriormente con N-acetoxysuccinimida con isotopos pesados (NAS-d3). Se adicionó un exceso de NAS-d3, disuelto en metanol, como en el caso de la reacción con NAS-d0 la reacción se lleva a cabo en dos pasos consecutivos. Cada paso se incubó a temperatura ambiente durante una hora y al finalizar se incubó la muestra en 5% de hidroxilamina durante 20 minutos para revertir las posibles reacciones colaterales

de O- acetilaciones en residuos como tirosina, serina o treonina. El exceso de reactivos y detergentes que pueden afectar el tratamiento con tripsina se eliminó con un paso de precipitación con etanol como se describió con anterioridad. Las proteínas modificadas se solubilizaron en una solución que contiene SDS 0.5%, bicarbonato de amonio (BCA) 50 mM y se les añade la tripsina a una proporción de 1:50 (enzima: sustrato). La digestión se incubó a 37°C durante 16 horas. Al finalizar la reacción el detergente fue eliminado mediante una extracción con acetato de etilo y ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0.5% y se agitó vigorosamente. Después de centrifugar la fase orgánica se desechó y se repitió el mismo procedimiento una vez más (sin añadir TFA). Finalmente los péptidos se desalaron mediante cromatografía de fase reversa (RP por sus siglas en inglés), se secaron y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis por LC-MS/MS.

#### 6.4 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

El análisis por LC-MS/MS se realizó en un sistema nano UPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC acoplado en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Plus de Thermo Fisher Scientific. Las muestras primeramente fueron atrapadas en una precolumna (Magic AQ C18; 3 µm-200 Å; 2 cm x 100 µm ID) y posteriormente se separaron en un gradiente de elución de 250 minutos empleando una columna capilar (Nikkoy Technos Co; Magic AQ C18; 3 µm-100 Å; 15 cm x 75 µm ID). El flujo de trabajo fue de 250 nL/min y las fases móviles se compusieron de las soluciones: A-) 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico en agua y B-) 0.1% ácido fórmico en una mezcla 90:10 (v:v) acetonitrilo:agua. Los péptidos a medida que fueron saliendo de la cromatografía fueron analizados en el espectrómetro de masas que opera en modo positivo y con adquisición dependiente de datos (DDA) en un rango de masas completo de 300-2,000 Th. Las 10 señales más intensas con dos o más cargas fueron seleccionadas por el cuadrupolo y fragmentadas con el método de disociación colisional de alta energía (HCD por sus siglas en inglés) a una energía de colisión normalizada (NCE por sus siglas en inglés) del 27%. Los iones precursores se analizaron a una resolución de 70,000 (a 200 m/z) y los iones de los fragmentos se detectaron con 17,500 de resolución. La ventana de selección de los precursores fue de 2 Th.

#### 6.5 Identificación/cuantificación de péptidos/proteínas y análisis bioinformático.

El análisis de identificación y cuantificación relativa de péptidos y proteínas a partir de los datos generados de las mediciones por LC-MS/MS se realizó con el programa MaxQuant v1.6.5. Para la búsqueda se fijaron la enzima de corte como Arg-C y los residuos de cisteína como carbamidometil-cisteína como modificación fija. Como modificaciones variables se incluyen los residuos de lisina y el extremo N de las proteínas con acetilación normal (d0) y pesada (d3), así como deaminación en glutamato y asparagina, alquilación de cisteínas con n-etilmaleimida y oxidación en

metionina. Las proteínas se identificaron con una tasa de descubrimiento falso (FDR por sus siglas en inglés) del 5% empleando la estrategia “target-decoy”, que se incluyó en el análisis con el MaxQuant. La base de datos de secuencias de proteínas que se usa como referencia es la reportada en el repositorio UniProt para el proteoma humano con identificador UP000005640, liberada el 17 de mayo del 2019. El análisis cuantitativo se realizó mediante la estrategia libre de marcaje (label-free), solo fueron consideradas aquellas proteínas con al menos dos péptidos en la categoría de “razor-unique”, que fueron identificados por MS/MS y que se encontraron en al menos dos de las tres replicas experimentales.

## 7. Resultados

La estrategia general que se eligió para llevar a cabo el análisis de los sitios de ubiquitinación de las proteínas así como su estequiometría consta del uso de acetilación química y su diferencia de pesos usando isotopos en líneas celulares tratadas con un inhibidor de proteasoma, lo cual busca mantener las proteínas marcadas con ubiquitina en lugar de que se degraden vía ubiquitina proteasoma. Para el análisis de la estequiometría de la ubiquitinación se llevó a cabo una acetilación química con N-acetoxysuccinimida en todos los residuos de lisina libres, quedando de esta manera todas las lisinas ocupadas, tanto por grupos acetilo como por ubiquitina. La ubiquitina unida a los residuos de lisina es retirada utilizando el dominio catalítico de la desubiquitinasa USP2. Una vez retirada la ubiquitina quedan libres los grupos épsilon amino de las proteínas ubiquitinadas. Se lleva a cabo una nueva reacción de acetilación utilizando ahora N-acetoxysuccinimida marcada con deuterio, lo cual provoca que el residuo este acetilado pero que tenga una masa de tres Daltons más. Posteriormente, se digieren las proteínas utilizando tripsina, la cual no puede reconocer las lisinas al estar modificadas y solo corta en las argininas. Los péptidos son analizados utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida. Como se encuentra representado en la figura 1, en la misma se encuentra una comparativa de la metodología que se utiliza comúnmente para el estudio de la ubiquitinación.

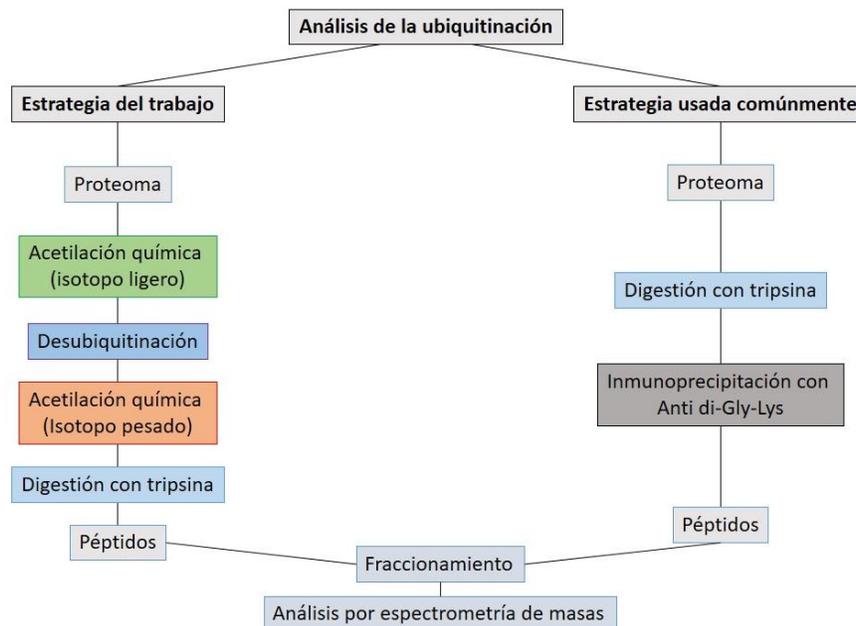


Figura 1 Estrategia experimental general para el estudio del grado de ocupación de la ubiquitinación. Esquemáticamente se muestra cual es la estrategia que se eligió para llevar a cabo el análisis, lado derecho, donde a través de acetilaciones con distintos pesos moleculares se puede estudiar la estequiometría de la ubiquitinación. Del lado derecho se muestra cómo es que se estudia la ubiquitinación comúnmente.

Posterior al proceso que se describe en la metodología para la preparación de las muestras para el análisis de la estequiometría de la ubiquitinación, se tomaron 50µg de extracto de proteína total para llevar a cabo la inyección en el espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida. Los datos crudos que se obtuvieron del equipo fueron analizados utilizando el software maxquant, a partir del cual se obtuvieron los datos que se presentan en la Tabla 1.

Péptidos identificados	20432
Proteínas identificadas	4634
Proteínas que se identificaron con dos péptidos o mas	3211
Proteínas cuantificables	1621

Tabla 1. Numero de péptidos y proteínas identificadas por LS-MS/MS.

Al analizar los archivos crudos de los datos obtenidos por el espectrómetro de masas y utilizando el software Maxquant se identificaron 4634 proteínas. De las cuales 3211 proteínas fueron identificadas por al menos dos péptidos. Para poder darle robustez al análisis estadístico multivariado se decidió mantener sólo las proteínas que habían sido identificadas y se les asigno un valor de intensidad en al menos dos de las tres replicas biológicas, lo que nos dejó con un número final de 1621 proteínas totales tanto ubiquitinadas como no modificadas. Este número de proteínas se debe a que el software Maxquant logra identificar el péptido sin embargo como no se cuenta con un buen espectro no logra asignarle un valor de intensidad con lo cual le asigna una intensidad de 0 a ese péptido.

A las 1621 proteínas que se seleccionaron para el análisis se procedió a imputar valores en las casillas donde tenían ceros, puesto que el análisis multivariado requiere que siempre exista un valor para cada variable. Se seleccionó el método de “random forest” para imputar los datos. Se consideró la imputación por replica biológica por cada línea celular, esto para evitar afectar a la varianza de las muestras.

Una vez obtenidos los datos se normalizaron para tratar de contender contra el error técnico que en lugar de agrupar las muestras por línea celular los agrupaba por replica técnica, es decir, agrupaba replica 1, replica 2 y replica 3 juntas independientemente de la condición que representarán. Después de la normalización esto mejoró considerablemente.

A partir de estos datos obtenidos se realizó un análisis estadístico multivariado basado en componentes principales de las 1621 proteínas que fueron cuantificables utilizando la paquetería de R, prcomp. Los valores obtenidos de este análisis se presentan en la Tabla 2. Se eligió este tipo de análisis multivariado debido a que si se utilizan estrategias de análisis univariado, como el “fold change”, implica la realización de 28 comparaciones diferentes y que aportarían una menor información acerca de la variación global entre los modelos analizados, al proponerse una tasa de cambio arbitraria en lugar de una calculada con respecto al modelo, como lo hace el análisis de componentes principales.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
Desviación estándar	20.0786	14.3012	13.3696	11.65065	10.88339	9.78415	8.95036	8.18082
Porcentaje de varianza%	24.89	12.63	11.03	8.379	7.312	5.909	4.945	4.131
Porcentaje acumulado%	24.89	37.51	48.54	56.923	64.235	70.144	75.089	79.22
	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16
Desviación estándar	7.63225	6.99684	6.26035	5.75514	5.61496	5.31654	5.17621	4.51659
Porcentaje de varianza%	3.596	3.022	2.419	2.045	1.946	1.745	1.654	1.259
Porcentaje acumulado%	82.816	85.838	88.257	90.302	92.248	93.993	95.647	96.906
	CP17	CP18	CP19	CP20	CP21	CP22	CP23	CP24
Desviación estándar	4.32861	4.11156	3.80535	2.34E-09	2.19E-09	1.97E-09	1.77E-09	9.81E-15
Porcentaje de varianza%	1.157	1.044	0.894	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Porcentaje acumulado%	98.063	99.106	100	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00

Tabla 2. Valores de desviación estándar y porcentajes de varianza explicados por el análisis de componentes principales.

De este análisis se seleccionaron los primeros tres componentes, los cuales explican el 48.54% de la variación en el experimento lo cual nos indica que son las proteínas presentes en estos las que están generando la mayor cantidad de variación entre el total de las proteínas. Los resultados se graficaron como se muestra en la Figura 2.

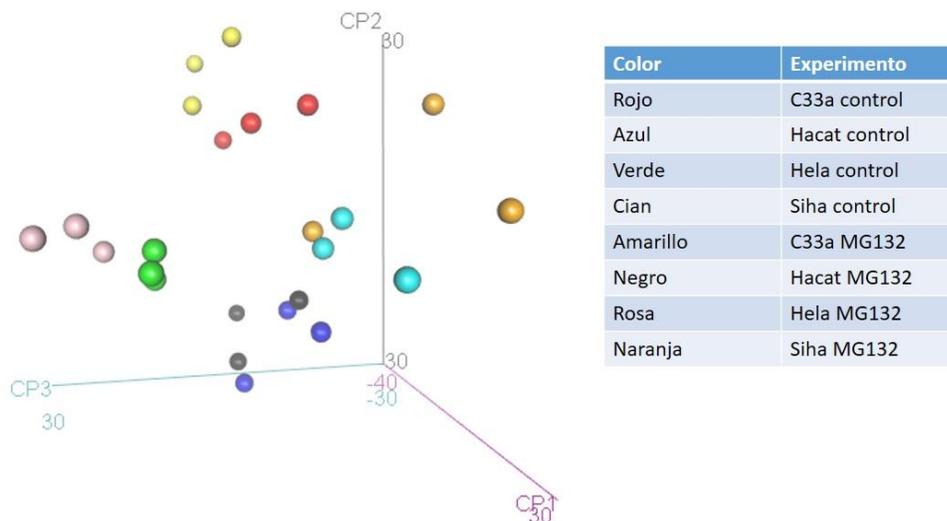


Figura 2 Análisis de componentes principales de las líneas celulares SiHa, Hela, C33A y HaCaT, tanto control como tratadas con MG-132. Los ejes indican los valores de cada uno de los componentes principales, los cuales están basados en sus eigenvalores, por lo cual las escalas pueden variar.



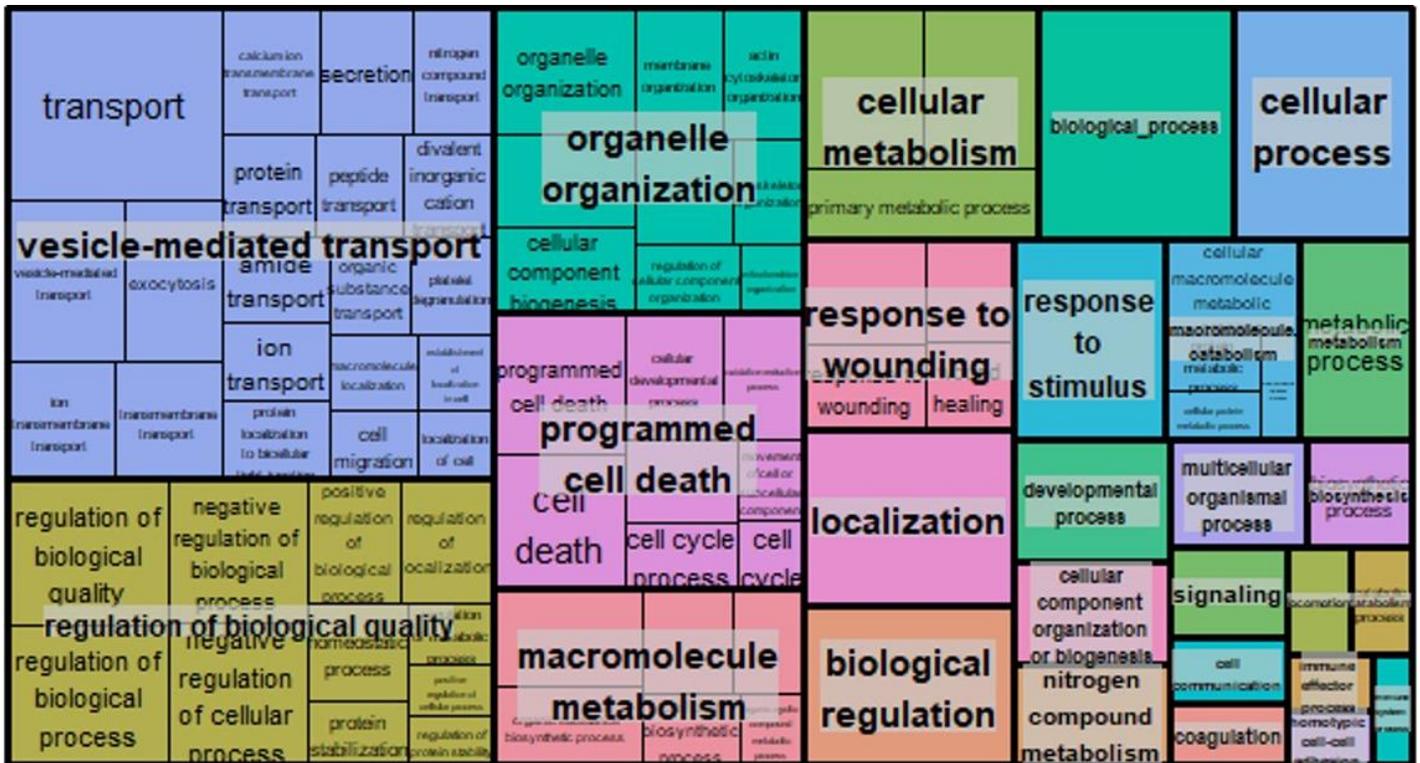


Figura 4 Ontología génica de los procesos biológicos de las proteínas del componente 2 de las líneas celulares tratadas con el inhibidor MG132 y las células control.

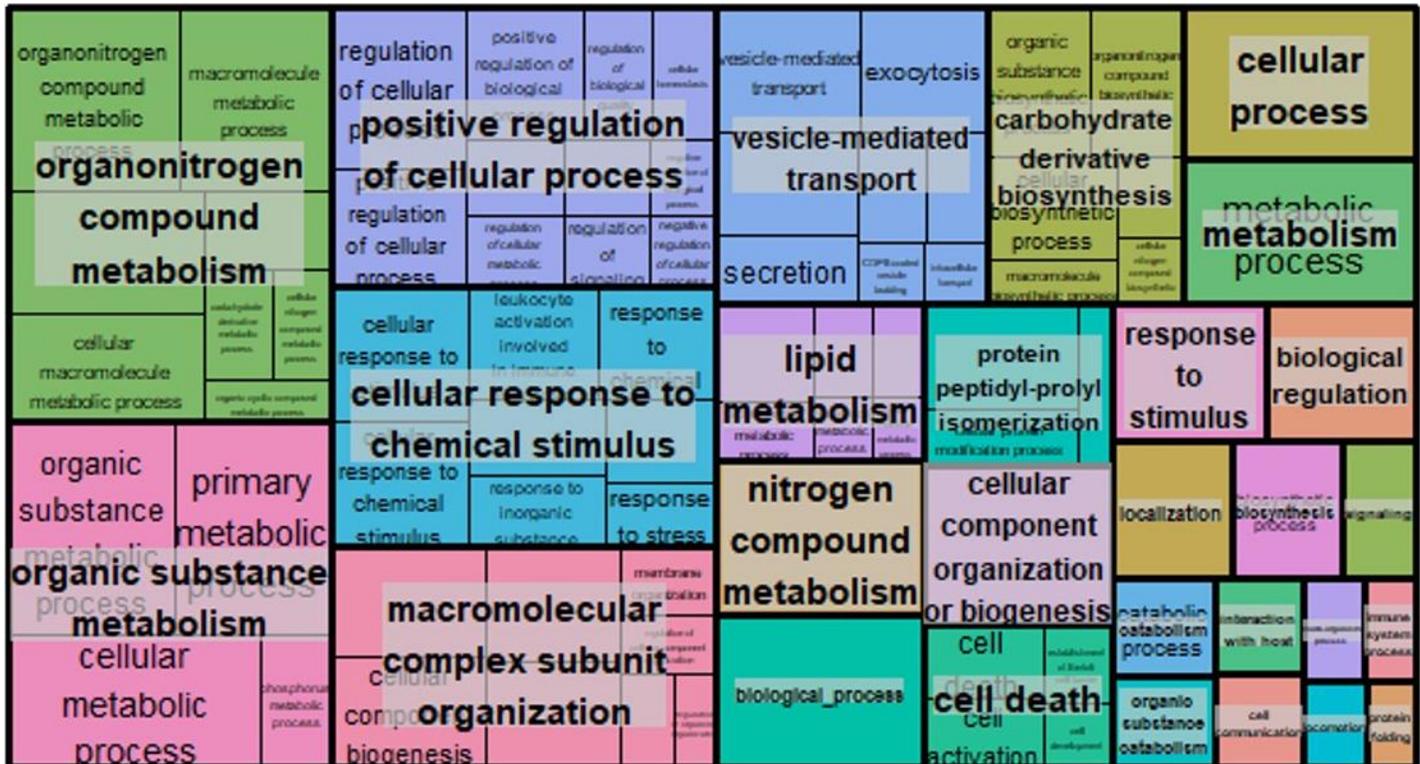


Figura 5 Ontología génica de los procesos biológicos de las proteínas del componente 3 de las líneas celulares tratadas con el inhibidor MG132 y las células control.

Posteriormente se decidió realizar el mismo análisis estadístico de componentes principales considerando solamente las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT tratadas con el inhibidor de proteasoma, MG-132, esto debido a que como se muestra en la figura 2, el uso del inhibidor del proteasoma no afecta de manera representativa las proteínas expresadas por cada línea celular y se buscó analizar el papel de este inhibidor en la ubiquitinación. Los valores obtenidos de este análisis se obtuvieron los valores que se presentan en la Tabla 3.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Desviación estándar	21.8294	16.0721	16.0024	14.1612	12.1675	10.32043
Porcentaje de varianza%	29.42	15.95	15.81	12.38	9.139	6.575
Porcentaje acumulado%	29.42	45.36	61.17	73.55	82.685	89.26
	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12
Desviación estándar	9.12806	7.03993	6.41162	3.24E-09	3.06E-09	8.84E-15
Porcentaje de varianza%	5.143	3.059	2.538	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Porcentaje acumulado%	94.403	97.462	100	100	100	100

Tabla 3. Valores de desviación estándar y porcentajes de varianza explicados por el análisis de componentes principales de las líneas celulares tratadas con MG-132.

De este análisis se seleccionaron los primeros tres componentes los cuales explican el 61.17% de la variación. El resultado del análisis de componentes principales se muestra en la Figura 6, y se puede observar cómo las líneas celulares se separan entre sí, dejando a C33A y HaCaT en un extremo del componente principal 1 y a SiHa y HeLa en el otro. Por lo que la variación en las proteínas expresadas se debe principalmente a la presencia del genoma del virus del HPV en las líneas celulares SiHa y HeLa.

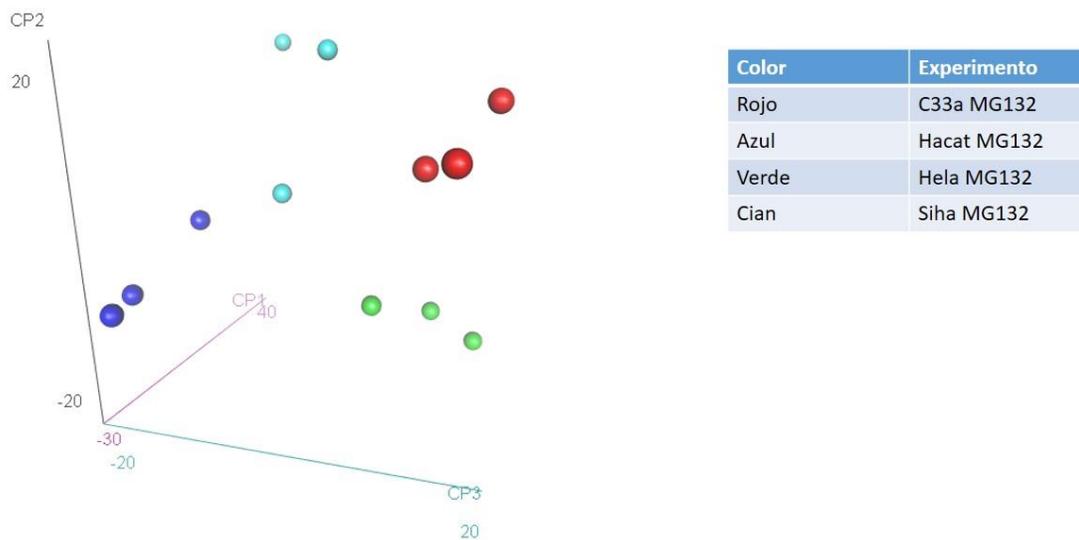


Figura 6 Análisis de componentes principales de las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT tratadas con el inhibidor de proteasoma MG-132. Los ejes indican los valores de cada uno de los componentes principales, los cuales están basados en sus eigenvalores, por lo cual las escalas pueden variar.

Se seleccionaron las proteínas representativas de los primeros tres componentes a partir del índice de rotación que el propio análisis de componentes principales otorga. A éstas proteínas se les realizó una búsqueda de la ontología genética utilizando la misma metodología que se describió anteriormente para observar en que procesos biológicos estaban participando. Los resultados se muestran en los Treemaps de las Figuras 7, 8 y 9, que corresponden a los componentes 1,2 y 3 respectivamente.

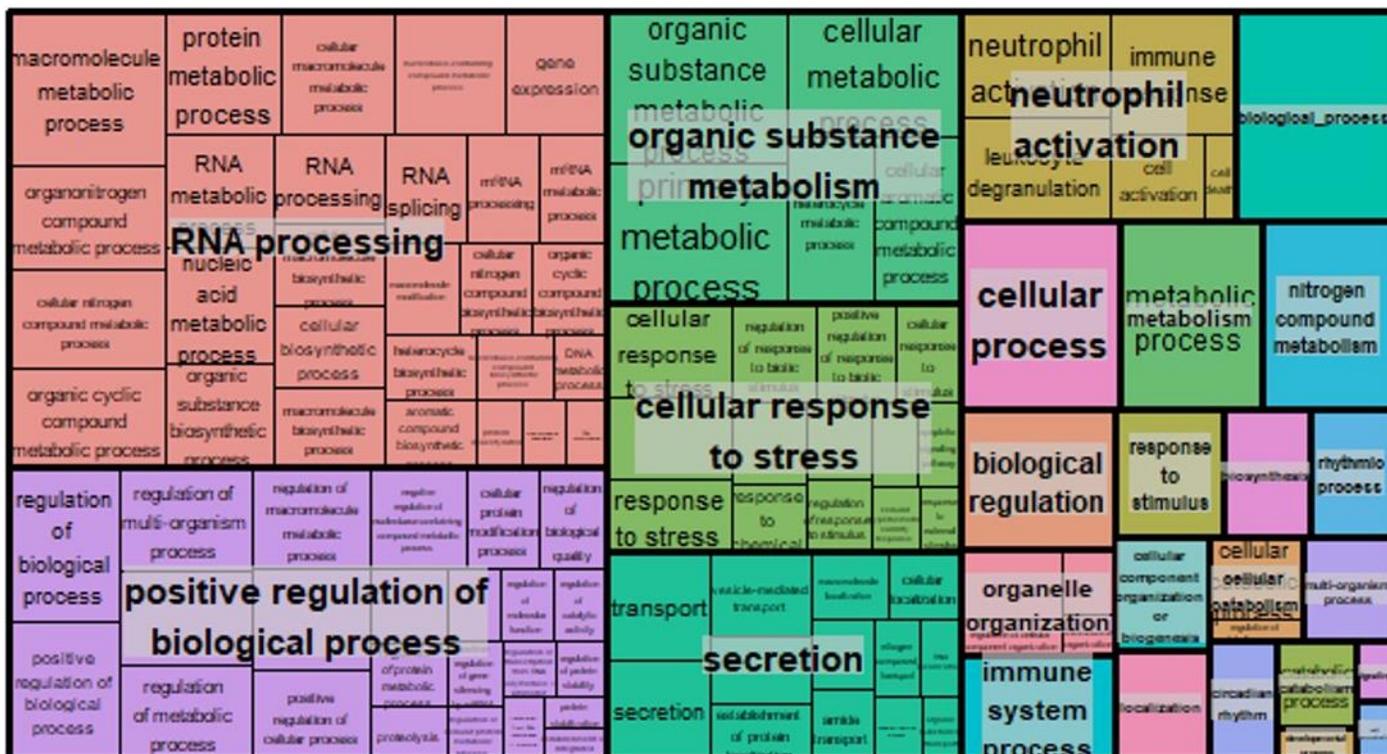


Figura 7 Ontología génica de los procesos biológicos de las proteínas de las células tratadas con MG-132 del componente 1

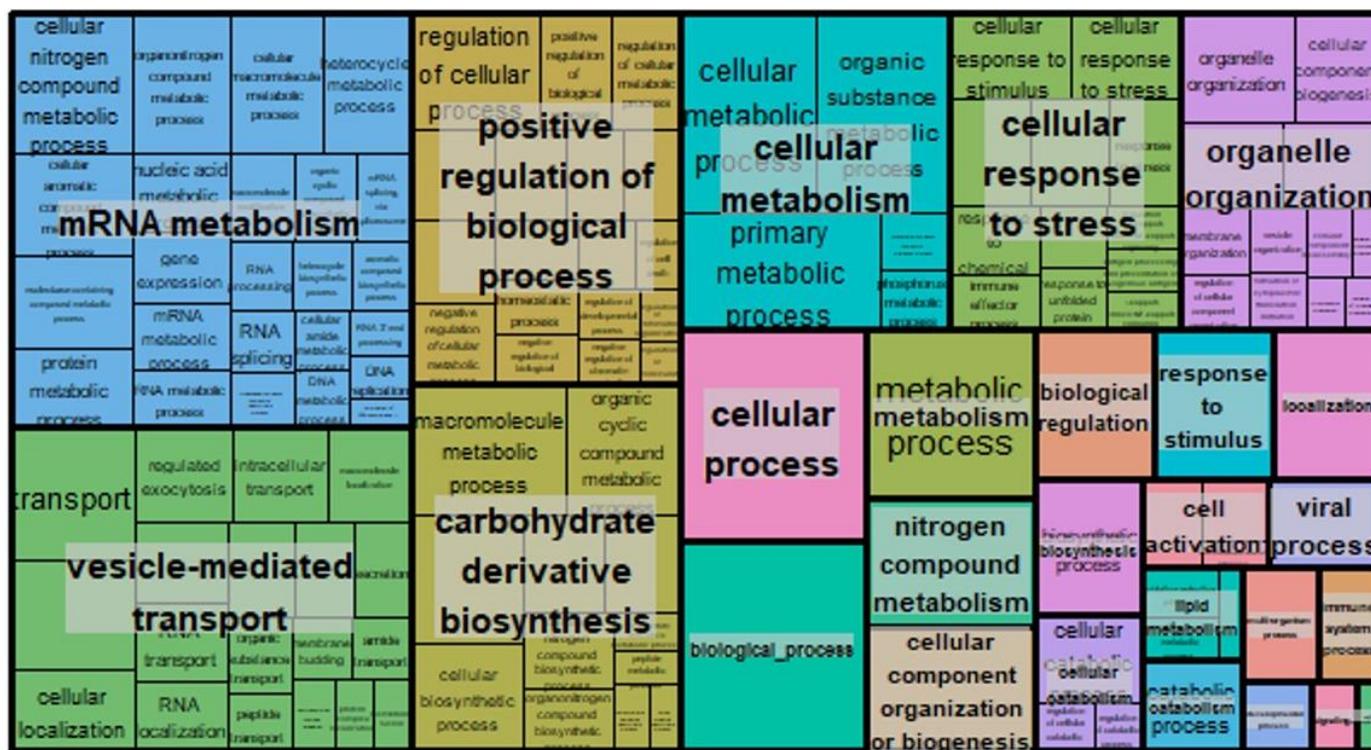


Figura 8 Ontología génica de los procesos biológicos de las proteínas de las células tratadas con MG-132 del componente 2

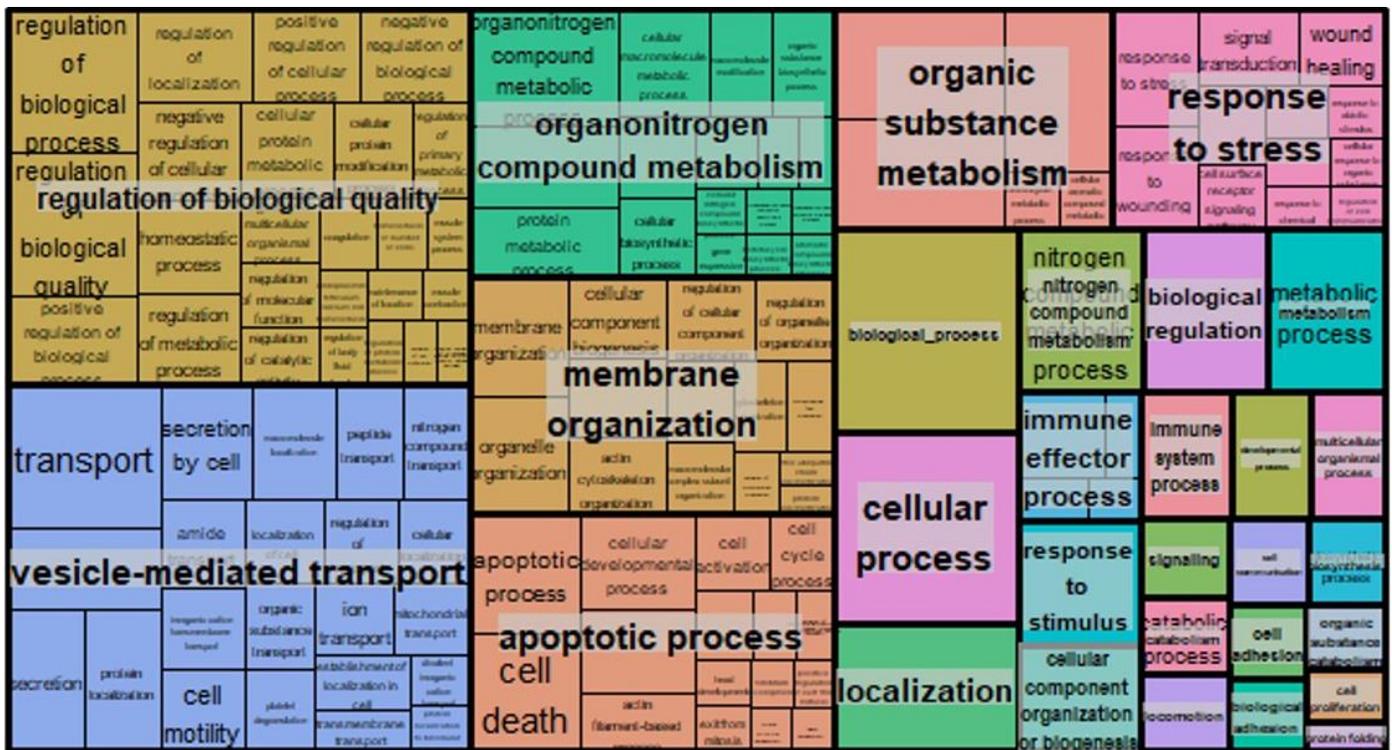


Figura 9 Ontología génica de los procesos biológicos de las proteínas de las células tratadas con MG-132 del componente 3

Para analizar la estequiometría de la ubiquitinación los péptidos modificados con acetilación pesada, marcada con deuterio, fueron determinados por Maxquant y los datos que se obtuvieron de este se encuentran indicados en la Tabla 4. Lo cual nos indica los péptidos ubiquitinados que se encontraron al realizar la técnica experimental anteriormente explicada.

Péptidos modificados identificados	976
Proteínas modificadas identificadas	603
Proteínas modificadas control	342
Proteínas modificadas MG-132	334
Péptidos modificados cuantificados	613
Proteínas modificadas cuantificadas	333
Estequiometria de la ubiquitinación	0.25% -100%
Proteínas ubiquitinadas control cuantificadas	180
Proteínas ubiquitinadas MG-132 cuantificadas	174

Tabla 4 Numero de péptidos y proteínas modificados con acetilación pesada identificadas con Maxquant en células control y en células tratadas con MG-132.

Se realizó un análisis de los porcentajes de la estequiometria mediante cuartiles donde se agruparon los 976 péptidos que se identificaron, esto para obtener una representación clara de cómo se encuentra el grado de ocupación de la ubiquitina en las proteínas blanco. Se observa que la mayoría de los péptidos marcados poseen una estequiometria superior al 50%, por lo que se puede suponer que esta es una modificación que requiere estar presente en una alta estequiometria para llevar a cabo su funcion. La distribución de los porcentajes de la estequiometria de los péptidos ubiquitinados se presenta en la figura 10.

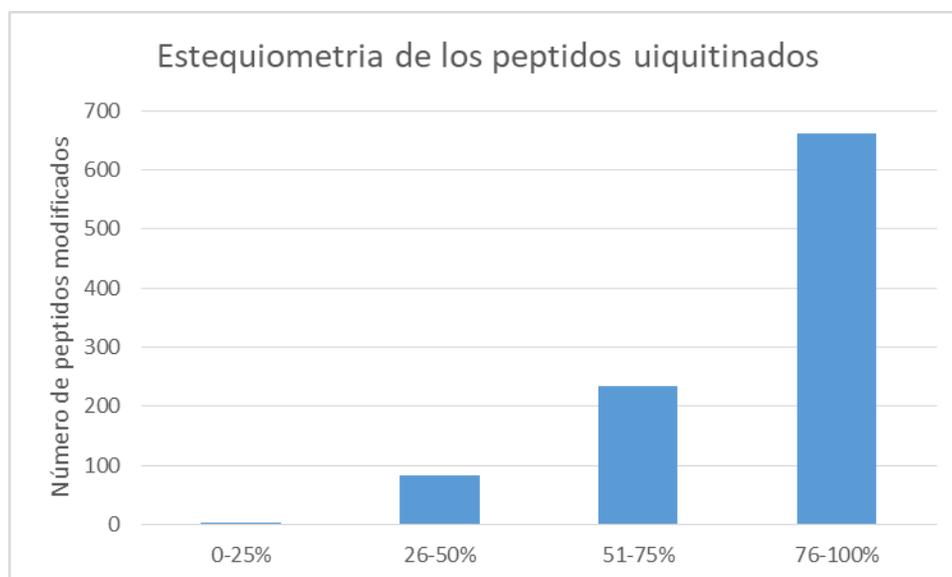


Figura 10 Distribución mediante cuartiles de los porcentajes de la estequiometria de los péptidos ubiquitinados. En la gráfica se observa el porcentaje de ubiquitinación de los péptidos identificados en este análisis.

Con las 174 proteínas ubiquitinadas cuantificadas de las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT tratadas con el inhibidor de proteasoma, MG-132, se realizó un análisis de componentes principales. Se excluyeron las proteínas de las células control puesto que no presentaban una varianza significativa en las proteínas expresadas y se privilegió el estudio de la acción del MG132 en la ubiquitinación de las proteínas. Los valores obtenidos de este análisis estadístico que se obtuvieron de las proteínas ubiquitinadas se representan en la Tabla 5.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Desviación estándar	2.93E+10	2.20E+10	1.21E+10	1.08E+10	6.31E+09	5.33E+09
Porcentaje de varianza%	50	28.2	8.5	6.75	2.33	1.66
Porcentaje acumulado%	50	78.2	86.8	93.5	95.9	97.5
	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12
Desviación estándar	4.71E+09	4.03E+09	2.01E+09	0.5816	0.5278	5.82E-06
Porcentaje de varianza%	1.29	0.947	0.235	0	0	0
Porcentaje acumulado%	98.8	99.8	100	100	100	100

Tabla 5. Valores de desviación estándar y porcentajes de varianza explicados por el análisis de componentes principales de las proteínas modificadas de las líneas celulares tratadas con MG-132.

De este análisis se seleccionaron los primeros tres componentes los cuales explican el 86.8% de la variación donde de nuevo en el primer componente se separan las líneas celulares entre las que están infectadas con HPV, SiHa y HeLa, y las que no, HaCaT y C33A, al encontrarse estas en extremos opuestos. El resultado del análisis de componentes principales se muestra gráficamente en la Figura 11.

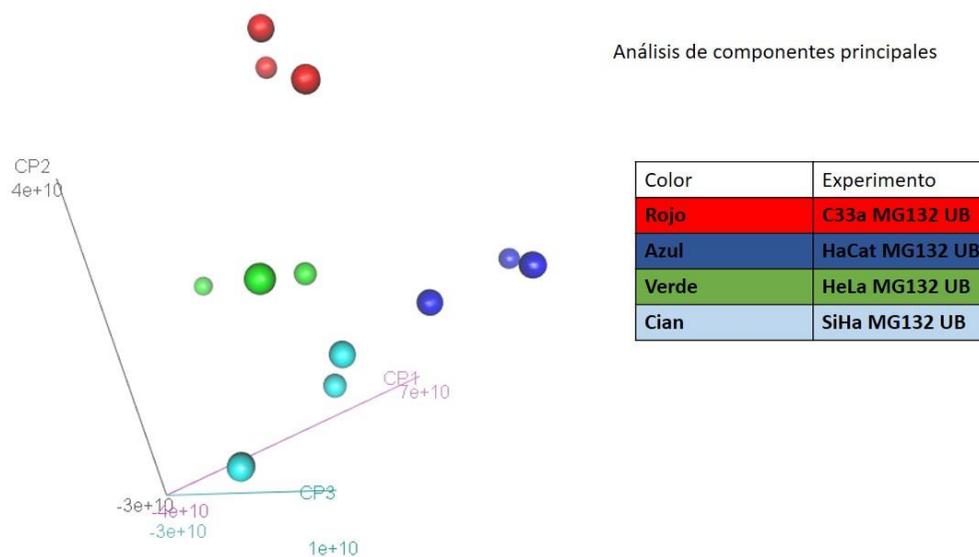
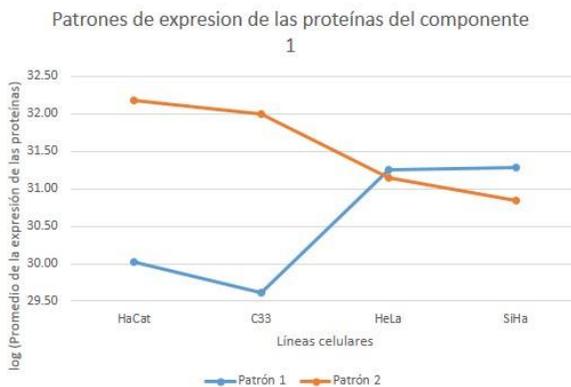


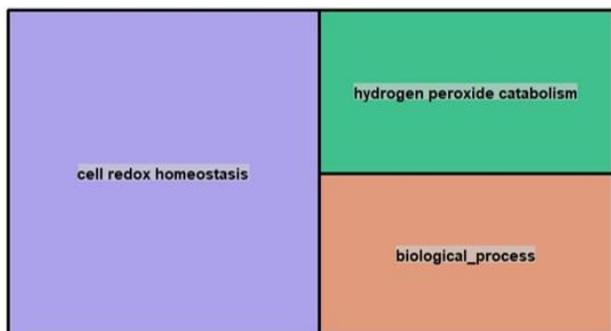
Figura 11 Análisis de componentes principales de las proteínas modificadas de las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A y HaCaT tratadas con el inhibidor de proteasoma MG-132. Los ejes indican los valores de cada uno de los componentes principales, los cuales están basados en sus eigenvalores, por lo cual las escalas pueden variar.

Se seleccionaron las proteínas representativas de los primeros tres componentes a partir del índice de rotación que el propio análisis de componentes principales otorga. Mediante los cosenos cuadrados se asignaron las proteínas al componente en el que estaban mejor representadas, y con las matrices de correlación de variables se identificó si estaban sobre o subexpresadas para obtener así los patrones de expresión de las distintas líneas celulares. A éstas se les realizó una búsqueda de la ontología genética utilizando la misma metodología que se describió anteriormente. Los resultados de los patrones de expresión de las proteínas así como los procesos biológicos en los que se encuentran representadas se muestran

en las Figuras 12, 13 y 14, que corresponden a los componentes 1,2 y 3 respectivamente.



Patrón 1



Patrón 2

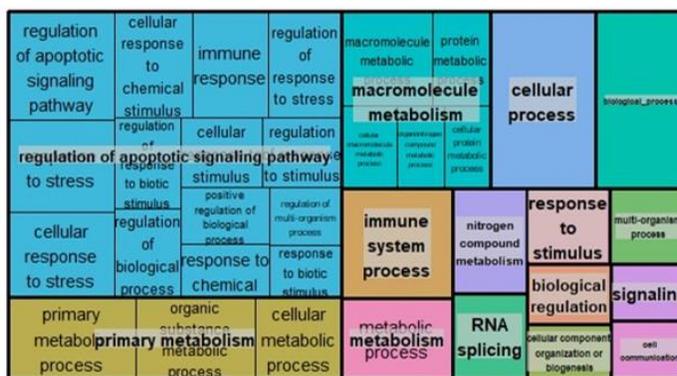
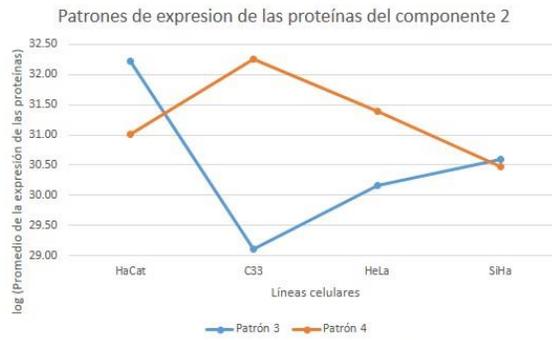
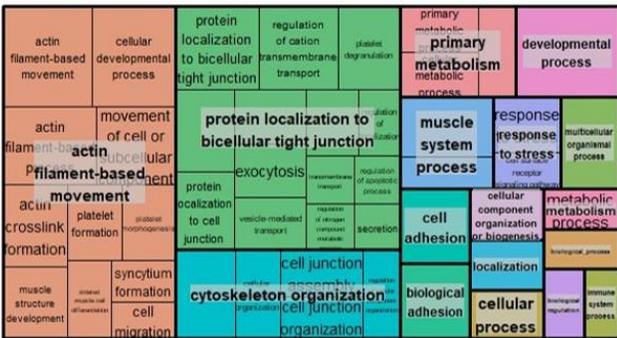


Figura 12 Patrones de expresión de las proteínas modificadas representativas del componente 1 de las líneas celulares HaCaT, C33A, HeLa y SiHa tratadas con MG-132



Patrón 3



Patrón 4

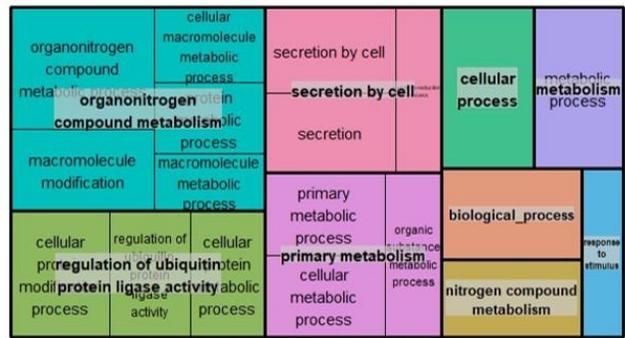
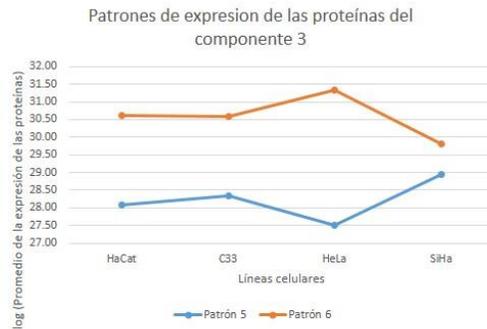
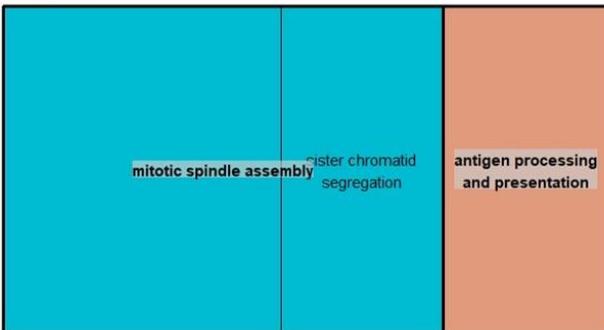


Figura 13 Patrones de expresión de las proteínas modificadas representativas del componente 2 de las líneas celulares HaCaT, C33A, HeLa y SiHa tratadas con MG-132



Patrón 5



Patrón 6

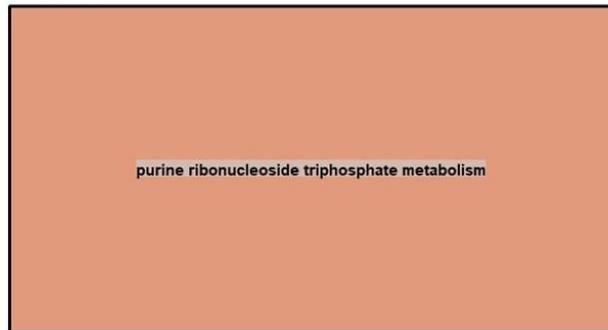
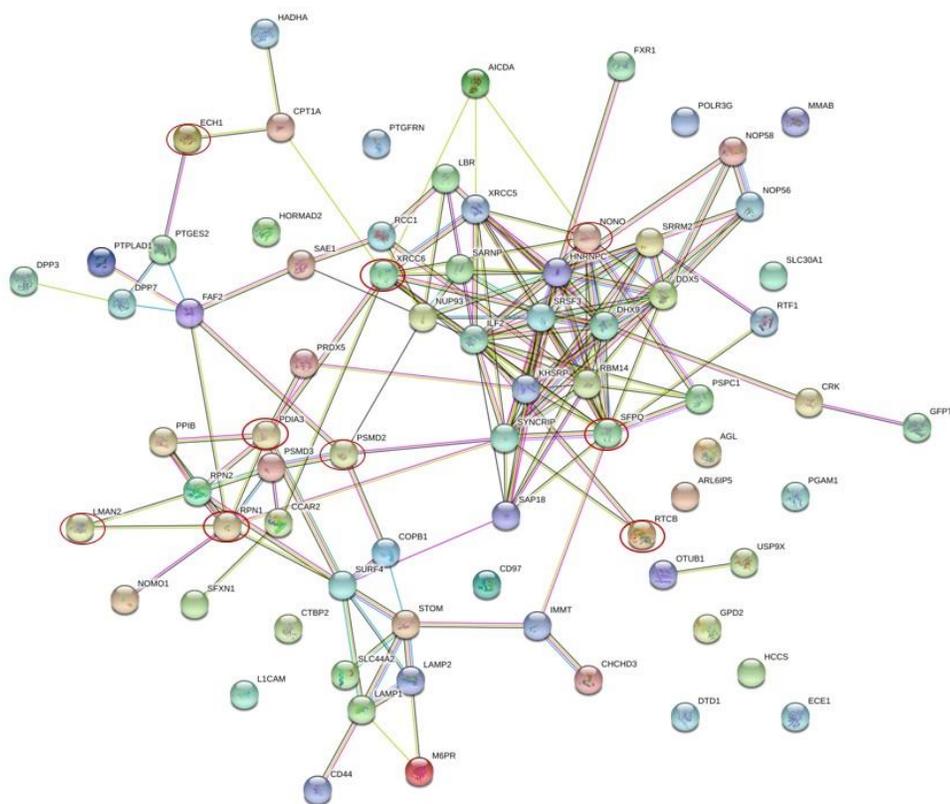


Figura 14 Patrones de expresión de las proteínas modificadas representativas del componente 2 de las líneas celulares HaCaT, C33A, HeLa y SiHa tratadas con MG-132

A partir de los datos de las proteínas ubiquitinadas se realizaron redes de interacción mediante STRING (<https://string-db.org/>), una por cada componente principal de las células que fueron tratadas con MG-132 para observar las posibles interacciones entre las proteínas ubiquitinadas con el resto de las que presentan una variación. En cada una de estas redes se indica cuáles son las proteínas que se encontraron modificadas con el isotopo pesado. Estas redes se encuentran representadas en las figuras 15, 16 y 17.

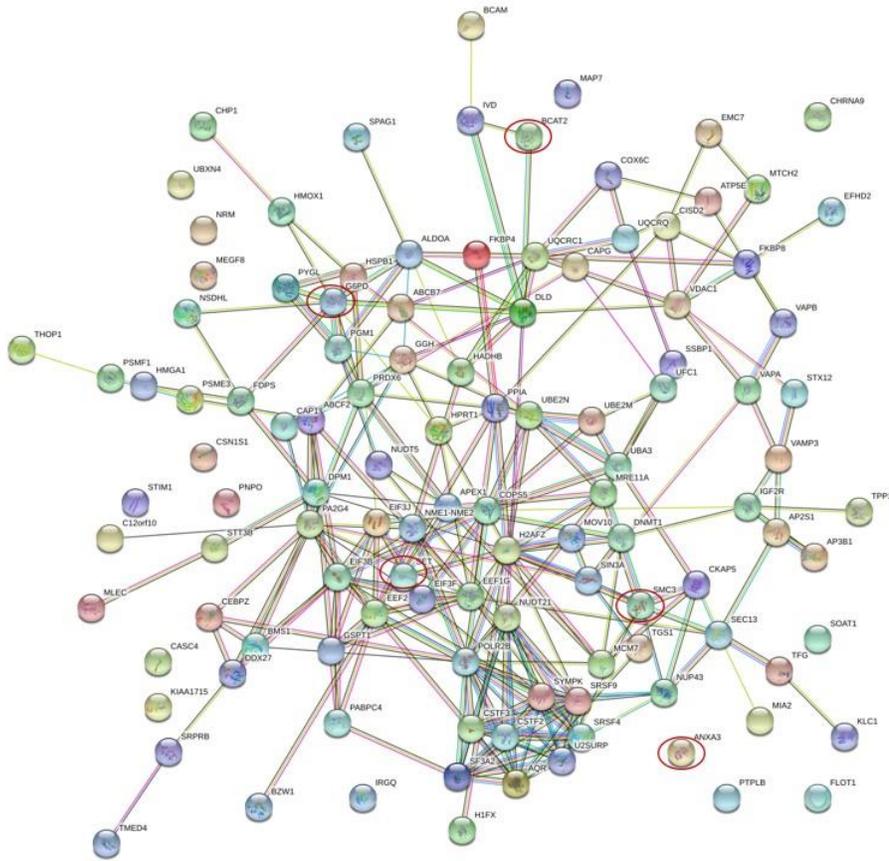


### Componente 1

Proteína modificada	Estequiometria %
ECH1	43.49
LMAN2	40.32
RPN1	90.61
PDIA3	44.63
PSMD2	54.67
XRCC6	58.72
NONO	58.34
SFPQ	58.34
RTCB	49.5

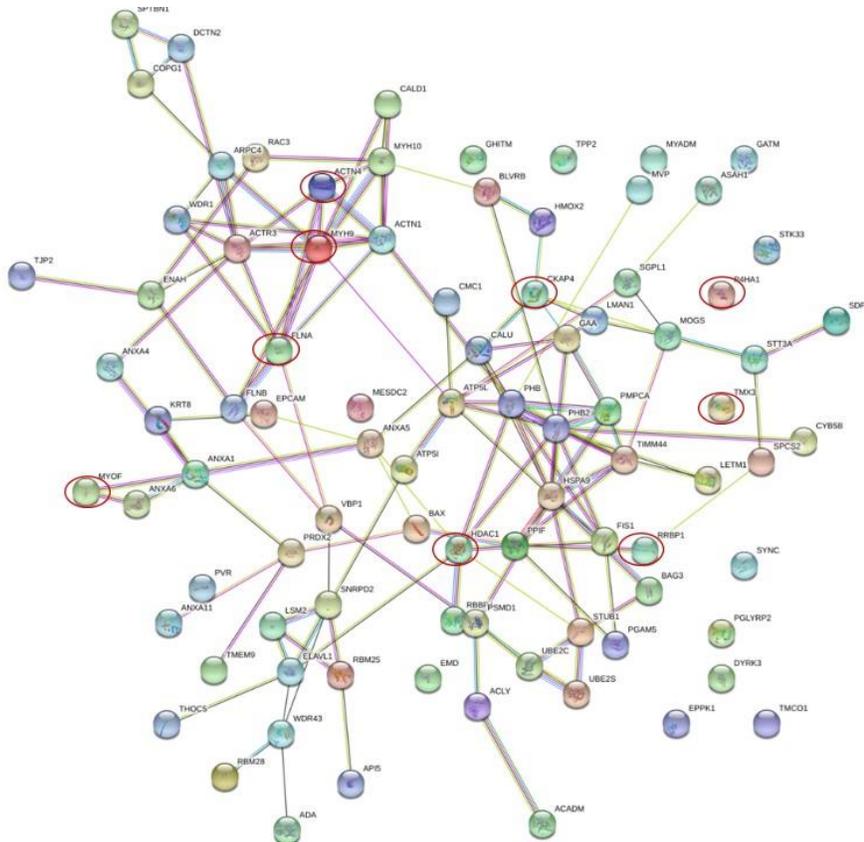
Figura 15 Red de interacción de las proteínas del componente 1 de las células tratadas con MG-132. En los círculos rojos se indica cuáles proteínas se encuentran ubiquitinadas, las cuales se indican en la tabla junto con su estequiometría.

## Componente 2



Proteína modificada	Estequiometría %
BCAT2	71.56
G6PD	54.221
SET	16.04
SMC3	55.18
ANXA3	49.73

Figura 16 Red de interacción de las proteínas del componente 2 de las células tratados con MG-132. En los círculos rojos se indica cuáles proteínas se encuentran ubiquitinadas, las cuales se indican en la tabla junto con su estequiometría.



### Componente 3

Proteínas modificadas	Estequiometria %
ACTN4	43.55
MYH9	65.09
FLNA	92.3
MYOF	45.04
HDAC1	45.61
CKAP4	63.07
TMX3	48.05
RRBP1	40.55
P4HA1	76.5

Figura 17 Red de interacción de las proteínas del componente 3 de las células tratados con MG-132. En los círculos rojos se indica cuáles proteínas se encuentran ubiquitinadas, las cuales se indican en la tabla junto con su estequiometría.

## 8. Discusión de resultados.

Se realizó el análisis de componentes principales debido a que es un método estadístico que nos permite observar qué elementos son los que provocan la variación en el sistema que se está analizando. Primero se realizó este análisis con las 1621 proteínas identificadas mediante Maxquant de las líneas celulares SiHa, HeLa, C33A, y HaCaT, tratadas con MG-132 y sus respectivos controles sin tratamiento, utilizando los datos generados por las tres réplicas experimentales de cada condición.

Como se observa en la figura 2 el uso de tres componentes principales nos agrupa cada una de las líneas celulares en un sector distinto, estableciendo diferencias entre las condiciones, sin embargo no nos muestra diferencias significativas entre las células tratadas y el control. Lo cual nos indica que el uso de este inhibidor a la concentración establecida no está afectando de manera concluyente las proteínas expresadas de forma basal en la célula, lo cual concuerda con el trabajo realizado por Wagner, et al<sup>24</sup>, en donde observan que la cantidad de péptidos ubiquitinados no varía significativamente entre las células, HEK293, en las que se utilizó MG-132 comparado con las células control. Esto nos sugiere que el tratamiento con una concentración de 10  $\mu$ M de MG132 no provoca que la célula entre a un estado de respuesta a estrés, lo cual nos permite estudiar la ubiquitinación de una manera como si la célula estuviera de una manera relativamente normal. Esto nos es favorable debido a que nos facilita el estudio de la ubiquitinación, ya que al bloquear el proteasoma las proteínas marcadas con ubiquitina se mantienen y pueden ser identificadas mediante espectrometría de masas.

Al hacer la ontología génica de las proteínas totales que componen el primer componente podemos ver que el grupo más representado es el de la regulación de procesos multi organismo, el cual contiene tanto regulación de procesos biológicos de la misma célula como del metabolismo de proteínas, regulación de actividad catalítica, entre otros. Mientras que en este grupo también se encuentra regulación de procesos de virulencia. Lo que puede deberse a que SiHa y HeLa son líneas celulares de cáncer cérvico-uterino que poseen el genoma de las variantes del VPH 16 y 18 respectivamente y en consecuencia se separan en polos opuestos en el componente 1 en comparación con las líneas celulares C33A y HaCaT, como se observa en la representación gráfica de la figura 2.

En el segundo grupo más representado se encuentran procesos involucrados en el metabolismo de macromoléculas, en el cual se representan procesos como metabolismo de compuestos nitrogenados, metabolismo de proteínas, metabolismo de RNA, entre otros. Esto puede deberse a que el tratamiento con el inhibidor de proteasoma produce un cierto desbalance en la homeostasis de las proteínas en la célula en ese momento al no poder degradar las proteínas mediante proteasoma y tener que emplear otras vías como puede ser la excreción mediante vesículas.

En los siguientes grupos se identificaron componentes involucrados en la respuesta inmune, procesamiento de mRNA y transporte vesicular, estos grupos nos sugieren una respuesta por parte de la célula para poder eliminar las proteínas de desecho que se acumulan al bloquear una importante vía de proteólisis en la célula como lo es el proteasoma. Induciendo en consecuencia la expresión y utilización de nuevas vías para eliminar las proteínas marcadas para degradación<sup>68</sup>.

Al analizar el segundo componente podemos ver el transporte mediado por vesículas como el grupo más grande representado en la ontología génica. En este grupo observamos transporte de péptidos, secreción, transporte de membrana, entre otros. Esto nos puede estar señalando el destino que sufren las proteínas al no poder degradarse por la vía ubiquitina-proteasoma, donde se opta por la formación de vesículas para realizar autofagia y de esta manera poder degradar a las proteínas de desecho y que sus elementos regresen al ciclo de reuso<sup>68</sup>.

Los siguientes dos grupos representan procesos relacionados con el mantenimiento de la calidad de los procesos que se llevan a cabo en la célula, así como la correcta organización de las proteínas en los diferentes organelos.

El cuarto grupo principal está marcado por el proceso de la muerte celular programada. En este se encuentran proteínas involucradas en la apoptosis, el ciclo celular, los procesos basados en filamentos de actina, entre otros. Esto indica que el MG-132 aun a una concentración tan baja puede llegar a provocar que la célula entre en un estado de muerte debido a la acumulación de factores dañinos<sup>69</sup>.

El tercer componente solo nos muestra una diferencia en el metabolismo central de la célula, con lo cual se puede asumir que la inhibición del proteasoma provoca que la célula se adapte a las condiciones evitando gastar energía en procesos de acumulación de macromoléculas.

Al observar que no había diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con MG-132 se decidió hacer el análisis de componentes principales considerando únicamente las células tratadas con el inhibidor de proteasoma, esto debido a que se busca identificar la mayor cantidad de péptidos ubiquitinados y conocer su estequiometría. Como era de esperarse y como se muestra en la figura 6, también se agrupan en distintos sectores de acuerdo a la línea celular. Donde el primer componente separa las líneas celulares SiHa y HeLa de C33A y HaCaT, lo cual nos indica que la principal fuente de variación entre las proteínas expresadas es la infección por HPV.

La ontología génica de las proteínas del primer componente tiene como grupo principal el procesamiento de RNA. Lo cual nos indica que la célula está conteniendo contra el estrés que se produce en la célula al tener el proteasoma bloqueado. Se van acumulando factores de transcripción que se deberían degradar rápidamente, como RTF1 y XRCC5 que se encargan de la apertura del DNA y la elongación de los mensajeros que se están transcribiendo, además de otras

proteínas involucradas en el procesamiento de los mensajeros como pueden ser SFPQ, SRSF3 y DDX5. En el segundo grupo están las proteínas involucradas en la regulación positiva de procesos biológicos. Lo cual nos dice que la célula trata de regular sus procesos con la finalidad de mantener su homeostasis al estar infectada con HPV que desregula procesos muy importantes para la célula como lo es el ciclo celular.

El segundo componente tiene como grupo principal el metabolismo de mRNA, el cual consta de metabolismo de heterocíclicos, biosíntesis celular, edición de mRNA, entre otros. Esto nos muestra que la célula empieza a editar más mensajero para poder llevar a cabo la respuesta a los factores que amenazan la supervivencia de la célula, como lo es la inhibición del proteasoma.

El siguiente grupo de este componente es el transporte vesicular, el cual como se mencionó anteriormente tiene que ver con la eliminación de las proteínas de desecho que no se eliminaron por el proteasoma<sup>68</sup>.

Y el tercer componente principal de este análisis tiene como grupo más representado la regulación de la calidad de las proteínas, porque posee chaperonas que hacen que las proteínas lleguen a su estructura nativa y puedan realizar sus funciones de una manera correcta.

La reacción de acetilación química tanto con el reactivo ligero como con el pesado se logró con un 95% de efectividad, esto nos indica que si bien la reacción es muy efectiva no llega a cubrir el 100% de los residuos de lisina. Una solución a este contratiempo podría ser el uso de un detergente en el buffer en el que se encuentran las proteínas, como puede ser SDS, además de llevar a cabo la reacción a 37°C, lo cual provocara una desnaturalización de las proteínas para favorecerá que todas las lisinas sean accesibles.

El software Maxquant nos indica que se encontraron 976 péptidos modificados con la acetilación marcada con deuterio, que en consecuencia son los sitios que se observaron ubiquitinados. De estos 261 son los que fueron cuantificados debido a las mismas dificultades que presentaban los datos obtenidos que se explicaron anteriormente, estos péptidos pertenecen a 174 proteínas distintas.

La estequiometría de la ubiquitinación se encuentra entre un 0.25% hasta un 100% de ocupación en distintas proteínas como se muestra en la figura 10, lo cual nos sugiere que la ubiquitinación puede estar presente en algunas proteínas todo el tiempo, lo que podría indicar que estas proteínas blanco son degradadas vía proteasoma principalmente. Aunque esta estrategia presenta una buena manera de detección de la ubiquitinación puede ser complementada con enriquecimiento por inmunoprecipitación o mediante trampas moleculares de para la ubiquitina, además de un fraccionamiento de los péptidos al momento de ser inyectados al espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida para obtener un mayor número de péptidos modificados.

Por otro lado, existen otras proteínas cuya estequiometría de la ubiquitinación es tan baja que podría estar indicando que poseen una regulación muy fina y que esta podría no estar relacionada con la degradación de esta sino con su participación en algún otro proceso celular como pueden ser transferasas de N-acetilgalactosamina o proteínas asociadas a microtubulos, que son proteínas que se encontraron con una estequiometría de 0.25% y 0.5%.

Al hacer un análisis de componentes principales utilizando solo las proteínas marcadas con la acetilación pesada de las líneas celulares tratadas con MG132 se observaron los comportamientos que se presentan en la figura 11, en el que se puede observar como las distintas líneas celulares se distribuyen considerando solo las 174 proteínas ubiquitinadas.

Cuando se examinan los primeros tres componentes y se analizan los patrones de expresión de las proteínas en cada una de las líneas celulares, se puede ver cómo se comportan las líneas celulares con respecto a estos patrones.

En el primer componente, figura 12, se puede ver como C33A y HaCaT se separan de SiHa y HeLa, lo cual nos indica que este componente nos está separando las líneas celulares en infectadas y no infectadas con VPH. Al hacer ontología génica de las proteínas se ve que en el patrón 1 se encuentran procesos biológicos relacionados con homeostasis redox, lo cual tiene que ver con la afectación que provoca el MG132 a la célula<sup>69</sup>. En el segundo patrón que es donde HeLa y SiHa se encuentran disminuidos con respecto a las otras dos encontramos procesos como regulación de la apoptosis, procesos celulares y metabolismo primario, lo cual representa el papel de la infección viral en la regulación de la homeostasis celular<sup>70</sup>.

Al analizar las proteínas modificadas del primer componente utilizando KEGG para conocer cuáles son las vías metabólicas en las que estas proteínas pueden participar, resaltando que se muestran vías inducidas por infecciones por distintos organismos, como la vía de procesamiento y presentación de antígenos o la apoptosis mediada por el ligando de FAS, entre los organismos se encuentran el virus de Epstein Barr<sup>71</sup>, citomegalovirus humano<sup>72</sup>, *Escherichia Coli*<sup>73</sup>, virus del Herpes<sup>74</sup>, virus de inmunodeficiencia humana<sup>75</sup>, entre otros. La proteína ubiquitinada que tienen en común los virus y bacterias antes mencionadas es el miembro 6 de la super familia de receptores del factor de necrosis tumoral<sup>76</sup>, FAS, el cual se encontraba modificado en la lisina 193 con una estequiometría del 58.3%. Al analizar los datos de esta proteína en la base de datos de Uniprot<sup>77</sup> no se encontró información acerca del sitio de ubiquitinación identificado en esta proteína, por lo que se puede asumir que se trata de un nuevo sitio de modificación. FAS es un receptor de muerte en la superficie de la célula que lleva a esta a apoptosis<sup>78</sup>. En nuestro estudio se observó que la expresión de FAS se encuentra reducida tanto en HeLa como en SiHa tratadas con el inhibidor de proteasoma, que son infectadas con HPV y que en estas líneas celulares es donde se encuentra modificada postraduccionalmente por ubiquitinación. Filippova y colaboradores identificaron el

papel del HPV en la degradación de FAS protegiendo así a la célula de la apoptosis mediada por esta proteína<sup>79</sup>. Podemos hipotetizar que esta proteína se degrada vía proteasoma al ser ubiquitinada en la lisina 193 y que por ende no puede cumplir con su función en las células cancerosas infectadas con HPV, mientras que en las líneas celulares no infectadas esta proteína se encuentra en una mayor concentración y no es modificada.

En el segundo componente (figura 13), se observa que la diferencia en los patrones de expresión se encuentra fundamentalmente entre la línea celular HaCaT contra C33A, SiHa y HeLa, lo cual nos indica que los cambios en la expresión de las proteínas es por el hecho de que las células sean cancerosas o no. En el patrón 3 se encuentran procesos biológicos relacionados con citoesqueleto afectando por ende su morfología, lo cual es uno de los marcadores en cáncer, por esto en las líneas celulares SiHa, HeLa y C33A se encuentra subrepresentado. En el patrón 4 que es donde C33A se encuentra sobrerrepresentado están los procesos de metabolismo de compuestos órgano nitrogenados, además de la regulación de las ubiquitin ligasas y la secreción celular.

De las proteínas involucradas en citoesqueleto encontramos Actinina 1, Actinina 4 y las cadenas pesadas de la miosina 9 y 14. Las cuales se encuentran sub expresadas en las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa, que son cancerosas. Estas proteínas están muy relacionadas con adhesiones focales, uniones adherentes, uniones estrechas, regulación del citoesqueleto de actina, entre otras funciones. Estos procesos celulares son muy importantes para mantener la morfología y la adhesión de la célula a la matriz extracelular. En cáncer las células pierden su morfología y las proteínas de anclaje dejan de expresarse provocando que la célula se desprenda y pueda provocar metástasis<sup>80</sup>.

Finalmente en el tercer componente (figura 14), solo HeLa se comporta de una manera distinta al resto de las líneas celulares. En el patrón 5 se encuentran proteínas del ensamble del huso mitótico y la presentación de antígeno, el primero de estos procesos nos indica que HeLa posee pocos mecanismos de regulación para su replicación debido a la cantidad distinta de pares de cromosomas que posee. Y en el patrón 6 solo se encuentra el metabolismo de purinas ribonucleotido trifosfato, con las proteínas KIF4A y SMC3, que participan en la transición de la metafase a la anafase para poder llevar a cabo la replicación de la célula<sup>81,82</sup>.

En la red de interacción de STRING de las proteínas de las cuatro líneas celulares tratadas con MG-132 del primer componente (figura 15), se puede observar que las proteínas ubiquitinadas participan en diversos procesos, como lo es la transferencia de oligosacáridos y la integración de vesículas de membrana. Además otras proteínas ubiquitinadas están involucradas en la reparación de daños al DNA y la edición de RNA, tanto mensajeros como de transferencia.

En la red de interacción de las proteínas del segundo componente principal (figura 16), no existe una interacción que englobe varias de las proteínas modificadas,

tratándose principalmente de proteínas aisladas pero que tienen un papel importante en varios procesos. Un ejemplo es la proteína G6PD que cataliza un paso limitante para la vía de pentosas fosfato, sugiriendo que la ubiquitinación es un mecanismo capaz de regular su función en la célula. SET y SMC3 son dos proteínas que se encuentran ubiquitinadas también y que participan en la apoptosis y el mantenimiento estructural de los cromosomas. BCAT2 cataboliza el primer paso de la ramificación de aminoácidos como leucina, isoleucina y valina.

La red del tercer componente (figura 17), posee proteínas ubiquitinadas que están involucradas en su mayoría en la estructuración del citoesqueleto de la célula, para poder mantener forma, hacer contactos focales, formación de vesículas, ramificación de los filamentos de actina entre otros. Por lo que se puede inferir que la ubiquitinación juega un papel importante en la reorganización del citoesqueleto en la célula, así como en la formación de vesículas. Otra de las proteínas modificadas encontradas en este componente es la HDAC1<sup>40</sup>, la cual es una desacetilasa involucrada en la desacetilación de una gran cantidad de proteínas y por ende en su regulación funcional. La ubiquitinación de esta proteína nos sugiere un mecanismo mediante el cual podría estarse regulando la función de esta enzima y/o que vías utiliza para su degradación y en consecuencia las importantes implicaciones que esta regulación tendría a su vez en los procesos de regulación de la acetilación que sufren varias proteínas en la célula.

## 9. Conclusiones.

La metodología aquí propuesta muestra una nueva manera de analizar la estequiometría de esta modificación utilizando isótopos pesados, ya que en la actualidad existen muy pocas estrategias que permitan conocer la estequiometría de esta modificación. Sin embargo esta técnica es mejorable, y una manera de lograr esto sería haciendo un enriquecimiento de las proteínas ubiquitinadas mediante inmunoprecipitación para de esta forma obtener sólo los péptidos ubiquitinados para posteriormente llevar a cabo la estrategia aquí planteada, además de eso se puede realizar un fraccionamiento de los péptidos por hidrofobicidad para poder obtener una mejor cobertura de los péptidos detectados mediante espectrometría de masas.

La estequiometría de la ubiquitinación es muy variable en la célula, encontrándose distribuida en un rango comprendido entre el 0.5% al 100%, esto nos muestra que es una modificación muy variable y que depende del tipo de proteína la estequiometría que presentará, sin embargo es importante resaltar que la mayoría de los péptidos identificados presentaron una estequiometría mayor al 75%, lo cual nos sugiere que es una modificación que actúa con una estequiometría muy alta. A pesar de que esta técnica nos permite conocer la estequiometría de la ubiquitinación aún es muy difícil asignar una función en concreto para esta debido al pequeño número de péptidos que se lograron identificar, pero es una muy buena aproximación para llevar a cabo un análisis más a fondo del problema.

El uso de inhibidores de proteasoma permite identificar nuevos sitios de ubiquitinación de proteínas que son marcadas para su degradación vía proteasoma ya que previene que las proteínas marcadas sean degradadas como lo harían de manera normal. Como es el caso de FAS que en las líneas celulares cancerosas infectadas por HPV, SiHa y HeLa, se encontró ubiquitinada y subexpresada. Esto nos indica nuevas vías que son alteradas por la acción del virus en la célula y cómo el virus participa evitando que la célula entre en un proceso de apoptosis.

Al analizar las proteínas ubiquitinadas en las líneas celulares elegidas se pueden observar distintos patrones de expresión de proteínas, como se observa en las figuras 12, 13 y 14, lo cual nos permiten caracterizar estas líneas celulares por sus distintos procesos, además de mostrar cómo la regulación de la ubiquitinación en estas proteínas puede favorecer o limitar ciertos procesos que provocan que una célula normal pueda convertirse y comportarse como una célula cancerosa, al estar infectada con VPH.

Aún queda mucho que entender acerca de esta modificación postraduccional, sin embargo el uso de las herramientas proteómicas permite conocer más acerca de ella y los procesos en los que está participando.

## 10. Perspectivas.

- Realizar técnicas de enriquecimiento de la ubiquitinación en las mismas líneas celulares para poder identificar una mayor cantidad de péptidos modificados.
- Ampliar el estudio a distintas líneas celulares para conocer sus patrones de ubiquitinación.
- Generar una base de datos de la estequiometría de la ubiquitinación en cada uno de los sitios de modificación identificados.
- Caracterización del tipo de cadena de ubiquitina unida a la lisina 193 de la proteína FAS.
- Analizar la interrelación entre la acetilación y la ubiquitinación en los residuos de lisina de las proteínas.

## Bibliografía.

1. ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. & MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786–94 (1964).
2. Schölz, C. *et al.* Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 415–425 (2015).
3. Gil, J., Ramírez-Torres, A. & Encarnación-Guevara, S. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *J. Proteomics* **150**, 297–309 (2017).
4. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. & Chandu, D. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* **31**, 137–155 (2006).
5. Husnjak, K. & Dikic, I. Ubiquitin-Binding Proteins: Decoders of Ubiquitin-Mediated Cellular Functions. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 291–322 (2012).
6. Tenno, T. *et al.* Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes to Cells* (2004). doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00780.x
7. Komander, D. & Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
8. Fontenot, H. B. Urine-Based HPV Testing as a Method to Screen for Cervical Cancer. *Nurs. Womens. Health* **19**, 59–65 (2015).
9. Zur Hausen, H. Papillomavirus infections - A major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (1996). doi:10.1016/0304-419X(96)00020-0
10. Rodríguez, A. C. *et al.* Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J. Natl. Cancer Inst.* (2008). doi:10.1093/jnci/djn044
11. Stokley, S. *et al.* Human papillomavirus vaccination coverage among adolescents, 2007-2013, and postlicensure vaccine safety monitoring, 2006-2014--United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* (2014).
12. Castle, P. E. *et al.* A Prospective Study of Age Trends in Cervical Human Papillomavirus Acquisition and Persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis.* (2005). doi:10.1086/428779
13. Sales, K. J. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. in *Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects* (2014). doi:10.1002/9781118826621.ch12
14. Ramqvist, T., Grün, N. & Dalianis, T. Human papillomavirus and tonsillar and base of tongue cancer. *Viruses* (2015). doi:10.3390/v7031332
15. Castellsagué, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* (2008). doi:10.1016/j.ygyno.2008.07.045

16. Smith, E. M. *et al.* Prevalence and persistence of human papillomavirus in postmenopausal age women. in *Cancer Detection and Prevention* (2003). doi:10.1007/978-81-322-1521-9\_6
17. Workowski, K. a & Bolan, G. a. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recomm. Rep.* (2015). doi:10.1097/00008480-200308000-00006
18. Mammas, I. N., Sourvinos, G. & Spandidos, D. A. The paediatric story of human papillomavirus. *Oncology Letters* (2014). doi:10.3892/ol.2014.2226
19. Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H. U. & O'Connor, M. J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* **73**, 6209–19 (1999).
20. Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y. & Gu, W. Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. *Cell* (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.03.025
21. Li, S. *et al.* Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation. *Front. Microbiol.* **10**, 1–11 (2019).
22. Wood, E. J. Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory. *Bambed* (2006).
23. Prus, G., Hoegl, A., Weinert, B. T. & Choudhary, C. Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry. *Trends in Biochemical Sciences* (2019). doi:10.1016/j.tibs.2019.06.003
24. Wagner, S. A. *et al.* A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.013284 (2011).
25. Zhang, X., Huang, Y. & Shi, X. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4257–4272 (2015).
26. Azevedo, C. & Saiardi, A. Why always lysine? The ongoing tale of one of the most modified amino acids. *Adv. Biol. Regul.* **60**, 144–150 (2016).
27. Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science (80- )*. **144**, 559 (1964).
28. Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491–496 (1999).
29. Allis, C. D. *et al.* New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell* **131**, 633–636 (2007).
30. Min, S. W. *et al.* Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* **67**, 953–966 (2010).
31. Gray, S. G. & Ekström, T. J. The human histone deacetylase family. *Exp.*

- Cell Res.* **262**, 75–83 (2001).
32. Kim, H. J. & Bae, S. C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* **3**, 166–179 (2011).
  33. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
  34. Kovacs, J. J. *et al.* HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* **18**, 601–607 (2005).
  35. Zhang, X. *et al.* HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Mol. Cell* **27**, 197–213 (2007).
  36. Li, Y., Shin, D. & Kwon, S. H. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS Journal* **280**, 775–793 (2013).
  37. Lombard, D. B. *et al.* Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–8814 (2007).
  38. Nakagawa, T., Lomb, D. J., Haigis, M. C. & Guarente, L. SIRT5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle. *Cell* **137**, 560–570 (2009).
  39. Nakamura, Y., Ogura, M., Ogura, K., Tanaka, D. & Inagaki, N. SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. *FEBS Lett.* **586**, 4076–4081 (2012).
  40. Glozak, M. A. & Seto, E. Acetylation/deacetylation modulates the stability of DNA replication licensing factor Cdt1. *J. Biol. Chem.* **284**, 11446–11453 (2009).
  41. Weinert, B. T. *et al.* Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in E.coli. *Mol. Cell* **51**, 265–272 (2013).
  42. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Widespread and enzyme-independent N<sup>ε</sup>-acetylation and N<sup>ε</sup>-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **288**, 29036–29045 (2013).
  43. Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90396-4
  44. Lange, O. F. *et al.* Recognition Dynamics Up to Microseconds Revealed from an RDC-Derived Ubiquitin Ensemble in Solution. *Science* (80-. ). **320**, 1471–1475 (2008).
  45. Kleiger, G. & Mayor, T. Perilous journey: A tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends in Cell Biology* **24**, 352–359 (2014).
  46. Mevissen, T. E. T. & Komander, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 159–192 (2017).

47. Renatus, M. *et al.* Structural Basis of Ubiquitin Recognition by the Deubiquitinating Protease USP2. *Structure* **14**, 1293–1302 (2006).
48. Hu, M. *et al.* Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* **111**, 1041–1054 (2002).
49. Dalton, W. S. The proteasome. *Semin. Oncol.* (2004). doi:10.1053/j.seminoncol.2004.10.012
50. Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2009). doi:10.1038/nrm2630
51. Price, C. T. D., Al-Quadani, T., Santic, M., Rosenshine, I. & Abu Kwaik, Y. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* (80-. ). (2011). doi:10.1126/science.1212868
52. Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. & Kawashima, S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J. Biochem.* (1996). doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021280
53. Stes, E. *et al.* A COFRADIC protocol to study protein ubiquitination. *J. Proteome Res.* (2014). doi:10.1021/pr4012443
54. Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* (1995).
55. Kitano, H. Systems biology: A brief overview. *Science* (2002). doi:10.1126/science.1069492
56. Yates III, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* (1998).
57. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* (1999). doi:10.1038/13690
58. Li, J., Steen, H. & Gygi, S. P. Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol. Cell. Proteomics* (2003). doi:10.1074/mcp.M300070-MCP200
59. Ong, S. E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* (2002). doi:10.1074/mcp.M200025-MCP200
60. Ross, P. L. *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* (2004). doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200

61. Dayon, L. *et al.* Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* **80**, 2921–2931 (2008).
62. Baeza, J. *et al.* Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M114.581843
63. Gil, J. *et al.* Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 18129–18144 (2017).
64. Hair, J. J. F., Black, W. C., Babin, B. J. & Anderson, R. E. Multivariate Data Analysis: A Global Perspective. *Entrep. Reg. Dev.* (1993). doi:10.1080/08985629300000020
65. Merrifield, P. R. & Cattell, R. B. Handbook of Multivariate Experimental Psychology. *Am. Educ. Res. J.* (1968). doi:10.2307/1161821
66. Rodríguez, M. D., Ariza, Á. L. G., Pérez, A. H. & Mora, M. E. D. Análisis de componentes principales. in *Introducción al análisis estadístico multivariado aplicado. Experiencia y casos en el Caribe colombiano* (2018). doi:10.2307/j.ctvvn8c9.5
67. Han, Y. H., Moon, H. J., You, B. R. & Park, W. H. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* **22**, 215–221 (2009).
68. Longatti, A. & Tooze, S. A. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death and Differentiation* (2009). doi:10.1038/cdd.2009.39
69. Guo, N. & Peng, Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* (2013). doi:10.1111/j.1743-7563.2012.01535.x
70. Boda, D. *et al.* Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *International Journal of Oncology* (2018). doi:10.3892/ijo.2018.4256
71. Tanner, J. E. & Alfieri, C. Epstein-barr virus induces Fas (CD95) in T cells and fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* (1999).
72. Skaletskaya, A. *et al.* A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001). doi:10.1073/pnas.141108798
73. Hofman, P. *et al.* Increased Escherichia coli phagocytosis in neutrophils that have transmigrated across a cultured intestinal epithelium. *Infect. Immun.* (2000). doi:10.1128/IAI.68.2.449-455.2000
74. Sieg, S. *et al.* Herpes simplex virus type 2 inhibition of Fas ligand expression. *J. Virol.* (1996).
75. Mueller, Y. M. *et al.* Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific

- CD8+ T cells. *Immunity* (2001). doi:10.1016/S1074-7613(01)00246-1
76. Waring, P. & Müllbacher, A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and Cell Biology* (1999). doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x
  77. Hancock, J. M., Zvelebil, M. J. & Zvelebil, M. J. UniProt. in *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology* (2004). doi:10.1002/9780471650126.dob0721.pub2
  78. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas Death Factor. *Science* (80-. ). (1995). doi:10.1126/science.7533326
  79. Filippova, M., Parkhurst, L. & Duerksen-Hughes, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M401172200
  80. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
  81. Kurasawa, Y., Earnshaw, W. C., Mochizuki, Y., Dohmae, N. & Todokoro, K. Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J.* (2004). doi:10.1038/sj.emboj.7600347
  82. Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. & Peters, J. M. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J. Cell Biol.* (2000). doi:10.1083/jcb.151.4.749

## Anexos.

Proteína	CP1	HaCaT	C33	HeLa	SiHa
ECH1	-0.891302412	967130434.9	1048026112	1907176343	2638313452
AATC	-0.877040907	260798098.3	369314214.1	1295296163	717660180.7
MOES	-0.876962137	3985412712	1669617854	15341771256	18029180997
FUBP2	-0.867217584	592681776.2	692185406.6	1693118224	1648245442
KAD2	-0.861018833	583053098	837903425.1	3789695215	1942459572
FUBP1	-0.858282158	669637390.5	491090697.4	2106809497	1177681272
LAP2A	-0.842109494	19993898.78	11869561.29	114884426.3	157765731.8
PRDX4	-0.830466877	1932422748	3296226848	8480089654	4844844446
PRDX1	-0.816052226	560650410.9	704167799.5	1468223418	890606017.3
ANXA2	-0.80368895	13343040898	4784831879	17814336559	24628991730
TSN	-0.800860713	241404478.8	454816538.6	1299778288	632080010.7
PLIN3	-0.794860864	379591820	854524090	1511255794	971221738.6
CCHL	-0.792246026	25674072.07	125252664.8	219302257.2	181592892.1
SODC	-0.788439549	2199839725	2505639180	5202061130	5079195299
RS5	-0.774570849	201564890.6	214294715.3	640538941.4	454051447.5
SPB6	-0.756979303	79171886.09	44686840.37	209617241.1	219093129.3
TCP4	-0.708636048	2910253474	1505394190	4911888724	5967164407
UBP5	-0.708292673	145248454.8	141018625.8	415665303	217497346.2
DBLOH	-0.690715002	122000525.3	255550014.8	314205964.3	269086584.4
DDX43	-0.689724475	30853545.33	29603718.33	132479333	41821648.53
TBCA	-0.681854715	131003339.6	477034850.3	1266661088	374745640.4
RTN4	-0.675612921	567150337.3	996770877.2	952931054.4	1291172788
RAB35	-0.667744457	51553290.49	33903346.06	107469228.2	183341535
RPAP3	-0.652135787	33514834.57	33072570.15	63299345.16	41241619.53
CALX	-0.621283853	1219835815	1495413824	2125158215	1410097971
ZN292	-0.61590143	57940870.99	439990572.9	594758791.2	966091706.5
ENAH	-0.601419704	134031236.1	239991686.1	268845705	181503340.5
PSMD9	-0.54344435	132512667.6	92929593.12	157698790.6	281118796.2
GG6L2	-0.540832612	47814677.65	52845874.7	94976551.31	89812876.44
LC7L2	0.593481971	241450952.1	299043321.5	258195247.4	195663992.4
SDHA	0.634039379	534513773.2	955131931.3	392366085.8	638600255
MDHM	0.644245003	476151391	929008685.1	420020006.8	198301914.5
NDUS3	0.651778284	245410390.2	408311043.1	217134649.1	181566707.5
EIF3L	0.658724512	191736917.2	210742397.4	87615470.48	106122976.2
G3P	0.664588379	6764852316	4268445093	3540805991	1903960466
ACTB	0.675012005	62505861078	31943163611	31327930810	27679130882
RS20	0.678491369	924547459.9	590470375.5	592431463.8	286808387.2
RS3A	0.69493012	2747613131	1187259014	1152333356	581194956.7

CSK21	0.6975836	409137332.9	677924532.2	346268866.9	231810165.2
HSP7C	0.704355904	17850470902	13069968143	10990890323	6460579331
EF1D	0.706103052	1790272108	956302580.6	1006500195	659832924.6
ADT3	0.707679386	628473455.2	500224086.3	265156866.4	505322024.6
FAS	0.740757687	2277665071	4650370808	2347822345	1628606157
HYOU1	0.748647471	1762217918	1187365803	950477720.2	769807035.4
CDC37	0.752922857	444852823.8	465687240.8	297233032.2	139322122
TCPZ	0.754527084	827839185.7	1503647608	672256971.3	540607714.2
LKHA4	0.764461453	187258347.6	171029483.2	145956381.2	136676509.2
IF4A1	0.783617961	1905431062	2112060514	1197963160	949557306.4
DDX17	0.784821387	992798213.4	752322333.3	340147419.7	475945761
LMAN2	0.805938183	153792927.2	280005996.7	82188423.33	92003550.53
NP1L1	0.828989834	267534757.7	421570773.7	196754838.6	220958569.3
ACTS	0.836407258	9018899421	6435616113	1620028373	2642178811
HS90B	0.840125098	16492413019	14567184512	11019737764	4863768212
RL14	0.840793775	1282647362	915039544.5	496400759.3	196022189.1
ROA2	0.840909907	7406001114	13480625807	3918855309	4217208984
P5CS	0.848463485	390334639.8	457446775.5	173593665.3	141995684.8
LONM	0.849710095	666016366.3	454529451.6	278227310	266912088.6
PRS6A	0.854039741	278752911.5	229387627.5	135831772.9	173542056.4
TBA1B	0.860549876	13673522313	25368496038	7604506882	7369124884
RB11A	0.862740437	1052054694	1006148455	311832356	531135515.2
HS90A	0.879499215	20733071963	14798743767	7786864107	4400195623
HNRPQ	0.88569364	519447130.3	681734542.4	198287586.6	220189401.5
SEPT2	0.913975851	555532116.6	579179893.3	251901520.9	291550237.1
RTCB	0.918373587	121712668.1	126278222.8	57685476.72	62971497.42
RPN1	0.927920682	2388367005	2702522845	1075670407	1121722260
NONO	0.928225406	3159334464	4543887207	1198037840	1920476042
XRCC6	0.931009075	2005135638	2626645685	1001597546	1269180178
PDIA3	0.936076581	10702769559	12585827091	3098498609	3501382717
PSMD2	0.944312508	1252882708	1103204179	436106779.7	412323513.9
CLH1	0.954740107	3449736531	3185836689	798230032.9	1426995848
SFPQ	0.9684312	4133298836	5305983605	1330066762	1817954646
TERA	0.97119646	4765335276	4673607014	2076303428	1336561111

Anexo 1. Patrones de expresión e intensidad de las proteínas representativas del primer componente principal del análisis de las líneas celulares tratadas con MG132.

Proteina	CP2	HaCaT	C33	HeLa	SiHa
FLNA	-0.863647222	7684564751	2533183741	4508182767	4663108699
PLAK	-0.852378022	255004464.8	16807072.3	58774636.07	87367393.87
K2C8	-0.827002484	34962191030	731087262	5729871459	6058469699
K1C10	-0.819669655	642407328.6	152502892.4	261026739.7	554472108.9
PEPL	-0.809731073	1152902183	203487141.4	292222414	524102269.6
MYOF	-0.803043524	1913295945	34341709.38	317332306	791555111.8
K1C19	-0.788454494	15990737993	208911420.4	1046021817	5150899295
G6PD	-0.764656507	538748555.7	171424747.9	456428872	324669191.3
ACTN4	-0.756035631	9495191276	1984347696	3861500314	5273273534
RRBP1	-0.755287087	2562734101	282032835.5	571233127.3	638775066.1
ACTN1	-0.725684981	2576998053	549471647.3	393498125.7	1436683299
MYH9	-0.684964964	5991503638	1933640544	1107231801	2154673783
K22E	-0.678286661	381627570.1	120674897.9	83508148.94	202520592.6
DESP	-0.662353521	495712939.9	85137275.32	330589037.3	174393050.6
ANXA3	-0.660737963	878380708.8	35935230.31	637768179.7	246148063.2
1433Z	-0.639120139	2847428532	804527314.8	1492688392	546971850.3
MYH14	-0.603901708	1508799898	489199394.3	229626897.5	332846269
RFIP4	-0.296635191	132141977.8	93690544.46	158533138.7	205095324.3
BCAT2	0.543417663	313049329.3	732915292.2	204813676.3	427532538.3
DNJA1	0.561860401	527607646.9	1736834430	155441338.8	392720216.8
ENPL	0.584381281	12902652927	17725529468	12415026201	6932426726
PDIA4	0.594309063	3998890581	13422119255	4627707361	7019979815
RAB1A	0.628452225	154626305.2	380730377	239419758.4	109288714.8
CPNE3	0.633067249	30150268.5	63653748.73	39880087.22	35000139.81
HS71B	0.65122181	16839218485	38653856842	30049115754	7880359684
BAG2	0.652964951	144028403.8	532202680.8	509819223.8	312235483.8
GRAP1	0.686982782	32826517.94	104949417.8	55076495	89521670.11
ACADM	0.692475024	162150850.1	399311322.6	196734306.4	69068240.65
PTBP1	0.692748148	1454012460	3199794495	2449155638	1498602286
QCR2	0.701787273	470278429.2	1358902843	294769871.5	603141952.6
ARL8B	0.710233139	48163121.52	201670334.4	55089747.31	57095142.24
ATPO	0.722743948	429372934.5	1302991918	284836436.5	296399195.3
TMX3	0.746327008	43350777.26	268641902	43324552.51	123064600.1
STML2	0.752215142	363019446.3	1436309178	175739282.6	192031473.2
CH60	0.765600593	8555462863	21683625718	7724991208	4925081110
KAP2	0.780236103	97788513.49	218458578.2	118945036.7	137095358
P4HA1	0.80014302	73943945.57	806999197.1	90973964.5	49400269.06
MAGA4	0.812669212	27825086.28	4745664186	58775642.53	43397116.71
IPYR2	0.825449106	21317157.63	110403422.6	62801523.42	65489244.84

CKAP4	0.848608541	972880992.9	3377606591	2106671916	1739514846
-------	-------------	-------------	------------	------------	------------

Anexo 2. Patrones de expresión e intensidad de las proteínas representativas del segundo componente principal del análisis de las líneas celulares tratadas con MG132.

Proteína	CP3	HaCaT	C33	HeLa	SiHa
SCMC1	-0.763617746	187723302.1	206000500.6	122252106.8	402969594.7
KIF4A	-0.736996143	41000063.48	38189077.88	33538416.43	59690805.26
H2AZ	-0.730821509	150241116.6	62504489.65	60047475.57	316827581.6
MOV10	-0.701126864	77823042.1	149445333.9	65622379.28	262812831.6
TMM43	-0.699808513	326418451.7	733287043.7	323688888.8	1108256231
MPRI	-0.681259543	399980873.4	407395652.2	347409779.1	780518287.2
RAB5B	-0.679620014	31128780.98	44485121.91	58183919.3	155413237.7
SMC3	-0.652966497	164114710.7	538314315.2	198915368.2	550669664.8
PAPS2	-0.625295043	48289887.15	61408921.6	70832612.96	256832055.1
ADT2	-0.622712844	1934761588	2000514991	997542311.6	2335802638
UBP2	-0.589331	230444073.5	68671284.96	34169946.27	222080147.1
SWP70	-0.586344058	74355638.77	122485903.9	130053643.8	197623471.7
ANR17	-0.565471698	24416738.71	25456136.06	17219382.68	34042383.62
GTR3	0.61898251	443133708.5	113508258.9	269433257.8	39855583.04
GRP75	0.642350385	4487230093	7856445787	9076527209	2954778195
SYYC	0.691765736	211800013	94049505.98	305664955.9	51642726.44
PSMD7	0.699637579	570675287.9	441204143.2	495761714.7	291615039.6
BAG6	0.70159641	143371451.5	155218280.6	232588095.8	119205797.8
TPIS	0.703208656	517497864.7	672914690.1	3834813472	1191035475
RAN	0.703236853	1991153826	1594412573	2490159816	614482699.3
RS19	0.728329113	1673565121	1387315807	2301260523	1389501111
ALDOA	0.843872165	6178390484	3575165801	7500405672	2522984466
F10A1	0.885906961	219553796.1	185306798.4	394601284	129925848.7

Anexo 3. Patrones de expresión e intensidad de las proteínas representativas del tercer componente principal del análisis de las líneas celulares tratadas con MG132.