



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

“Regulación de la fosfatasa Dusp11 durante estrés celular”

Peters, Tomás

Directora: Dra. Boccaccio, Graciela L.
Tutora: Dra. Fernández Alvarez, Ana J.

2022





Este trabajo de Tesina para acceder al título de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular, fue realizado en el laboratorio de Biología Celular del ARN del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA); (Fundación Instituto Leloir) bajo la dirección de la Dra. Boccaccio, Graciela L. y la tutoría de la Dra. Fernández Alvarez, AnaJ.



Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a la Universidad Nacional de La Plata y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas por brindarme un espacio de excelentísima calidad donde realizar mis estudios, pero también un espacio donde transitar estos maravillosos años de mi vida. No puedo evitar sentirme un privilegiado de haber cursado esta carrera tan linda en una universidad pública, gratuita y de calidad.

Quiero agradecer también al Instituto Leloir y al Laboratorio de Biología Celular del RNA por darme un lugar donde crecer como futuro profesional y realizar mi trabajo final de licenciatura. A todas las personas del laboratorio 309, siempre dispuestos a ayudarme con lo que necesitara. A Graciela, mi directora, por la guía constante. A Ana, mi tutora, por la paciencia y buena disposición siempre. Por darme todas las herramientas que necesitaba en la mesada.

No puedo dejar pasar la oportunidad para agradecerle a mis amigos y amigas. Pilares fundamentales en la vida de cualquier estudiante, o al menos de este. Con ellos todo fue más fácil. Incontables horas y termos de mate juntos.

A los de acá y a los de allá. Por estar siempre.

Por último quiero agradecer a mi familia. Sin ellos y su constante apoyo nada de esto hubiera sido posible.

En particular a mi mamá, Maria. Por enseñarme por que vale siempre la pena seguir.

A mi papá, Walter. Quien sin saberlo un día me dio a entender que la cosa iba por acá y con quien me encantaría poder estar compartiendo este momento. Esto va por vos.

Por los que están y por los que ya no están. Este logro que siento propio, es también de todos ustedes.



Resumen

En respuesta a diversos estímulos nocivos, las células eucariotas activan una vía altamente conservada, llamada respuesta integral al estrés (ISR), para restablecer la homeostasis celular. El evento principal de esta vía es la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α lo que conduce a un decaimiento de la síntesis proteica global y la inducción traduccional de ciertos factores, entre los que se encuentra el factor de transcripción ATF4 que junto a otros promoverán un nuevo programa transcripcional. Uno de los procesos característicos y conservados en la evolución es la formación de los gránulos de estrés (SGs). Estos, son un tipo específico de las denominadas organelas sin membranas en los que se agregan proteínas y ARN mensajeros silenciados. En la búsqueda por comprender los mecanismos que regulan el ensamblado y disolución de estos SGs, desde el laboratorio de la Dra Graciela Boccaccio se realizó un ensayo para encontrar reguladores de estas estructuras. En dicha búsqueda realizada en *Drosophila* se destacó el ortólogo de Dusp11. Esta es una fosfatasa de ARN que remueve los fosfatos gamma y beta en el extremo 5' de ARNs tri- y di- fosforilados⁹ y entre sus blancos se destacan diversos RNAs transcriptos por la polimerasa III, como Alu RNAs y Vault RNAs. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que los niveles de Dusp11 disminuyen frente al estrés celular oxidativo agudo. Basándonos en los antecedentes mencionados nos propusimos como objetivo general de esta tesis de grado investigar los mecanismos subyacentes a la degradación de Dusp11 durante el estrés celular agudo. Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis indican que los niveles de Dusp11 disminuyen rápidamente durante la exposición a arsenito como agente estresor, en células A549. Además encontramos que esta disminución correlaciona temporalmente con el aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado. Por otro lado encontramos que Dusp11 es una proteína con una elevada tasa de recambio que desaparece rápidamente al inhibir la síntesis proteica y exhibe una vida media de aproximadamente 1 hora. Por último, nuestros análisis tanto *in silico* como en cultivo celulares utilizando inhibidores selectivos de la función lisosomal (cloroquina) nos permiten proponer que la autofagia mediada por chaperonas (CMA) posee un rol clave en la degradación de esta fosfatasa de RNA, Dusp11.



Índice

1.Introducción	7
1.1 Respuesta integrada al estrés	7
1.1.1 Quinasas y detención traduccional global	7
1.1.2 Gránulos de estrés	9
1.2. DUSP11	10
1.2.1 DUSP11: una fosfatasa que regula transcritos de Pol III	10
1.2.2 Dominios proteicos de Dusp11	11
1.2.3 Dusp11 en la respuesta inmune innata	12
1.2.4 Dusp11 en el estrés celular	15
1.3 Mecanismos de degradación proteica	17
1.3.1 El proteosoma	17
1.3.2 Autofagia mediada por chaperonas (CMA)	19
2. Hipótesis y objetivo	21
2.1 Hipótesis	21
2.2 Objetivo	21
3.Resultados y discusión	22
3.1 Dusp11 desaparece frente a estrés	22
3.2 La fosforilación de eIF2 α correlaciona temporalmente con la desaparición de Dusp11	24
3.3 Dusp11 es una proteína de corta vida media.	26
3.4 Presencia de motivos consenso para CMA en Dusp11	28
3.5 La autofagia mediada por chaperonas participa en la degradación de Dusp11.	33
4. Conclusiones	36
5. Materiales y métodos	39
6. Bibliografía	43



1.Introducción

*Sólo existen los átomos y el espacio vacío.
Todo lo demás es opinión.*

Demócrito.

1.1 Respuesta integrada al estrés

1.1.1 Quinasas y detención traduccional global

La respuesta integrada al estrés (ISR) consiste en una serie de reacciones complejas y evolutivamente conservadas que son llevadas a cabo por las células al ser expuestas a ciertos estímulos nocivos, los cuales pueden ser tanto intrínsecos como extrínsecos. Los cambios extremos de temperatura, la exposición a toxinas, la falta de nutrientes, la presencia de agentes oxidantes o de metales pesados, la presencia de proteínas anómalas, mal plegadas o sin plegar, cambios en la osmolaridad y hasta el daño mecánico pueden disparar la respuesta a estrés¹. Esta respuesta es una forma de regulación de la expresión génica a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional que tiene como fin priorizar ciertas funciones celulares ante otras, como por ejemplo la reparación de daños, y busca así preservar la integridad celular y restaurar el equilibrio interno frente a condiciones ambientales que son desfavorables. Debido a los daños que puede ocasionar el estrés, una respuesta rápida y transitoria resulta vital para los organismos. Sin embargo, cuando los efectos del estrés no pueden ser mitigados y la homeostasis no puede ser restaurada, la ISR conducirá a la apoptosis, eliminando las células dañadas²⁻³.

La presencia de agentes estresores es sensada en células de mamífero por cuatro quinasas especializadas: PERK, GCN2, HR1 y PKR. Las cuatro quinasas de eIF2 comparten extensa homología en sus dominios catalíticos quinasas pero poseen distintos dominios regulatorios. Cada quinasas de eIF2 se dimeriza u oligomeriza y autofosforila para su activación completa. Sin embargo, cada quinasas responde a distintos estreses fisiológicos y ambientales, lo que refleja sus mecanismos regulatorios únicos. En condiciones de estrés celular, dichas quinasas fosforilan la serina 51 de la subunidad alfa del factor de iniciación eIF2, y esto provoca una reducción de la eficiencia de inicio de la traducción y un enlentecimiento general de la síntesis proteica. El factor eIF2 cumple un rol clave en el inicio de la traducción mediante el reconocimiento del codón de inicio AUG. Cuando se fosforila la subunidad alfa, el intercambio GDP/GTP que ocurre en cada ciclo de iniciación se ve desfavorecido y se reduce la tasa de inicio de la mayoría de los mRNAs. A su vez, la fosforilación de eIF2 facilita la traducción de ciertos ARN mensajeros (ARNm) específicos, como por ejemplo el



factor de transcripción ATF4. De esta forma, la ISR permite entonces restablecer la homeostasis fisiológica al reducir la traducción general y regular al alza la síntesis de algunas proteínas que promueven un nuevo programa transcripcional¹.

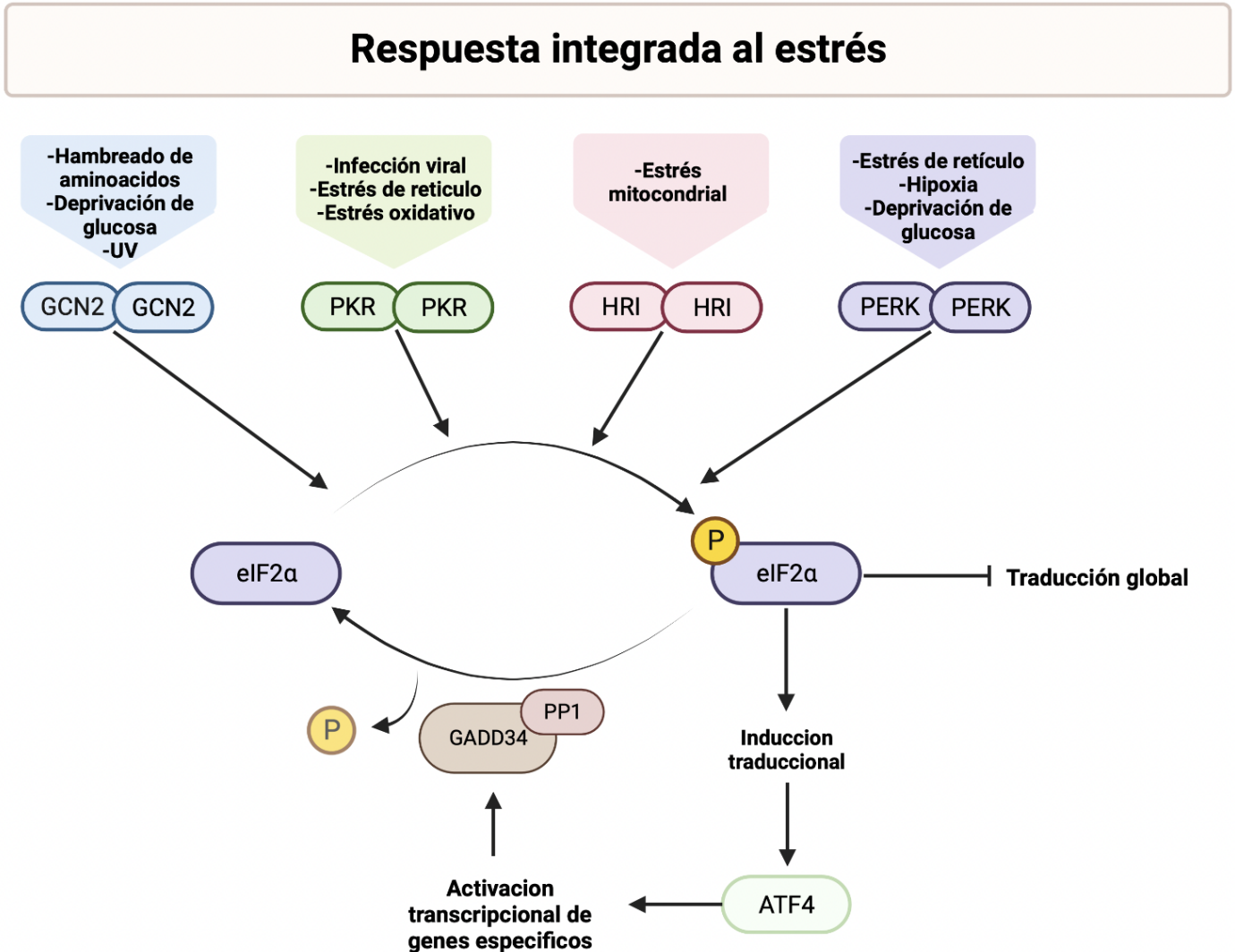


Figura 1. Respuesta integrada de estrés. Las quinasas PERK, GCN2, PKR, y HRI responden a diversos agentes estresores fosforilando a eIF2α. PeIF2α causa la inhibición de la traducción global global y, río abajo, la inducción traduccional de ATF4 que conducirá a la activación transcripcional de genes específicos. (Adaptado de Way and Popko, 2016; Girardin et al., 2021).



1.1.2 Gránulos de estrés

Los mRNAs silenciados durante la ISR no son degradados y al recuperarlos de las células estresadas pueden ser traducidos *in vitro* con alta eficiencia. Recientemente se ha descubierto que estos mensajeros se acumulan en cuerpos citosólicos específicos: los gránulos de estrés (SGs). La formación de SGs, de carácter transitorio, es un marcador celular que informa que se ha disparado la respuesta de estrés, y ocurre independientemente de cuál sea el agente estresor. Además es un fenómeno altamente conservado en la evolución y se encuentra presente en células de vertebrados, invertebrados, levaduras, tripanosomas y plantas²⁻³.

Los SGs pertenecen a una familia novedosa de cuerpos citosólicos denominados colectivamente “organelas sin membrana” (MLOs). Su nombre se debe a la falta de delimitación por parte de una bicapa lipídica. La integridad de las MLOs depende de múltiples interacciones débiles entre sus componentes y es análoga a una separación de fase líquido-líquido (LLPS). La composición de los SGs varía según las condiciones fisiológicas y el tipo celular utilizado e incluso es dependiente del tipo de estrés que se encuentren atravesando. Los gránulos de estrés son altamente dinámicos y se encuentran constantemente intercambiando moléculas de ARN y proteínas con el citosol circundante. Por otro lado, la contribución de los SGs a la respuesta protectora para la célula permanece desconocida. En un primer momento, se hipotetizó que los SGs al secuestrar factores de traducción y mRNAs favorecerían el arresto traduccional. Dicha conjetura fue perdiendo peso frente a la evidencia experimental proveniente de diversos laboratorios, incluyendo el nuestro, dirigido por la Dra. Graciela Boccaccio. Por lo tanto, diversas presunciones surgieron como alternativas. Entre ellas, se contempla que los SGs son nodos de señalización del estrés para facilitar la sobrevivencia celular. También, se especula que los SGs controlan la estabilidad de algunos mRNAs específicos para su posterior reutilización.

Además de su relevancia como reacción defensiva a agentes de daño, los efectos a corto plazo de la respuesta al estrés celular son un mecanismo fundamental de la respuesta inmune. Por ejemplo, se ha propuesto que los SGs pueden funcionar como *scaffolds* o plataformas que facilitan la activación de varias proteínas antivirales como RIG-I⁴ (Boccaccio et al., JMBiol en prensa).

Tras la infección con ciertos virus, los sensores inmunes innatos, PKR, reguladores de estrés, entre otros, se localizan en los gránulos de estrés junto con el ARN o ADN viral, formando una plataforma de señalización que permite la potenciación de la respuesta antiviral⁴². Esto conlleva a la posterior inducción de interferón y de la respuesta inmune innata⁴ (Boccaccio et al., JMBiol en prensa).



En nuestro laboratorio se empleó la formación de SGs como “readout” para identificar nuevos reguladores de la ISR mediante un *screen* por pérdida de función en células de *Drosophila*. Para ello se emplearon células S2R+ (Schneider 2 cells) para realizar un *screen* por RNAi contra 520 quinasas, fosfatasas y moléculas accesorias predichas en el genoma de *Drosophila*. El estudio fue realizado en colaboración con el *Drosophila* RNAi Screen Center (DRSC) en Harvard y se empleó un modelo de estrés oxidativo disparado por arsenito que había sido puesto a punto en el laboratorio por otros miembros del equipo de trabajo. El estrés oxidativo es característico de procesos inflamatorios y neurodegenerativos; se ocasiona por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. En dicho estudio se destacó por su alto score CG13197 cuyo *knock-down* (KD) facilitó la formación de SGs (datos no publicados). CG13197 es el ortólogo de **DUSP11** de mamíferos, la cual será el foco de estudio de esta tesis y cuya descripción será profundizada a continuación.

1.2. DUSP11

1.2.1 DUSP11: una fosfatasa que regula transcriptos de Pol III

Las fosforilaciones reversibles juegan un rol fundamental en la transducción de señales en procesos fisiológicos y patológicos. Las quinasas fosforilan múltiples sustratos, incluidas otras quinasas y factores de transcripciones, permitiendo la rápida transmisión de señales y regulando respuestas celulares a distintos niveles. Así como la fosforilación, la desfosforilación de proteínas y otros sustratos, es un interruptor molecular igualmente vital para la iniciación o terminación de diversas señales.⁶⁻⁷

La *fosfatasa de especificidad dual 11* (Dusp11) es una fosfatasa perteneciente a la familia de fosfatasas de especificidad dual (DUSP) que son objeto de intenso estudio. Los miembros de esta familia de fosfatasas DUSP tienen la habilidad de desfosforilar tanto residuos de tirosina como residuos de serina/treonina involucrando un dominio catalítico altamente conservado. Dusp11 se clasifica dentro del subgrupo de fosfatasas atípicas, compuesto por 16 miembros que se caracteriza por no compartir un ancestro común próximo⁸. Dusp11 contiene el motivo tirosina-fosfatasa, pero carece del dominio N-terminal que les confiere a las fosfatasas de esta familia la especificidad por sustratos proteicos⁹⁻¹⁰ (figura 2), lo cual podría permitirle tener sustratos más diversos. Estudios en busca de la preferencia de sustratos de esta fosfatasa demostraron que Dusp11 posee una alta afinidad



por el RNA in vitro. Luego se descubrió que Dusp11 posee la capacidad atípica de remover los fosfatos gamma y beta en el extremo 5' de ARNs tri- y di- fosforilados⁹.

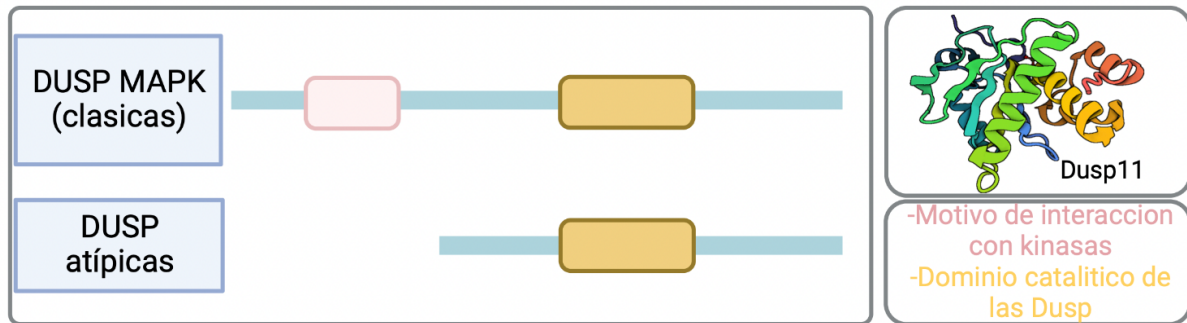


Figura 2. Dusp clásicas y atípicas. Los miembros de las fosfatasas DUSP-MAPK clásicas contienen un motivo de interacción con kinasas que les confiere la capacidad selectiva de unión a esas quinasas (ERK1/2, p38 o JNK1/2). Luego de la unión, el dominio catalítico de la DUSP (DCD) desfosforila las quinasas. Las DUSP atípicas carecen de un motivo KIM y pueden tener sustratos más diversos, incluyendo ARN fosforilado (DUSP11). (Adaptado de *Dual-Specificity Phosphatases in Immunity and Infection: An Update*)

1.2.2 Dominios proteicos de Dusp11

La estructura primaria de Dusp11 cuenta con cuatro dominios conservados. En primer lugar, el motivo catalítico *HCTHGXNRT* (residuos 198-206) propio de la familia de las DUSPs (*HCXXXXXR*). Además, posee dos tramos ricos en argininas -uno cercano al extremo N-terminal (residuos 8-26) y otro cercano al extremo C-terminal (residuos 304-319), los cuales son frecuentes en proteínas de unión al ARN. Por último, una región rica en prolina, con similitud a motivos que se sabe interactúan con dominios de homología Src 3 (SH3) se ubica cerca del extremo C-terminal⁹ (figura 3).

En pos de caracterizar las distintas regiones de Dusp11, se han realizado diversos mutantes de delección. Al deleccionar la región C-terminal (Δ 218-330) de Dusp11 se observó un incremento en la localización citosólica y se vio aumentada 1,5 veces su actividad trifosfatasa tanto in vitro como en células en cultivo. Estos resultados podrían atribuirse a dos causas, no necesariamente excluyentes. Por un lado, la región C terminal podría estar actuando como regulador negativo de la actividad fosfatasa de Dusp11. A su vez, podríamos hipotetizar que la región C-terminal incluye una señal de localización nuclear no



clásica, que al quitarla reduce la importación de Dusp11 al núcleo, aumentando su interacción con sustratos de RNAs localizados en el citosol ¹¹.

Por otro lado, se observó que la delección del motivo rico en arginina N-terminal (Δ 13-26) conduce a una disminución de la actividad trifosfatasa de Dusp11 a la mitad sin afectar su localización. Se ha especulado que la región N-terminal cumple una función directa en la unión del RNA ¹¹.

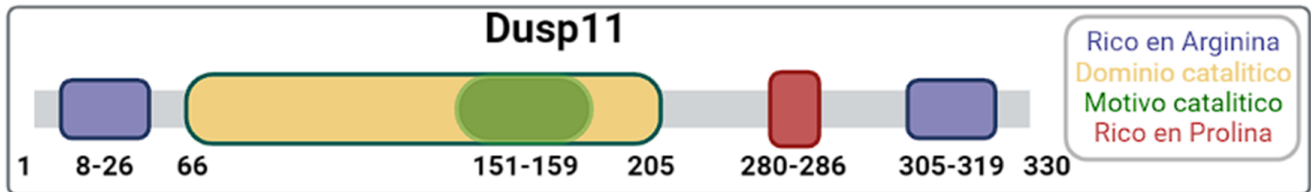


Figura 3. Esquema de la Proteína Dusp11 de homo sapiens. Regiones violetas ricas en arginina. Región roja rica en prolina. Región del dominio catalítico en color amarillo. Motivo catalítico, en color verde

1.2.3 Dusp11 en la respuesta inmune innata

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa de las células contra patógenos. Su mecanismo de acción consiste en el reconocimiento de productos del metabolismo anómalos o estructuras extrañas en el huésped activando varias rutas para combatir la infección.

RIG-1 es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que se activa al unirse a RNAs 5'-trifosforilados (5'-pppRNAs) generando una respuesta antiviral de interferón tipo 1 (IFN). En infecciones virales, los RNAs transcritos por la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRP) de origen viral poseen su extremo 5'-ppp y son capaces de inducir una respuesta mediada por RIG-1^{10, 12}. Todos los RNAs endógenos, inmediatamente luego de su transcripción, también contienen su extremo 5'-ppp y potencialmente pueden activar a RIG-1. Sin embargo, la gran mayoría de estos RNAs son modificados co- o post-transcripcionalmente y el extremo 5'-ppp es modificado o clivado. Los transcritos de polimerasa III no son "capeados" y muy pocos incorporan otras modificaciones, como puede ser el agregado de grupos metilo en su extremo 5', pudiendo funcionar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y activando a RIG-1 ^{6,10,12}.



Para evitar patologías autoinmunes y, a su vez, mantener sensibilidad suficiente en pos de detectar RNAs foráneos y disparar una respuesta antiviral, la vía de señalización de RIG-I debe ser regulada cuidadosamente. De hecho, varios moduladores proteicos han sido identificados tanto río arriba como río abajo de la señalización de RIG-I. Sin embargo, mecanismos que directamente controlen el grado de fosforilación del extremo 5' de transcritos que podrían actuar como DAMPS o PAMP no están descritos y comprendidos completamente aun ^{10,12}.

Como se mencionó anteriormente, se ha identificado a Dusp11 como actor central la respuesta inmune innata mediada por RIG-1 debido a que su actividad fosfatasa altera el balance de fosforilación del pool de transcritos (endógenos y exógenos) cambiando su "visibilidad" por RIG-1 y por ende su capacidad inmunoestimuladora. Experimentalmente se comprobó que al disminuir los niveles de Dusp11 mediante un KD, la respuesta de interferón en presencia de RNAs 5'-ppp (tanto PAMPs como DAMPs) se vio aumentada, dependiendo de RIG-1 ¹². Se reportó que durante la infección por el virus KSHV (herpesvirus asociado con el sarcoma de Kaposi), la respuesta inmune se activa luego de un decaimiento en los niveles de Dusp11, lo cual resulta en la acumulación de ARNs trifosforilados ¹³. Se ha sugerido también que infecciones con HIV-1 (virus de inmunodeficiencia humana 1) inducen la degradación de Dusp11 y la subsecuente activación RIG-I por los ARNs celulares que se acumulan en dicha condición ¹⁴.

Dependiendo del contexto celular, la actividad de Dusp11 sobre los RNAs virales puede ser beneficiosa o perjudicial para el ciclo de replicación viral. En primer lugar, se observó que Dusp11 al actuar sobre el extremo 5'-ppp de RNAs virales reduce su reconocimiento por RIG-1 y la capacidad celular de generar una respuesta antiviral acorde^{10,12}. También, se observó que DUSP11 actúa sobre el 5'-ppp de pre-miRNAs de algunos retrovirus y adenovirus. Esto permite que se carguen eficientemente en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), lo que es beneficioso para el ciclo de los virus³⁸. Sin embargo, la actividad de Dusp11 en algunos casos resulta antiviral, un ejemplo de ello ocurre con los virus de hepatitis C (HCV) cuyos RNAs al ser desfosforilados son susceptibles al ataque de 5'-3' exoribonucleasas (XRN).

Las condiciones en las que el balance de trifosfatos es pro- o antiviral, así como también los mecanismos de regulación implicados, son incógnitas que continúan aún abiertas. En particular, haciendo foco en Dusp11, se busca comprender cómo la célula es capaz de regular la actividad y niveles de Dusp11 pudiendo así controlar su predisposición a una infección viral.

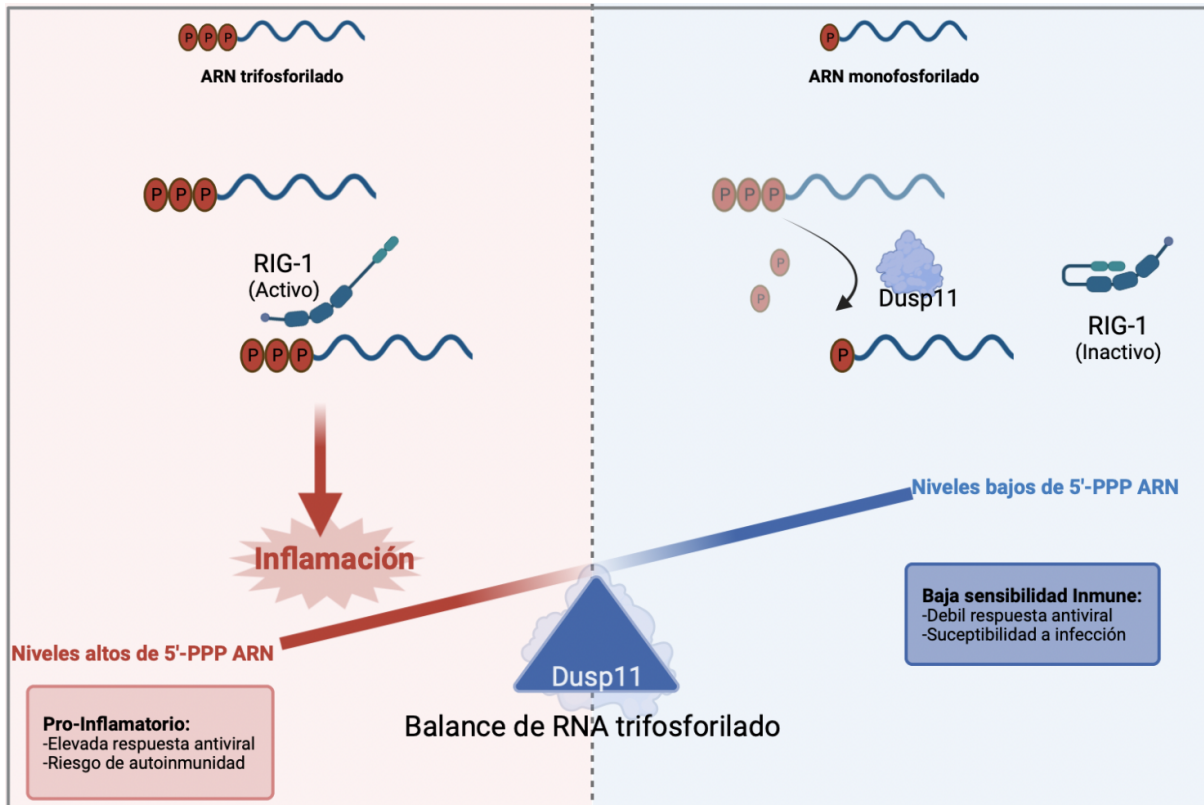


Figura 4. El grado de fosforilación del extremo 5' de RNAs en el balance inmune. El incremento o disminución en los niveles de 5'ppp-RNAs modula la sensibilidad de la célula frente a una respuesta antiviral mediada por RIG-1. Resulta vital mantener un control en el balance de fosforilación del extremo 5' de los RNAs para prevenir respuestas inflamatorias aberrantes manteniendo la capacidad de inducir una respuesta antiviral efectiva.

(Adaptado de Choi and Sullivan, 2021)¹⁰



1.2.4 Dusp11 en el estrés celular

El *screen* primario realizado en nuestro laboratorio en células de *Drosophila* (no publicado), sugirió un vínculo entre la respuesta de estrés y Dusp11. Trabajos del laboratorio previos a esta tesis tuvieron como objetivo ahondar en el tema empleando modelos celulares de mamífero, específicamente, la línea de osteosarcoma humano U2OS y la línea embrionaria de riñón HEK293.

Existen distintos tipos de estrés según el agente que lo desencadene, y aunque no descartamos la implementación de otros, el modelo principal que se aborda en este trabajo es el llamado estrés oxidativo. Este tipo de estrés es causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que llevan a un desbalance de las reacciones de oxido-reducción (redox) normales de una célula. Las ROS son sustancias químicas reactivas que contienen oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, el superóxido y el radical hidroxilo, y participan en variedad de funciones que van desde la transducción de señales hasta la apoptosis¹⁵. Las ROS se forman en varias organelas celulares, incluyendo la mitocondria y el retículo endoplasmático, e intervienen en su producción enzimas tales como las NADPH oxidasas. Normalmente estas especies son eliminadas por enzimas antioxidantes encargadas de mantener la homeostasis redox, pero en algunas ocasiones, donde existe una deficiencia en los mecanismos antioxidantes, se acumulan provocando daños y efectos nocivos para el ambiente celular, que pueden llevar finalmente a la muerte celular. Un agente inductor de este proceso muy frecuentemente empleado en modelos de estrés oxidativo es el arsenito de sodio (Ars), que tiene la característica de promover la transferencia de electrones y, por consiguiente, la producción de ROS.

En primer lugar, se observó que, tanto en células U2OS como en HEK293, en condiciones basales, Dusp11 se concentraba en sub-dominios nucleares (figura 5 A). Frente a un estímulo de estrés oxidativo, la distribución de Dusp11 se volvió homogénea, desensamblándose así las estructuras nucleares. También, fue posible observar que Dusp11 no fue reclutada a gránulos de estrés inducidos por arsenito.

En segundo lugar, fue posible observar que, frente al estímulo de estrés, los niveles de Dusp11 disminuyeron significativamente de forma transitoria. Inmediatamente después de la exposición a arsenito, los niveles de Dusp11 bajaron entre un 60-80% con respecto a los niveles basales (Figura 5 B). En los dos tipos celulares estudiados, se descubrió que los niveles de Dusp11 se vuelven mínimos luego de un pulso de arsenito de una hora seguidos por una hora de “recuperación” (cambio por medio fresco).

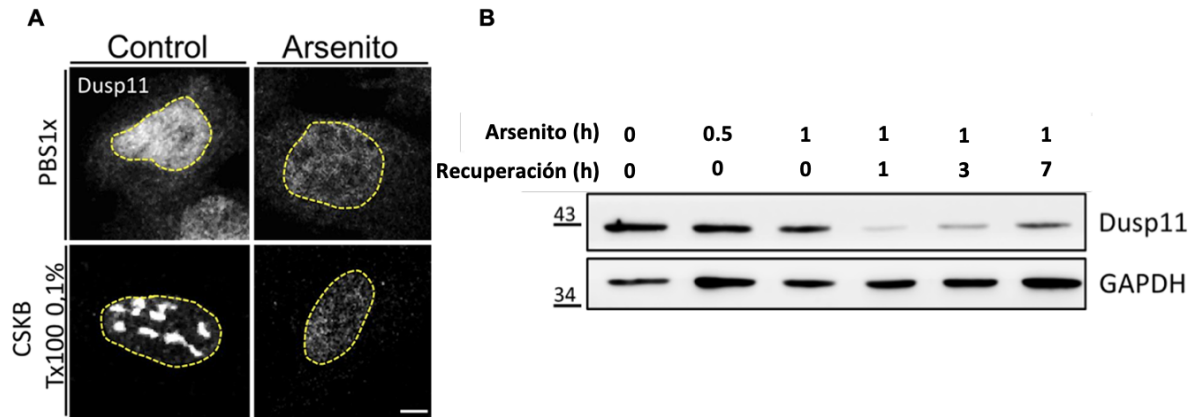


Figura 5. Comportamiento de Dusp11 en estrés celular agudo. A. Localización subcelular de Dusp11 en condiciones normales y bajo estrés oxidativo. Microfotografías de células U2OS en reposo o expuestas a arsenito de sodio 250µM por 1 hora, con o sin permeabilización de las células vivas en Triton X100 0.1%. Las células fueron teñidas utilizando un anticuerpo específico para Dusp11. Barra de tamaño, 10µm. **B. Los niveles de Dusp11 bajan transitoriamente durante estrés celular.** Análisis de los niveles de Dusp11 mediante Western blot a partir de extractos proteicos totales de células HEK293T en condiciones de estrés oxidativo (arsenito 250µM) y luego de distintos tiempos de recuperación. GAPDH se utilizó como control de carga.



1.3 Mecanismos de degradación proteica

Las células eucariotas han desarrollado numerosas vías para controlar el delicado equilibrio de la síntesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas intracelulares y extracelulares. La evidencia sugiere cada vez más que la exposición al estrés ambiental y el envejecimiento conducen a un desequilibrio de esta red de homeostasis de proteínas (proteostasis), lo que compromete la integridad celular y la resistencia al estrés y contribuye a la aparición de patologías que incluyen trastornos neurodegenerativos y cáncer³⁷.

Existen principalmente dos sistemas de degradación de proteínas en células eucariotas, los proteosomas y los lisosomas. La vida media de las proteínas intracelulares varía dramáticamente y puede ir desde varios minutos, como el supresor tumoral p53, hasta varios días, como la actina y la miosina. Diversos estudios han sugerido que las proteínas de corta vida media son degradadas principalmente por el sistema proteosoma, mientras que las de larga vida media son degradadas por lisosomas. Sin embargo, esta correlación no es perfecta y, estudios recientes muestran que el proteosoma puede participar en la degradación de proteínas de larga vida media ¹⁷, así como el lisosoma puede también participar en la degradación de proteínas con vida media corta ^{18, 19, 20}.

1.3.1 El proteosoma

El proteosoma, un complejo proteasa altamente conservado de varias subunidades, resulta clave para la degradación de proteínas que se encuentran unidas covalentemente a cadenas de poliubiquitina²¹. En este sistema proteolítico, la ubiquitina sirve como señal de degradación y el proteosoma como enzima degradante. Se estima que entre el 80 y el 90% de la degradación de proteínas en cultivos celulares de mamíferos ocurre por esta vía. Sus sustratos comprenden una gran variedad de proteínas de corta vida media que se conjugan a cadenas de poliubiquitina.

Proteínas asociadas con funciones nucleares, como ciclinas, inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas y factores de transcripción (NF- κ B, I κ B y p53) fueron de los primeros sustratos proteosomales en ser descubiertos²². Posteriormente, proteínas citoplasmáticas cuyo recambio también dependía del proteosoma, fueron identificadas.



El primer paso en la degradación de proteínas mediada por la vía ubiquitina proteosoma es la unión covalente de la ubiquitina a la proteína blanco. El proceso de ubiquitinación sirve como señal para el recambio de proteínas y es llevado a cabo por una cascada enzimática que involucra tres grupos de enzimas denominados ubiquitina E1 (enzima activadora), ubiquitina E2 (enzima conjugadora) y ubiquitina E3 (enzima ligasa). Para ciertos sustratos, una cuarta enzima, E4, alarga las cadenas cortas de ubiquitina²³. La habilidad del complejo proteosoma 26S para reconocer las cadenas de ubiquitina unidas a las proteínas es en parte el factor clave que explica cómo las proteínas celulares pueden ser marcadas por ubiquitinación para degradación. Una vez marcadas y reconocidas por el proteosoma, las proteínas pueden ser degradadas y la ubiquitina liberada para poder volver a marcar nuevas proteínas. De esta forma la vía ubiquitina-proteosoma es capaz de contribuir al recambio proteico y establecer un mecanismo de control sobre la calidad de las proteínas celulares²⁴.

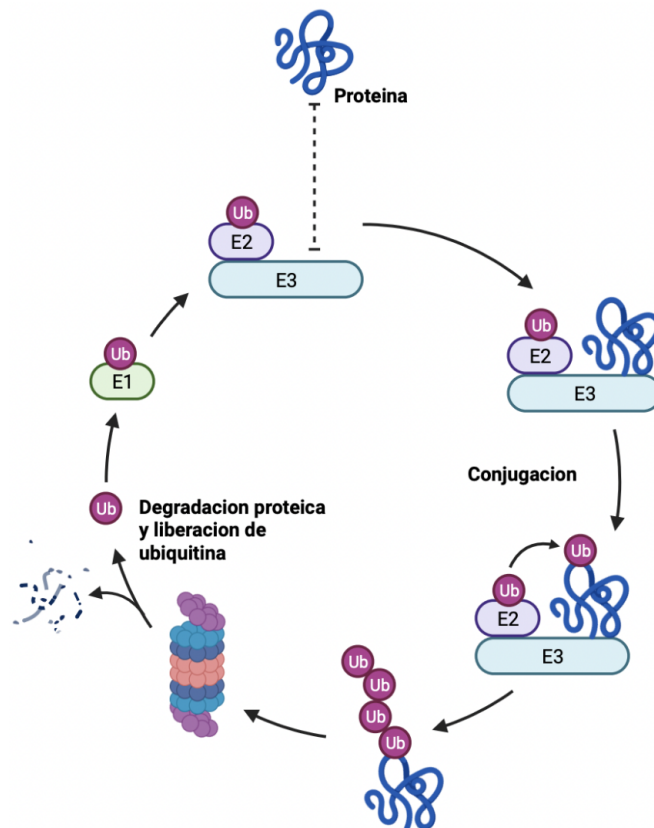


Figura 6. Representación esquemática de la vía de degradación ubiquitina-proteosoma



1.3.2 Autofagia mediada por chaperonas (CMA)

Como se mencionó anteriormente el control de calidad y el continuo recambio de las proteínas es esencial en las células para garantizar el correcto funcionamiento y la supervivencia celular. La autofagia es un mecanismo altamente conservado de supervisión que contribuye a la proteostasis mediante la degradación de proteínas en el lisosoma. Desbalances en la proteostasis que pueden conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas, se han visto implicados en diversas enfermedades tales como desórdenes neurodegenerativos, alteraciones metabólicas, enfermedades relacionadas con la inmunidad y enfermedades infecciosas^{25, 26}. Tres rutas centrales componen el “*bulk Autophagy*”: La Macroautofagia(MaA), la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas(CMA). Otros tipos de autofagias más específicos han sido documentados tales como la mitofagia (eliminación selectiva de las mitocondrias) la lipofagia (degradación de lípidos) y la xenofagia (degradación selectiva de patógenos)²⁷.

La CMA es responsable de la degradación selectiva de proteínas citosólicas solubles que contengan el motivo peptídico KFERQ (o una secuencia relacionada)²⁸⁻²⁹. Son las propiedades de los residuos, más que los aminoácidos específicos, los que determinan que la chaperona HSC70 pueda unirse a esta región de la proteína blanco³⁰, iniciando el proceso de CMA

Aproximadamente el 40% de las proteínas en el proteoma de los mamíferos contienen un motivo del tipo KFERQ canónico. Además, en algunas proteínas, el motivo puede ser generado a través de modificaciones post-traduccionales, expandiendo así el número potencial de sustratos de CMA³¹⁻³⁴.

En esta vía de degradación, la proteína HSC70 citosólica es capaz de unirse al motivo de tipo KFERQ y luego diversas co-chaperonas como CHIP (carboxyl terminus of HSC70 Interacting protein), HSP40 (heat shock protein 40), HIP (HSP70-interacting protein) y HOP (HSP70-HSP90 organizing protein) son reclutadas para que pueda ocurrir la translocación al lisosoma²⁸. HSC70 está también presente en el lumen lisosomal y es necesaria para completar la translocación del sustrato, lo cual es un paso crucial en la CMA. Por último LAMP2 es un componente lisosomal indispensable para esta vía de degradación, en particular la isoforma LAMP2A, única isoforma necesaria para la maquinaria de CMA, es responsable de la unión al sustrato e internalización a los lisosomas. Una vez internalizada, la proteína es degradada en el lisosoma, completando el proceso.

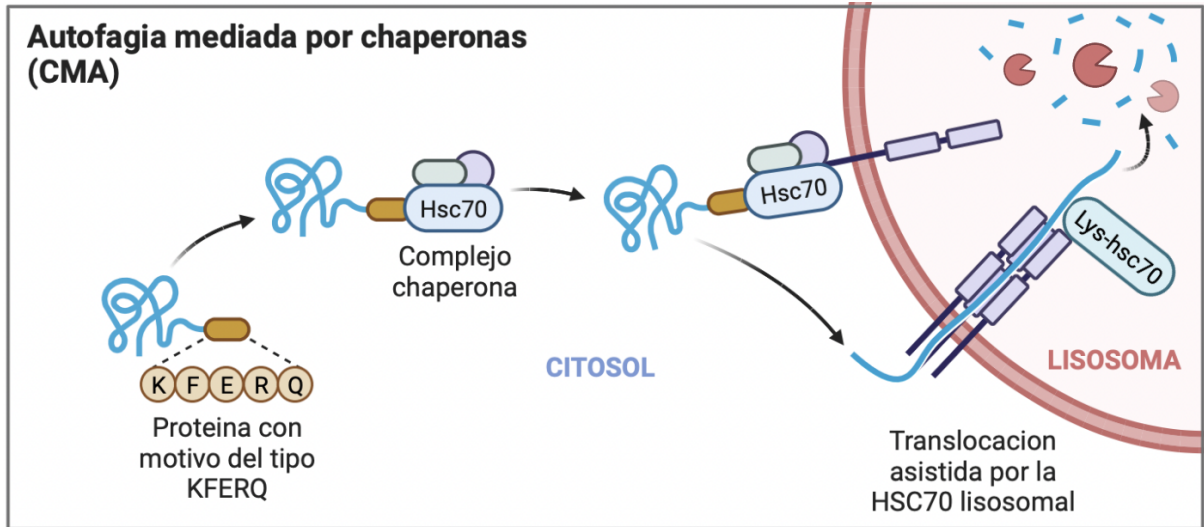


Figura 7. Representación esquemática de la vía de degradación de autofagia mediada por chaperonas (CMA).



2. Hipótesis y objetivo

2.1 Hipótesis

Hipotetizamos que la disminución de los niveles de Dusp11 durante la respuesta aguda de estrés es consecuencia del silenciamiento traduccional global y de su rápida degradación

2.2 Objetivo

En este trabajo nos hemos propuesto como objetivo general indagar los mecanismos celulares subyacentes a la disminución de los niveles proteicos de la fosfatasa de ARN Dusp11 durante el estrés celular agudo.

Para esto, investigaremos el curso temporal de los cambios en los niveles de Dusp11 inducidos por exposición a agentes estresores. Seguidamente los potenciales mecanismos de degradación que podrían estar involucrados en la regulación de los niveles proteicos de esta proteína.



3.Resultados y discusión

En biología nada tiene sentido, excepto bajo la luz de la evolución.

Theodosius Dobzhansky.

3.1 Dusp11 desaparece frente a estrés

Como se mencionó anteriormente en la introducción (1.2.4 *Dusp11 en el estrés celular*) en nuestro laboratorio se habían realizado experimentos que vinculan la disminución en los niveles de Dusp11 con la respuesta a estrés disparada por arsenito en las líneas celulares U2OS y HEK293. Sin embargo, dada la potencial relevancia de esta proteína en la respuesta inmune innata nos propusimos analizar esta respuesta en una línea celular que fuese capaz de expresar interferón tipo I, para poder estudiar en un futuro la relación entre el estrés y la respuesta inmune con Dusp11 como actor clave.

Para estos experimentos se utilizó la línea de células epiteliales de adenocarcinoma alveolar (A549) y arsenito como modelo de estrés oxidativo. Las células fueron expuestas a una hora de arsenito con un posterior cambio de medio condicionado (lo cual llamamos “recuperación”) y preparamos extractos proteicos a distintos tiempos de recuperación (figura 8 A). Luego se analizó por western blot los niveles proteicos de Dusp11 en función del tiempo. Los inmunoblots resultantes se analizaron por dos técnicas de revelado distinto. Por un lado detección quimioluminiscente aumentada (ECL) y por el otro se utilizó la tecnología Odyssey CLx de detección infrarroja, la cual permite operar con mayor rango dinámico.

Los resultados obtenidos (figura 8) indican que luego de una hora del estrés generado por arsenito en células A549, los niveles de Dusp11 se ven reducidos, de forma estadísticamente significativa, en un 75% respecto a los niveles basales y que en la hora de recuperación posterior los niveles continúan disminuyendo aún más hasta alcanzar una reducción de un 80% respecto a los niveles iniciales. A tiempos más prolongados, tres y ocho horas de recuperación post pulso con arsenito, los niveles de Dusp11 comenzaron a mostrar un aumento pero no lograron alcanzar los niveles iniciales previos al tratamiento, logrando una recuperación de un 43% en el mejor de los casos.

Estos resultados nos permiten inferir que el estrés generado por arsenito conduce a una rápida disminución transitoria en los niveles de Dusp11, con niveles mínimos entre una y tres horas post- estrés, seguida de una lenta recuperación que inicia cerca de las 3 horas posteriores al pulso de arsenito.

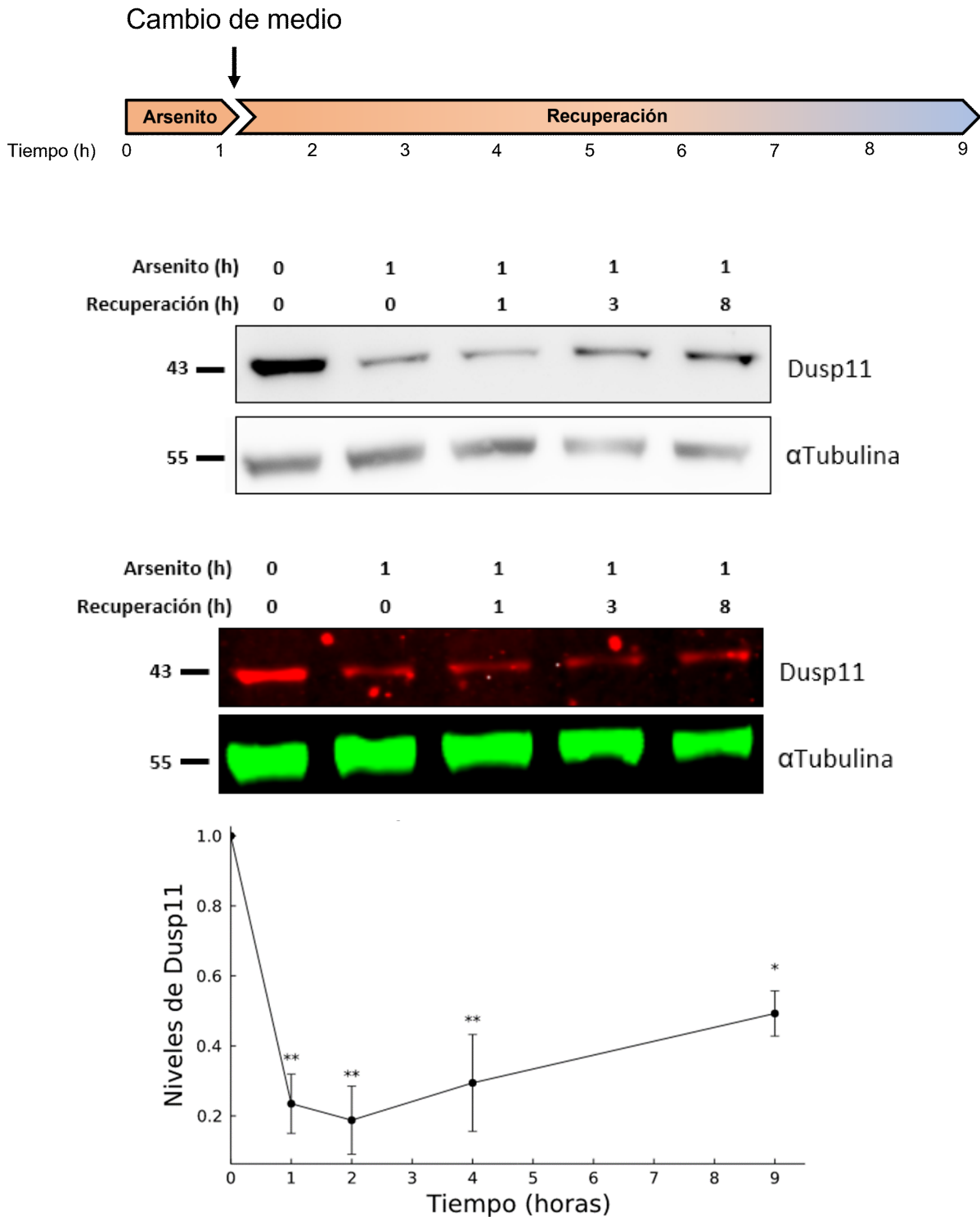


Figura 8. Los niveles de Dusp11 disminuyen transitoriamente frente al estrés desencadenado por arsenito. Análisis mediante Western blot de extractos proteicos totales de células A549 expuestas a un pulso de estrés oxidativo (arsenito 250 μ M durante 1 hora) seguido de distintos tiempos de recuperación. **A.** Esquema experimental empleado. **B.**



*Análisis por Western blot utilizando detección mediante quimioluminiscencia aumentada (ECL). C. Análisis por Western blot utilizando detección infrarroja mediante la tecnología Odyssey CLx. D. Gráfico del promedio de los niveles de Dusp11 relativos a tubulina, utilizada como control de carga, en función del tiempo para células expuestas a pulso de estrés oxidativo. Las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos representan diferencias significativas estadísticamente con * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (relativo al tiempo inicial), $N = 2$.*

3.2 La fosforilación de eIF2 α correlaciona temporalmente con la desaparición de Dusp11

Como se mencionó anteriormente, un paso central en la respuesta integrada al estrés es el silenciamiento traduccional global, el cual tiene lugar inmediatamente después del sensado de agentes estresores. Para que se apague la traducción el factor de inicio de la traducción 2 α (eIF2 α) es fosforilado por una de las cuatro quinasas específicas activadas selectivamente por distintos estímulos¹⁶. La fosforilación de eIF2 α enlentece significativamente el reclutamiento de la subunidad ribosomal mayor disminuyendo drásticamente la eficiencia de la iniciación de la traducción. Es por esto que quisimos evaluar si existía una correlación entre la fosforilación de este factor de iniciación causada por la ISR, con la disminución observada en los niveles de Dusp11. Para esto, utilizamos las mismas muestras obtenidas de células A549 tratadas con arsenito que se utilizaron para el experimento anterior.

Observamos que, tras una hora con arsenito, los niveles de eIF2 α fosforilados (P-eIF2 α) aumentaron notablemente y se mantuvieron elevados tras una hora de recuperación. Luego disminuyeron considerablemente, haciéndose imperceptibles a las 3 horas de recuperación. De esta forma fuimos capaces de observar que la fosforilación de eIF2 α es transitoria y acompaña al pulso de estrés y que su desfosforilación ocurre rápidamente durante el tiempo de recuperación.

Al comparar los resultados de ambos experimentos encontramos que la desaparición de Dusp11 causada por estrés correlaciona con el aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado y, a su vez, los tiempos de recuperación en los cuales los niveles de eIF2 α fosforilados disminuyen coinciden con los tiempos en que Dusp11 comienza a aumentar nuevamente.

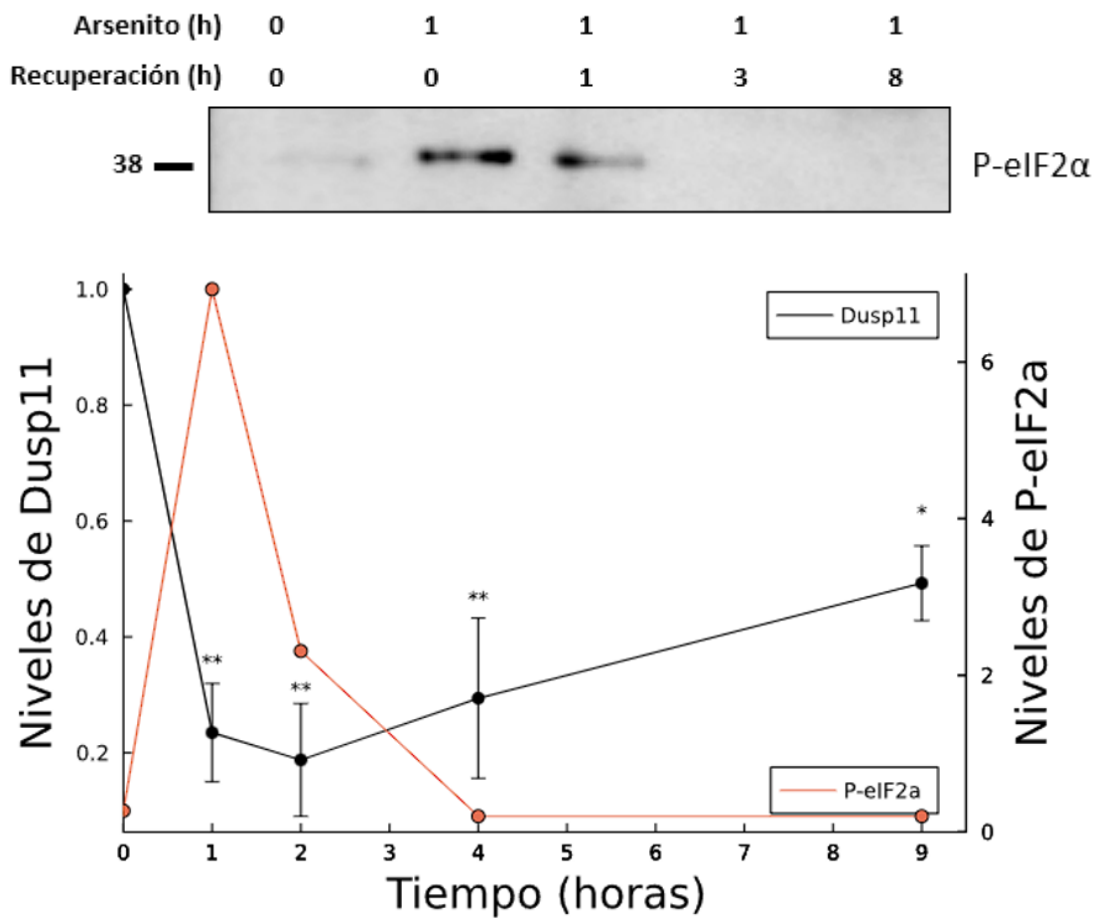


Figura 9. *Correlación temporal entre la fosforilación de eIF2 α y la desaparición de Dusp11.* Análisis mediante Western blot de extractos proteicos de células A549 bajo estrés oxidativo (arsenito 250 μ M) y luego de distintos tiempos de recuperación. Se analizaron los niveles de P-eIF2 α relativos a tubulina, utilizada como control de carga. La cuantificación se muestra en el gráfico inferior en línea naranja junto con los valores de Dusp11 obtenido en los experimentos mostrados en la Figura 8.



3.3 Dusp11 es una proteína de corta vida media.

Imaginemos una pileta a la cual le está ingresando agua por una manguera y que a su vez se está vaciando por un orificio en el otro extremo, si los niveles de agua se mantienen constantes podemos suponer que los flujos de entrada y salida de agua son iguales. Ahora imaginemos que de pronto la pileta comienza a vaciarse. La pregunta lógica que uno podría plantear es si se cerró la manguera que alimentaba la pileta y dejó de ingresar agua, o por el contrario, si hay un nuevo orificio y el flujo de pérdida de agua es ahora mayor.

Hasta el momento nuestros experimentos muestran que cuando los niveles de P-eiF2 α aumentan, los niveles de Dusp11 disminuyen y, por el contrario, cuando P-eiF2 α disminuye, Dusp11 comienza su recuperación.

Es a la luz de estos resultados que nos surge la pregunta ¿es acaso el silenciamiento traduccional global causado por la activación de la ISR quien provoca la disminución en los niveles de Dusp11? ¿Nuestra pileta (Dusp11) se está vaciando porque quitamos la manguera (traducción)?

Para intentar responder a esta pregunta, nos propusimos realizar experimentos de arresto traduccional en pos de evaluar qué sucedía con los niveles de Dusp11.

La cicloheximida (CHX) es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas. Esta droga de uso extendido en la investigación, actúa interfiriendo la actividad peptidil-transferasa del ribosoma 60s, de esta forma bloquea la elongación traduccional y, en última instancia, bloquea la traducción.

Nuestro diseño experimental consistió en la exposición de células A549 a cicloheximida (10mg/ml concentración final), por distintos periodos de tiempo y luego se extrajeron las proteínas para su posterior análisis por western blot.

Encontramos que los niveles de Dusp11 comenzaron a disminuir tras 15 minutos de exposición al inhibidor traduccional y se vieron reducidos a la mitad tras aproximadamente una hora de exposición.

Los resultados experimentales que muestran que los niveles de Dusp11 se reducen en un 50% aproximadamente a la hora de arresto traduccional indicarían que esta fosfatasa es una proteína de corta vida media que posee una alta tasa de recambio.

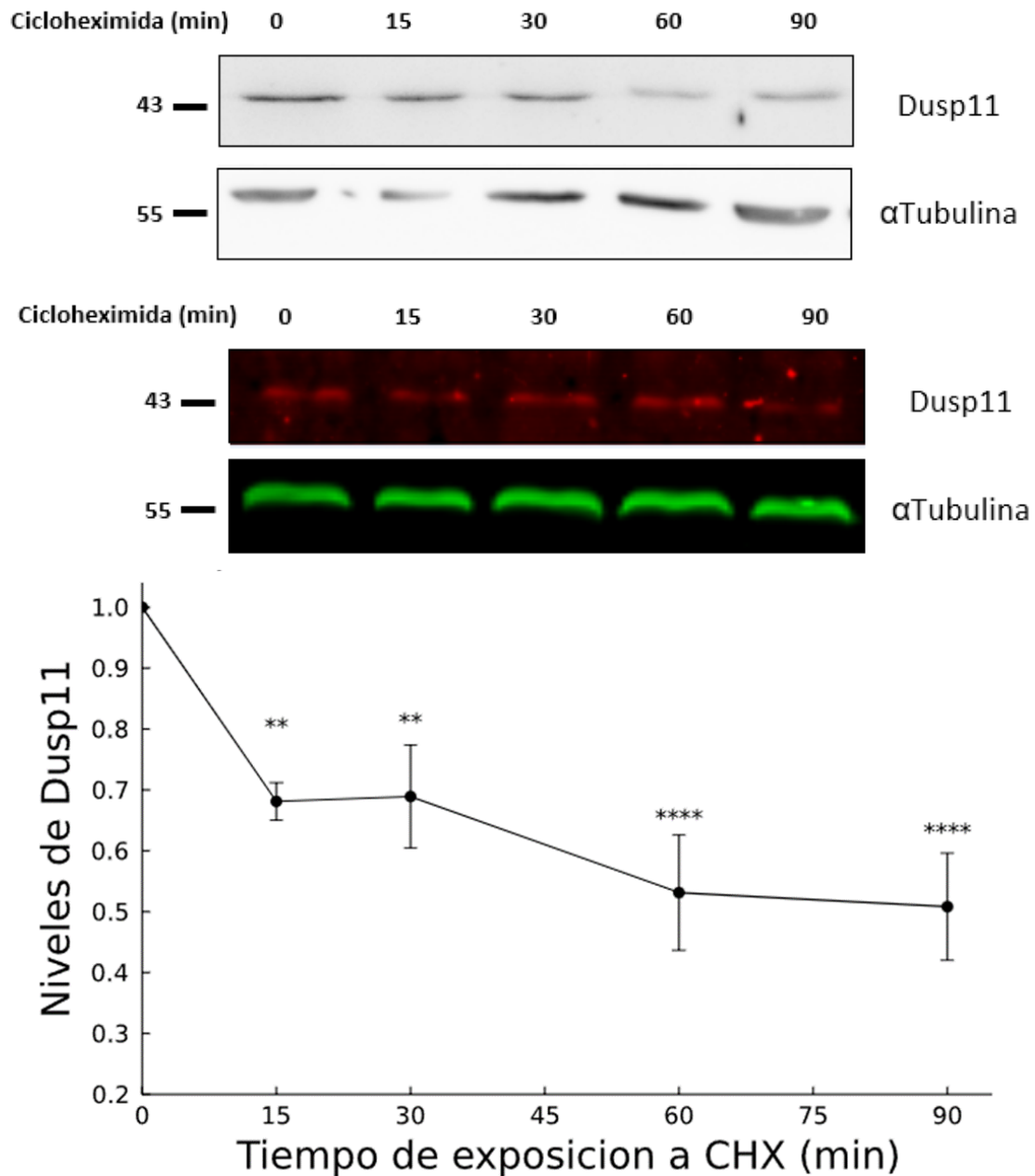


Figura 10. Los niveles de Dusp11 disminuyen tras el silenciamiento traduccional. Análisis por western blot de los niveles de Dusp11 relativos a tubulina para células A549 expuestas a cicloheximida (10 mg/ml) por distintos periodos de tiempo. Se muestra el revelado utilizando quimioluminiscencia aumentada (ECL) y detección infrarroja por tecnología Odyssey CLx. El gráfico inferior muestra el promedio de tres experimentos, las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas : * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (respecto al tiempo 0).



3.4 Presencia de motivos consenso para CMA en Dusp11

Tras haber identificado en nuestros experimentos de inhibición de la síntesis proteica, que Dusp11 es una proteína con alta tasa de recambio y de corta vida media (aproximadamente una hora) nos propusimos indagar acerca de los mecanismos de degradación que podrían estar involucrados en este proceso.

Experimentos aún no publicados de otros miembros del laboratorio muestran que la inhibición farmacológica con mg132 del proteosoma tiene efectos muy moderados en la estabilidad de Dusp11, sugiriendo que, si bien esta vía de degradación podría estar implicada en el turnover de esta proteína, no es suficiente para explicar la alta tasa de recambio. Fue entonces que nos propusimos analizar in silico potenciales vías de degradación y, dejando de lado la profundización en los análisis de la vía ubiquitina-proteosoma, nos centramos en la autofagia mediada por chaperonas.

Esta vía de degradación lisosomal, que contribuye a la degradación citosólica de un gran número de proteínas, posee una particularidad clave que radica en su elevada especificidad. Esta especificidad está dada por el reconocimiento de una secuencia consenso que se conoce como “motivo tipo KFERQ”. En la figura (11) se puede observar la estructura general de este motivo. Como norma general, el motivo de tipo KFERQ, está siempre flanqueado por una glutamina (Q) en uno de sus lados y contiene uno o dos de los residuos positivos: lisina (K) o arginina (R); uno o dos de los residuos hidrofóbicos: fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I) o valina (V) y uno de los residuos cargados negativamente: ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D).

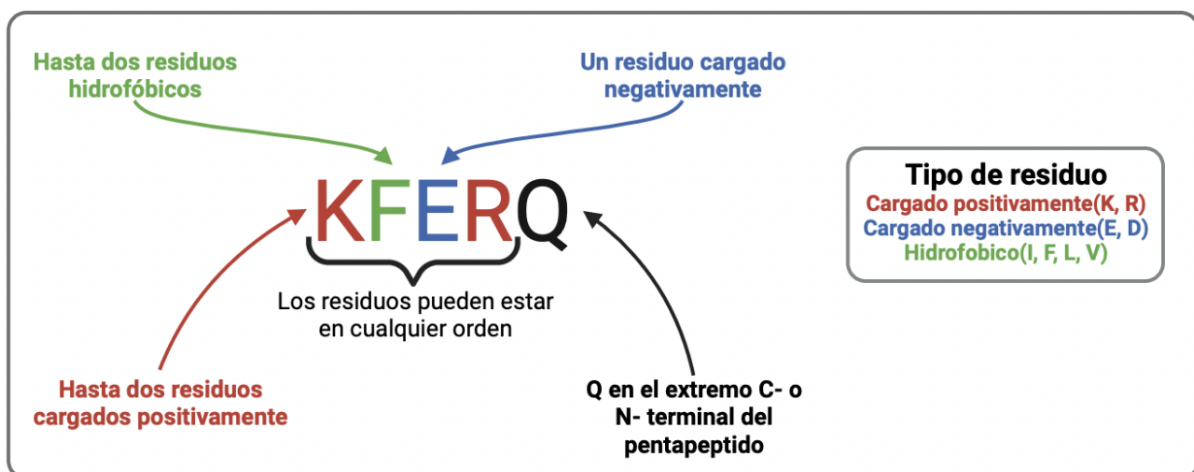


Figura 11. Motivos del tipo KFERQ. La imagen muestra la estructura general del motivo y los diferentes aminoácidos que pueden estar presentes (Adaptado de Jackson et al. 2016).



Lo primero que nos propusimos fue identificar la presencia o no de estos motivos de tipo KFERQ en la secuencia de Dusp11. Para esto utilizamos un software denominado KFERQ-finder que nos permitió escrutar la secuencia en busca de motivos tanto canónicos como no canónicos. Además, a fin de poder comparar si nuestros resultados eran conservados entre distintas especies, analizamos las secuencias de Dusp11 de *Drosophila melanogaster*, rata y ratón.

Nuestros resultados indican que todas las especies analizadas cuentan con al menos 4 motivos del tipo KFERQ ya sean canónicos, o no. Y que además, uno de estos motivos, con secuencia "NDKLI" se encuentra conservado entre todas las especies. Cabe destacar que *Drosophila melanogaster* no es capaz de realizar CMA. Se ha descubierto que posee otro tipo de autofagia denominada microautofagia endosomal, la cual requiere de la presencia de estos motivos tipo KFERQ, pero cuya presencia no es suficiente para ser sustrato de degradación.

Lo próximo que planteamos fue que no era suficiente contar con la presencia de estos motivos en la secuencia, sino que además debían estar expuestos en la superficie proteica a fin de permitir la interacción con las chaperonas involucradas en CMA. Desafortunadamente, no se cuenta con información estructural suficiente en las bases de datos para esta proteína, a excepción de la región catalítica de Dusp11 humana (la cual llamamos Humana Cristalizada). Para solventar este inconveniente utilizamos el recientemente liberado software Alpha Fold (2), el cual es capaz de predecir estructuras proteicas a partir de información secuencial, haciendo uso de algoritmos de "*machine learning*".

Una vez generadas las estructuras correspondientes para cada especie, incluyendo una estructura completa de la Dusp11 humana, analizamos la exposición de los motivos de tipo KFERQ evaluando esta información estructural tridimensional. Para esto realizamos análisis de superficie accesible al solvente (SASA) por dos métodos independientes³⁶. Por un lado utilizamos *scripting* en la herramienta Pymol, la cual es conocida por permitir fácilmente la visualización de estructuras proteicas en tres dimensiones. Y por el otro lado utilizamos el software *SURFACE-RACER*. En ambos casos el proceso es similar: se selecciona un solvente (en este caso agua), se modela de forma esférica asignándose un radio adecuado para esa esfera y se evalúa el contacto entre la región de interés (haciendo uso del tamaño y posición de los aminoácidos) y el solvente dado. De esta forma, se obtienen resultados de área expuesta al solvente en angstrom cuadrados (\AA^2). A título comparativo, tomamos como referencia una secuencia de igual tamaño que el motivo de tipo KFERQ (5 aminoácidos) que estuviese conservada entre todas las especies (NRTGY) y que no estuviese expuesta (NE) al solvente.



Nuestros resultados indican que, en promedio, los residuos del tipo KFERQ mostraron entre 5 y 25 veces más exposición al solvente que el motivo no expuesto tomado como referencia. Además el motivo de tipo KFERQ conservado entre todas las especies (NDKLI) mostró una exposición unas 6 veces mayor en promedio que el motivo de referencia no expuesto. Un análisis preliminar de la exposición 20 aminoácidos río arriba y 20 aminoácidos río abajo de cada motivo, mostró que los residuos flanqueantes de los motivos de tipo KFERQ se encuentran en promedio más expuestos que el resto.

Por otro lado, también como punto comparativo, se analizaron los motivos de tipo KFERQ para tres proteínas que se sabe son degradadas por CMA: Protein deglycase DJ-1, Serine/threonine-protein kinase Chk1 y alpha-synuclein. Se encontró que los valores de exposición al solvente para los motivos de tipo KFERQ de estas tres proteínas, son similares a los obtenidos para Dusp11³⁵.

De esta forma, nuestros resultados indican a Dusp11 como un potencial sustrato de la vía de degradación mediada por chaperonas y proponen a la CMA como actor clave en la rápida degradación de Dusp11 durante el estrés.

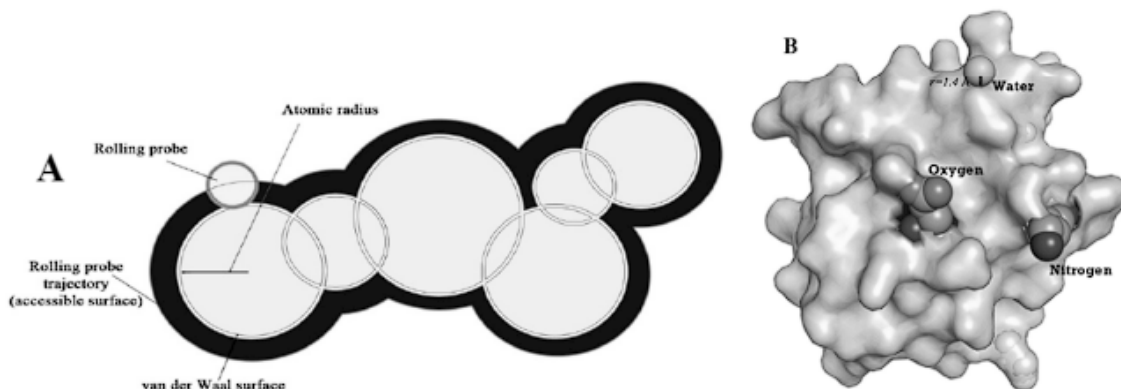


Figura 12. Superficie accesible al solvente. Se representa una sección transversal de una macromolécula a la cual se le ha calculado el área accesible a solvente con una “sonda rodante” (Adaptado de Hassan et al. 2014).

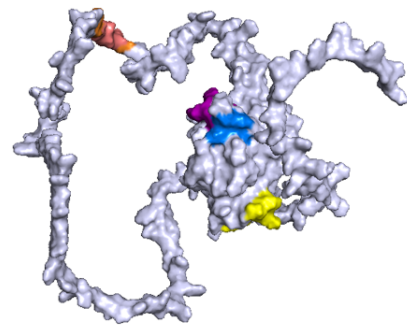
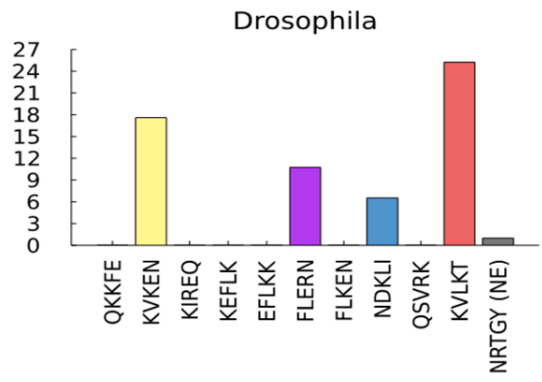
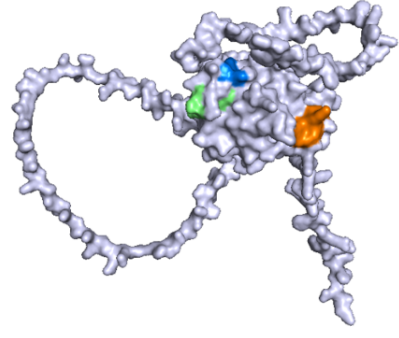
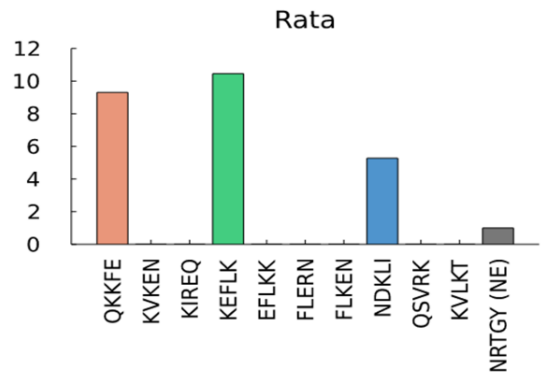
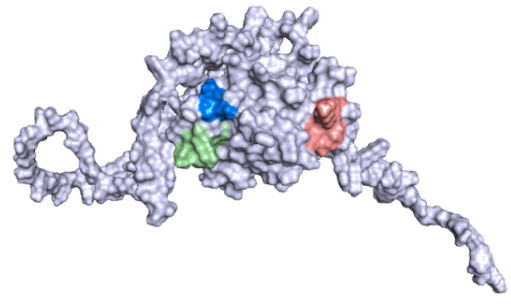
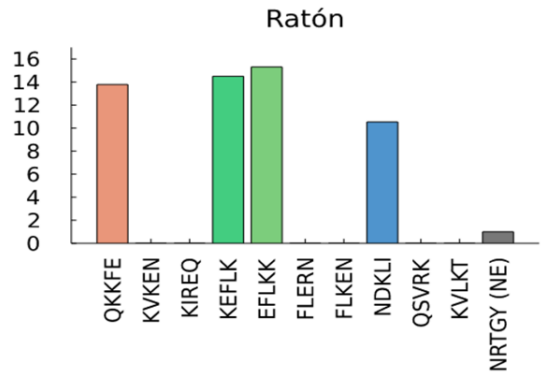
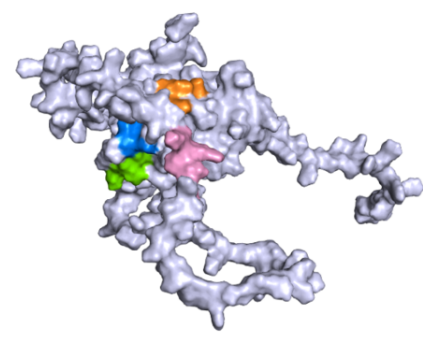
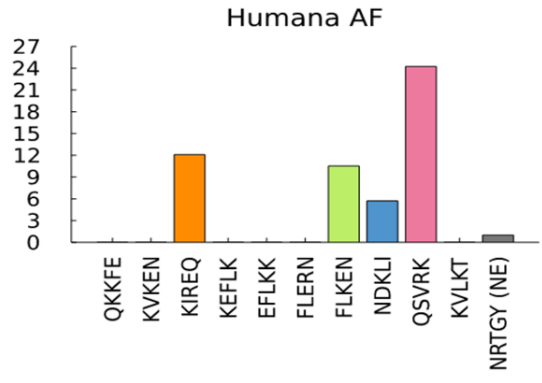
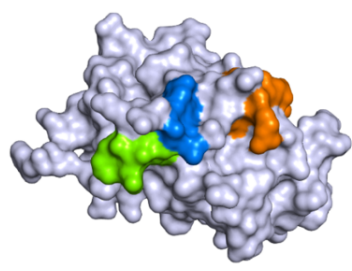
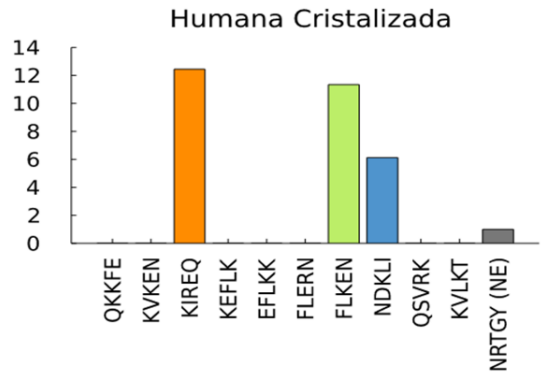
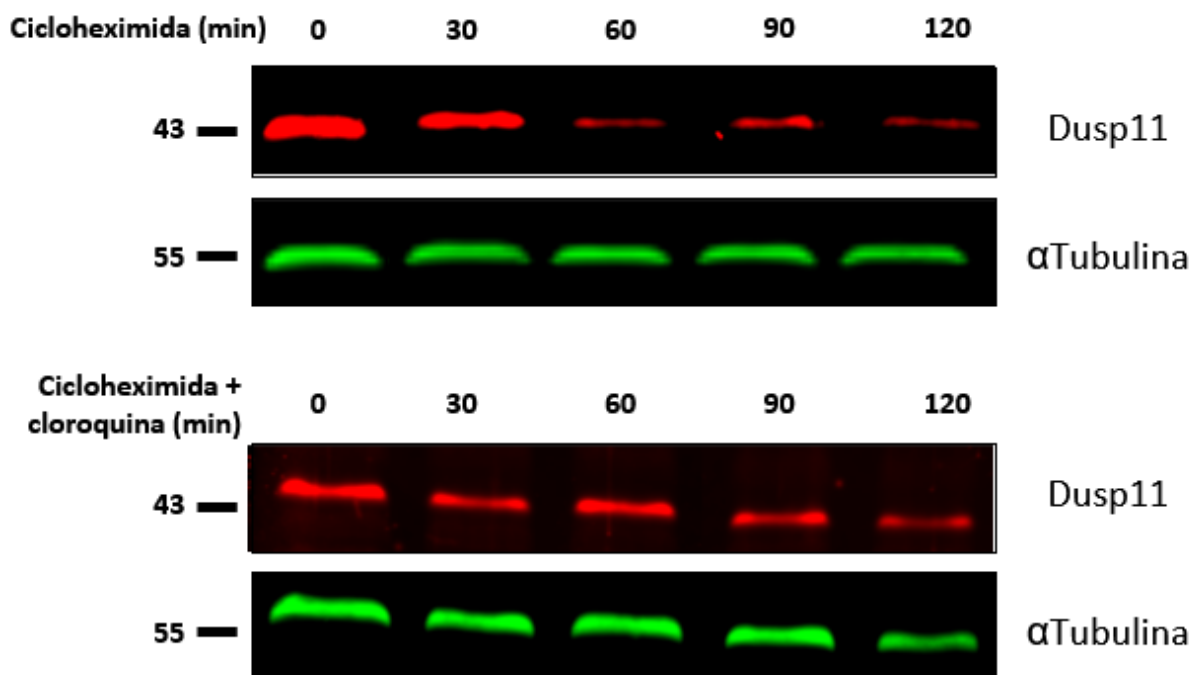




Figura 14. Exposición de los motivos de tipo KFERQ para Dusp11 en distintas especies. El gráfico muestra la superficie accesible al solvente, para los motivos de tipo KFERQ presentes en la secuencia de Dusp11, relativo a los valores obtenidos para un motivo no expuesto (NE). Las imágenes a la derecha muestran las estructuras de Dusp11 con los motivos de tipo KFERQ coloreados.

3.5 La autofagia mediada por chaperonas participa en la degradación de Dusp11.

Luego de haber indagado sobre la presencia de los motivos de tipo KFERQ y concluido *in silico* que Dusp11 es una candidata a degradación por CMA, nos propusimos evaluar con experimentos en cultivo celular esta posibilidad. Para ello expusimos nuevamente células A549 a distintos tiempos de cicloheximida (el inhibidor de la traducción) en presencia o ausencia de cloroquina (CQ). La cloroquina es un fármaco del grupo de las 4-Aminoquinolinas que se utiliza como inhibidor selectivo de la función lisosomal. Se emplea ampliamente para bloquear la degradación por la vía de CMA^{40, 41}. Con este planteo experimental nos propusimos evaluar cambios en la tasa de degradación de Dusp11 cuando bloqueamos la vía de autofagia mediada por chaperonas.



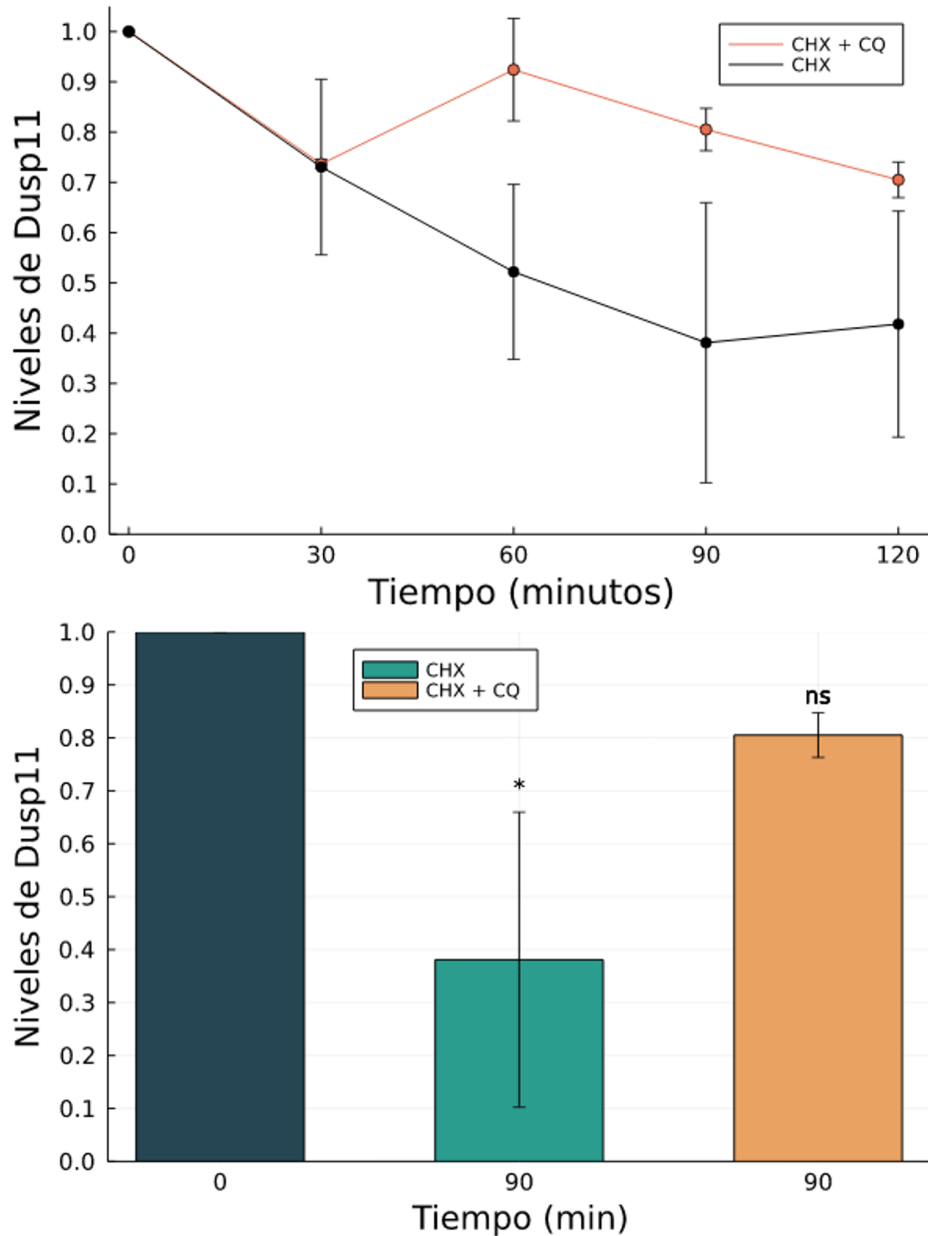


Figura 15. La inhibición de la CMA revierte el decaimiento provocado durante el arresto traduccional global. Análisis por western blot de los niveles de Dusp11 relativos a tubulina para células A549 expuestas a cicloheximida (10 mg/ml) o cicloheximida más cloroquina (100µM), por distintos períodos de tiempo. El gráfico inferior muestra la curva promedio, las barras de error representan la desviación estándar. El gráfico de barras muestra los niveles de Dusp11 tras 90 minutos de tratamiento. Se observan diferencias significativas al tratar las células con CHX, pero no al tratarlas con CHX + CQ. * $P \leq 0.05$, ns = no significativo. N=2 para cada experimento



Encontramos que al exponer las células A549 a distintos tiempos de CHX los niveles de Dusp11 disminuyeron, tal como esperábamos en base a los resultados mostrados previamente (figura 10). Cuando las células fueron tratadas simultáneamente con cicloheximida y cloroquina, los niveles de Dusp11 no mostraron cambios significativos en el tiempo.

En la figura 15 podemos observar las diferencias tras 90 minutos de exposición para cada uno de los tratamientos. Cuando las células fueron expuestas a CHX, los niveles de Dusp11 disminuyeron significativamente respecto a la condición inicial. Por el contrario, cuando se expusieron las células a CHX en presencia de cloroquina, no se obtuvieron cambios significativos en los niveles de Dusp11. Es decir que el tratamiento con CQ rescata el decaimiento observado frente a inhibición de la síntesis proteica

De esta forma, los resultados expuestos aquí muestran que inhibir la autofagia por chaperonas produce cambios en el decaimiento de los niveles de Dusp11 frente a la detención traduccional, permitiéndonos así proponer que la CMA juega un rol clave en la degradación de Dusp11.



4. Conclusiones

*There's real poetry in the real world.
Science is the poetry of reality.*

Richard Dawkins.

Como mencionamos anteriormente nuestro objetivo general propuesto durante la realización de este trabajo consistió en indagar los mecanismos celulares subyacentes a la disminución de los niveles proteicos de la fosfatasa de ARN Dusp11 durante el estrés celular agudo.

En primer lugar, analizamos el curso temporal de los niveles de Dusp11 en células A549 expuestas al agente estresor arsenito. Nuestros resultados indican que la exposición al agente estresor, el cual dispara la ISR, induce a una rápida disminución transitoria en los niveles de la fosfatasa, alcanzando niveles mínimos entre una y tres horas post- estrés. A esta rápida disminución le sigue una lenta recuperación que inicia cerca de las 3 horas posteriores al pulso de arsenito.

En segundo lugar, evaluamos los niveles de fosforilación del factor de inicio de la traducción 2α (eIF2 α) en función del tiempo para células A549 que fueron estresadas con arsenito. Encontramos que los niveles de eIF2 α fosforilado aumentaron notablemente tras una hora de exposición al agente estresor mostrando una correlación con la disminución en los niveles de Dusp11. Estos resultados nos permiten plantear que el estrés produce la activación de la ISR, la cual conduce a un aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado. Este aumento provoca una reducción de la eficiencia de inicio de la traducción que ocasiona un silenciamiento traduccional global. Es este silenciamiento traduccional quien hipotetizamos es responsable de la disminución en los niveles de Dusp11 (figura 16).

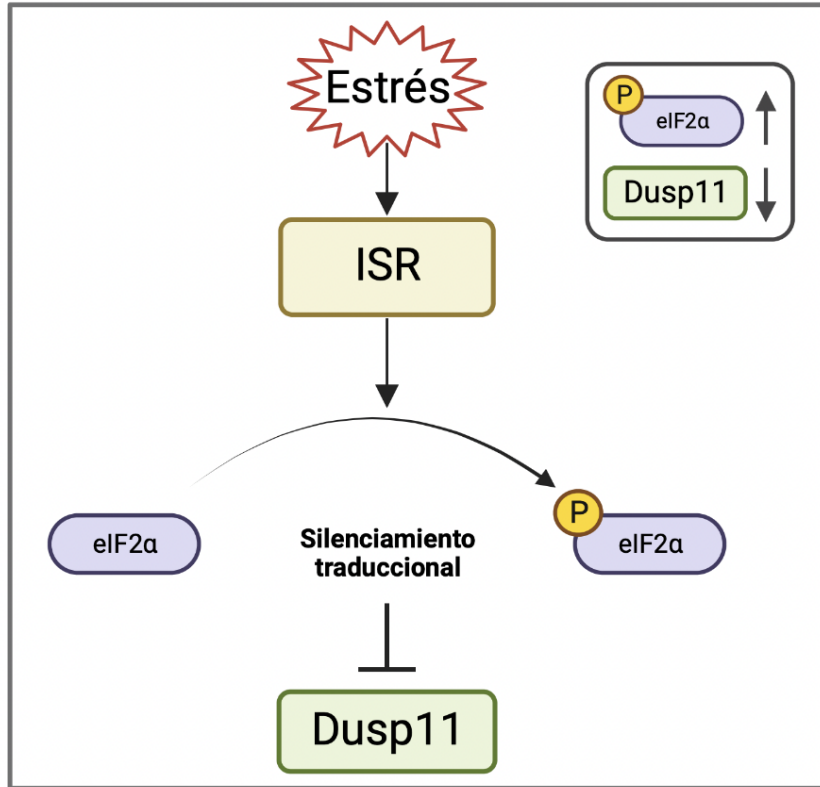


Figura 16. Representación esquemática del razonamiento planteado. El aumento en los niveles de eIF2α-P conduce a un silenciamiento traduccional global que produce una disminución en los niveles de Dusp11

En pos de confirmar si el silenciamiento traduccional global era el responsable de la disminución en los niveles de Dusp11, lo siguiente que realizamos fueron experimentos de arresto traduccional con cicloheximida. Fuimos capaces de observar que los niveles de Dusp11 comenzaron a disminuir tras 15 minutos de exposición al inhibidor traduccional (CHX) y se vieron reducidos a la mitad tras aproximadamente una hora de exposición. Encontramos así que Dusp11 desaparece al detener la traducción global y que muestra una corta vida media de aproximadamente una hora.

Tras haber identificado que Dusp11 es una proteína con alta tasa de recambio, indagamos acerca de los potenciales mecanismos de degradación. En primera instancia, análisis *in silico* nos permitieron proponer a Dusp11 como potencial target de la autofagia mediada por chaperonas, luego de haber identificado la presencia de motivos de tipo KFERQ expuestos en la superficie proteica de la fosfatasa.



Por último, realizamos experimentos con un inhibidor selectivo de la función lisosomal (cloroquina), el cual se emplea ampliamente para bloquear la degradación por la vía de CMA. Encontramos que inhibir la autofagia mediada por chaperonas produce cambios en la tasa de degradación de Dusp11 frente a la detención traduccional, permitiéndonos así proponer que la CMA juega un rol clave en la degradación de Dusp11.

Los estudios presentados en esta tesis de licenciatura nos acercan a comprender los mecanismos de degradación de Dusp11 durante la respuesta integrada al estrés, así como también nos plantea diversas preguntas que será interesante intentar responder en futuros trabajos.



5. Materiales y métodos

Líneas celulares

Utilizamos la línea de células epiteliales de adenocarcinoma alveolar, A549 adquirida en la ATCC (American Tissue Culture Collection). Cultivamos las células en estufa a 37°C y 5% CO₂, utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Sigma) suplementado con 10% suero fetal bovino (Natocor) y los antibióticos penicilina y estreptomina (1.106 U/100 ml y 1g/100 ml respectivamente, Richet).

Las líneas celulares fueron mantenidas siempre a bajo número de pasajes y sometidas a chequeo periódico para detección de micoplasma.

Para repicar las células se aspiró el medio de cultivo, se lavó con PBS1x y se incubó durante 5 minutos con 0,5ml de 0.5% Tripsina, 0.2% EDTA para digerir la matriz extracelular y despegar las células. La acción de la tripsina fue inactivada por agregado de medio completo.

Drogas y tratamientos

Todas las drogas utilizadas fueron solubilizadas en agua o en DMSO, según corresponda. Estas soluciones fueron directamente agregadas al medio de cultivo condicionado.

Para inducir estrés oxidativo en la células se agregó directamente al medio celular arsenito de sodio en concentración final de 250 μ M durante 1 hora. Luego se retiró el medio con arsenito y se les colocó medio condicionado dejándolas recuperar durante distintos tiempos.

Para provocar la detención traduccional, las células fueron expuestas a Cicloheximida en una concentración final de 50 μ g/ml. Luego se obtuvieron los extractos proteicos a distintos tiempos de exposición.

El tratamiento con cloroquina se realizó agregando la droga directamente sobre el cultivo celular en concentración final de 100 μ M en simultáneo con el agregado de cicloheximida en concentración final de 10mg/ml. Los extractos proteicos fueron obtenidos a distintos tiempos.



Western Blot

Extractos de células en cultivo

Los extractos proteicos fueron obtenidos por lisis de las células en buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (cocktail antiproteasa de Sigma) e inhibidores de fosfatasa (50 mM ortovanadato y 1M NaF) durante 30 minutos a 4°C seguido de centrifugación a 13.200 rpm durante 15 minutos a 4°C descartando el pellet que contiene la debris celular.

Separación y Análisis de proteínas

Se utilizaron geles desnaturalizantes de acuerdo al método de Laemli. Se sembraron distintas cantidades de proteína en geles de 0.75 mm de poliacrilamida al 10%, con un gel de *stacking* de 5%. Las proteínas se separaron a 90-200 V y luego se transfirieron a 100 V durante una hora a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana fue teñida con el colorante rojo *Ponceau* a fin de evaluar la cantidad total de proteínas y fue lavada con una solución de ácido acético. Se realizó el bloqueo con una solución de leche 5 % en TBS-Tween 0,05 %v/v (TBS-T) incubando 1 hora a temperatura ambiente u *overnight* a 4°C. Las membranas fueron incubadas *overnight* a 4°C con la solución de anticuerpo primario en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa para revelar en ECL, o conjugado a IRDye para detección infraroja en Odyssey, en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se procedió a la detección con reactivo ECL prime (GE), según instrucciones del fabricante, empleando el equipo LAS4000 o directamente para la detección en Odyssey CLx.

Se utilizaron las herramientas provistas por el software *Image J* (Rasband,1997-2018) para cuantificar la intensidad de las bandas de interés y el software Empiria Studio 2.2. Se normalizó empleando tubulina y/o la tinción con rojo *ponceau* como control de carga.

Anticuerpos para revelar en mediante Quimioluminiscencia:

Anticuerpos primarios:

- AntiDusp11 (1:2000) – origen: conejo - Proteintech
- α -tubulina (1:10.000) – origen: ratón - DSHB 12G10



Anticuerpos secundarios:

- Burro anti-conejo IgG HRP (1:20.000) - Sigma
- Burro anti-ratón IgG HRP (1:20.000) - Sigma

Anticuerpos para revelado infrarrojo:

Anticuerpos primarios:

- AntiDusp11 (1:1000) – origen: conejo - Proteintech
- α -tubulina (1:10.000) – origen: ratón - DSHB 12G10

Anticuerpos secundarios:

- Burro anti-conejo IgG IRDye 800CW - Sigma
- Burro anti-ratón IgG IRDye 700CW (1:20.000) - Sigma

Análisis estadísticos y gráficos

Los análisis estadísticos (one way ANOVA) fueron realizados asumiendo distribución gaussiana de los datos con el software GraphPad Prism.

Los gráficos mostrados en esta tesis se realizaron con los paquetes Plots y Statistics del lenguaje de programación Julia.

Las imágenes esquemáticas y adaptaciones se realizaron utilizando BioRender.

Predicciones estructurales

Los modelos predichos para cada proteína fueron obtenidos utilizando ColabFold v 1.0 (Miridita et al., 2021). Las determinaciones estructurales de las proteínas se realizaron con el software Alpha Fold 2 debido a su fácil acceso a través de Google Colab Notebooks sin un decaimiento significativo en su rendimiento de predicción. Cada predicción fue realizada sin la utilización de plantillas, alineamientos automáticos, minimización de energía Amber y num_recycles = 3 (valor predeterminado)



Predicción de área accesible al solvente (SASA)

La exposición al solvente se calculó utilizando los softwares Surface RACER y Pymol. Se utilizó un radio de solvente de 1.4 (valor estándar para agua)

Predicción de motivos de tipo KFERQ

Los motivos de tipo KFERQ se predijeron utilizando el software KFERQ-finder y las secuencias obtenidas desde UniProt.org

Los alineamientos múltiples globales se realizaron con Clustal Omega y se analizaron con BioEdit Sequence Alignment Editor.



6. Bibliografía

1. Costa-Mattioli, M., & Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6489), eaat5314. <https://doi.org/10.1126/science.aat5314>
2. Thomas, M. G., et al. (2011). "RNA granules: the good, the bad and the ugly". *Cellular signalling*, 23(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.011>.
3. Perez-Pepe, M., et al. (2018). "Life and Work of Stress Granules and Processing Bodies: New Insights into Their Formation and Function". *Biochemistry*, 57(17), 2488–2498. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00025>
4. Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J. S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., Sambhara, S., Kawaguchi, A., Osari, S., Nagata, K., Matsumiya, T., Namiki, H., Yoneyama, M., & Fujita, T. (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PloS one*, 7(8), e43031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043031>
5. Lang, R., & Raffi, F. (2019). Dual-Specificity Phosphatases in Immunity and Infection: An Update. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2710. <https://doi.org/10.3390/ijms20112710>
6. Lang, R., & Raffi, F. (2019). Dual-Specificity Phosphatases in Immunity and Infection: An Update. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2710. <https://doi.org/10.3390/ijms20112710>
7. Chen, YN., LaMarche, M., Chan, H. *et al.* Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* 535, 148–152 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature18621>
8. Kate I. Patterson, Tilman Brummer, Philippa M. O'brien, Roger J. Daly; Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* 15 March 2009; 418 (3): 475–489. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>
9. Yuan, Y., Li, D. M., & Sun, H. (1998). PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes. *The Journal of biological chemistry*, 273(32), 20347–20353. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20347>
10. Choi JH, Sullivan CS (2021) DUSP11 and triphosphate RNA balance during virus infection. *PLOS Pathogens* 17(1): e1009145. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009145>
11. James M. Burke & Christopher S. Sullivan (2017) DUSP11 – An RNA phosphatase that regulates host and viral non-coding RNAs in mammalian cells, *RNA Biology*, 14:11, 1457-1465, DOI: 10.1080/15476286.2017.1306169



12. Choi, J. H., Burke, J. M., Szymanik, K. H., Nepal, U., Battenhouse, A., Lau, J. T., Stark, A., Lam, V., & Sullivan, C. S. (2020). DUSP11-mediated control of 5'-triphosphate RNA regulates RIG-I sensitivity. *Genes & development*, 34(23-24), 1697–1712. <https://doi.org/10.1101/gad.340604.120>
13. Zhao, Y., et al. (2018). “RIG-I like receptor sensing of host RNAs facilitates the cell-intrinsic immune response to KSHV infection”. *Nature communications*, 9(1), 4841. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07314-7>
14. Vabret N., et al. (2019). “Y-RNAs Lead an Endogenous Program of RIG-I Agonism Mobilized upon RNA Virus Infection and Targeted by HIV”. *Biorxiv*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/773820v1>
15. Roy, J., et al. (2017). “Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses”. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(9), 3729–3745. <https://doi.org/10.1096/fj.201700170R>
16. Way, S. W., & Popko, B. (2016). Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 15(4), 434–443. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00381-6)
17. Ding, W. X., & Yin, X. M. (2008). Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy*, 4(2), 141–150. <https://doi.org/10.4161/auto.5190>
18. Mortimore, G. E., & Pösö, A. R. (1987). Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annual review of nutrition*, 7, 539–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.002543>
19. Fuertes, G., Villarroya, A., & Knecht, E. (2003). Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(5), 651–664. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00382-5)
20. Fuertes, G., Martín De Llano, J. J., Villarroya, A., Rivett, A. J., & Knecht, E. (2003). Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *The Biochemical journal*, 375(Pt 1), 75–86. <https://doi.org/10.1042/BJ20030282>
21. Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C., & Wolf, D. H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *The EMBO journal*, 10(3), 555–562. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07982.x>
22. Von Mikecz A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *Journal of cell science*, 119(Pt 10), 1977–1984. <https://doi.org/10.1242/jcs.03008>



23. Wiles, B., Miao, M., Coyne, E., Larose, L., Cybulsky, A. V., & Wing, S. S. (2015). USP19 deubiquitinating enzyme inhibits muscle cell differentiation by suppressing unfolded-protein response signaling. *Molecular biology of the cell*, 26(5), 913–923. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1129>
24. Wing, S. S., Lecker, S. H., & Jagoe, R. T. (2011). Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(2), 49–70. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.586171>
25. Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., & Christensen, J. H. (2006). Protein misfolding and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 7, 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115737>
26. Bourdenx, M., Martín-Segura, A., Scrivo, A., Rodriguez-Navarro, J. A., Kaushik, S., Tasset, I., Diaz, A., Storm, N. J., Xin, Q., Juste, Y. R., Stevenson, E., Luengo, E., Clement, C. C., Choi, S. J., Krogan, N. J., Mosharov, E. V., Santambrogio, L., Grueninger, F., Collin, L., Swaney, D. L., ... Cuervo, A. M. (2021). Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell*, 184(10), 2696–2714.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.048>
27. Sotthibundhu, A., Promjuntuek, W., Liu, M., Shen, S., & Noisa, P. (2018). Roles of autophagy in controlling stem cell identity: a perspective of self-renewal and differentiation. *Cell and tissue research*, 374(2), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2829-7>
28. Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(6), 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
29. Dice J. F. (1982). Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 257(24), 14624–14627.
30. Dice J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in biochemical sciences*, 15(8), 305–309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
31. Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2016). AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy*, 12(2), 432–438. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1124226>
32. Park, C., Suh, Y. & Cuervo, A. Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun* 6, 6823 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7823>
33. Quintavalle, C., Di Costanzo, S., Zanca, C., Tasset, I., Fraldi, A., Incoronato, M., Mirabelli, P., Monti, M., Ballabio, A., Pucci, P., Cuervo, A. M., & Condorelli, G. (2014). Phosphorylation-regulated degradation of the tumor-suppressor form of PED by chaperone-mediated autophagy in lung cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 229(10), 1359–1368. <https://doi.org/10.1002/jcp.24569>



34. Zhou, J., Yang, J., Fan, X., Hu, S., Zhou, F., Dong, J., Zhang, S., Shang, Y., Jiang, X., Guo, H., Chen, N., Xiao, X., Sheng, J., Wu, K., Nie, Y., & Fan, D. (2016). Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer. *Autophagy*, 12(3), 515–528. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1136770>
35. Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B. A., Will, B., & Cuervo, A. M. (2019). Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS biology*, 17(5), e3000301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
36. Ali, S. A., Hassan, M. I., Islam, A., & Ahmad, F. (2014). A review of methods available to estimate solvent-accessible surface areas of soluble proteins in the folded and unfolded states. *Current protein & peptide science*, 15(5), 456–476. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327114232>
37. Fernández-Fernández, M.R., Gragera, M., Ochoa-Ibarrola, L., Quintana-Gallardo, L. and Valpuesta, J.M. (2017), Hsp70 – a master regulator in protein degradation. *FEBS Lett*, 591: 2648-2660. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12751>
38. Burke, J. M., et al. (2016). “DUSP11 activity on triphosphorylated transcripts promotes Argonaute association with noncanonical viral microRNAs and regulates steady-state levels of cellular noncoding RNAs”. *Genes & development*, 30(18), 2076–2092. <https://doi.org/10.1101/gad.282616.116>
39. Kincaid, R. P., et al. (2018). “RNA triphosphatase DUSP11 enables exonuclease XRN-mediated restriction of hepatitis C virus”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(32), 8197–8202. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802326115>
40. Zhang, L., Sun, Y., Fei, M., Tan, C., Wu, J., Zheng, J., Tang, J., Sun, W., Lv, Z., Bao, J., Xu, Q., & Yu, H. (2014). Disruption of chaperone-mediated autophagy-dependent degradation of MEF2A by oxidative stress-induced lysosome destabilization. *Autophagy*, 10(6), 1015–1035. <https://doi.org/10.4161/auto.28477>
41. Ali, A. B., Nin, D. S., Tam, J., & Khan, M. (2011). Role of chaperone mediated autophagy (CMA) in the degradation of misfolded N-CoR protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *PloS one*, 6(9), e25268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025268>
42. Eiermann, N., et al. (2020). “Dance with the Devil: Stress Granules and Signaling in Antiviral Responses”. *Viruses*, 12(9), 984. <https://doi.org/10.3390/v12090984>