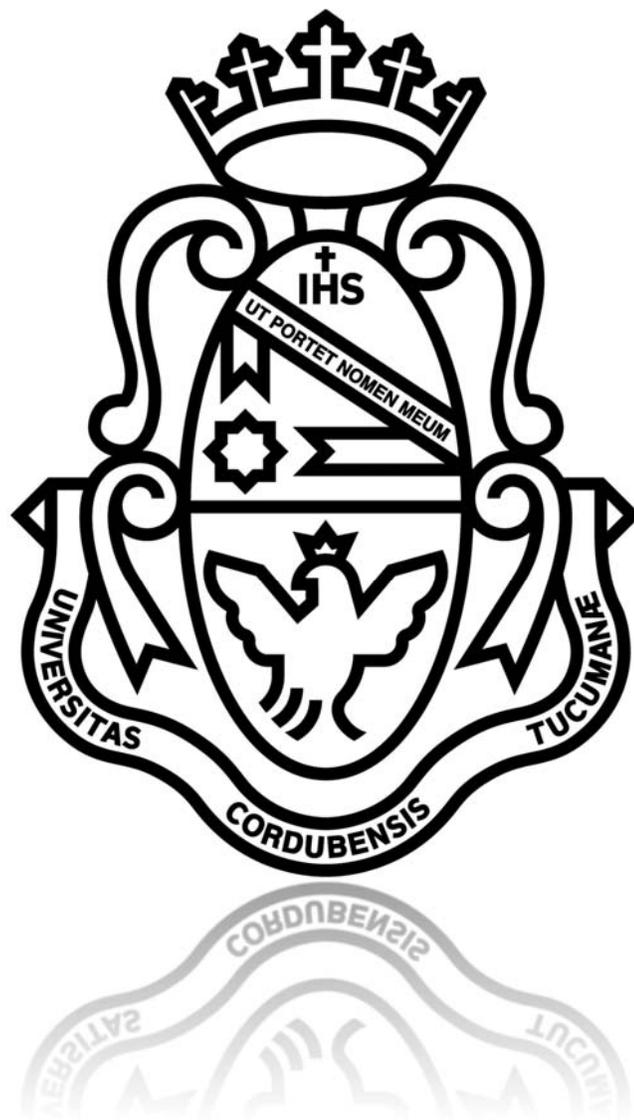


TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS QUÍMICAS



VICTOR ENRIQUE GOITEA

2014

# **EFFECTO DE LA ARGINILACIÓN DE CALRETICULINA SOBRE SU DEGRADACIÓN**

**Implicancia de la arginilación en la degradación a través de la vía  
ubiquitina-proteosoma**

Por el Lic. en Química: **Victor Enrique Goitea**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba  
CIQUIBIC (UNC-CONICET)

Córdoba, Junio 2014

**Director de Tesis:** Dra. Marta E. Hallak

**Comisión de Tesis:** Dra. Cecilia Álvarez  
Dra. Mariela Pérez  
Dr. Hugo Maccioni

**Evaluador externo:** Dr. Mario Rossi



# TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>SUMMARY</b> .....	9
<b>ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
Modificación postraducción de proteínas.....	14
Arginilación postraducción de proteínas: una modificación multi-función.....	15
La arginilación y su relación con la degradación de proteínas .....	17
Estructura, localización subcelular y degradación de CRT.....	22
Dimerización y oligomerización de CRT .....	26
Gránulos de estrés.....	27
El proteosoma, un complejo multi-proteico y multi-catalítico .....	28
Complejos proteosomales y mecanismos de degradación.....	30
Arginilación de CRT .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	37
Objetivos generales .....	37
Objetivos específicos .....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	39
<b>Capítulo 1</b>	
DEGRADACIÓN DE R-CRT ENDÓGENA.....	39
Efecto del inhibidor proteosomal en los niveles intracelulares de R-CRT .....	39
R-CRT endógena es sustrato del sistema proteolítico proteosomal.....	41
La degradación de R-CRT es independiente de la vía autofágica.....	42
<b>Capítulo 2</b>	
EXPRESIÓN CITOPLASMÁTICA DE CRT, R-CRT Y CRT NO ARGINILABLE FUSIONADAS A EGFP Y DEGRADACIÓN PROTEOSOMAL.....	45
Obtención de líneas celulares estables .....	45
La degradación de CRT en el citoplasma es independiente de la arginilación .....	48

Efecto del aminoácido NH <sub>2</sub> terminal en la vida media de CRT .....	53
Degradación de CRT-EGFP y R-CRT-EGFP en células ATE1 <sup>-/-</sup> .....	56
La arginilación es esencial para la ubiquitinación de R-CRT .....	57
Posibles secuencias de CRT que podrían señalar para su degradación proteosomal por una vía independiente de Ub .....	61
<b>Capítulo 3</b>	
¿POR QUÉ R-CRT NO SIGUE LA REGLA DE LA N? .....	<b>66</b>
La inhibición proteosomal produce acumulación de R-CRT en los GSs .....	66
La dimerización de R-CRT interfiere en su degradación proteosomal .....	68
Exposición de R-CRT a la superficie celular .....	72
<b>DISCUSION</b> .....	<b>77</b>
Mecanismos de degradación proteosomal de CRT y R-CRT .....	81
Implicancias de la dimerización, el reclutamiento en los GSs y la exposición a la membrana plasmática de R-CRT en su degradación proteosomal .....	84
Respuesta al estrés y su implicancia en la reparación al daño y reanudación de funciones .....	86
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>90</b>
Cultivo de células .....	90
Vectores de expresión .....	90
Clonado de la secuencia de Ub-CRT, Ub-R-CRT en pEGFP-N1 .....	90
Clonado de la secuencia de Ub-E1V-CRT en pEGFP-N1 .....	91
Clonado de la secuencia de CRT completa en pEGFP-N1 .....	92
Clonado de la secuencia de C146A-CRT completa en pEGFP-N1 .....	92
Transfecciones .....	92
Tratamiento con inhibidores .....	93
Anticuerpo específico contra R-CRT .....	93
Establecimiento de líneas celulares CHO estables .....	93
Inmunofluorescencia .....	93
Ensayo de vida media en células .....	94
Ensayo de ubiquitinación in vivo .....	94

Inmunoprecipitación .....	95
Electroforesis e inmunodetección de proteínas .....	95
Determinación de muerte celular .....	96
Análisis de citometría de flujo de R-CRT en la superficie celular .....	96
Adquisición y análisis de imágenes confocales .....	97
Análisis estadístico .....	97
REFERENCIAS .....	99

## RESUMEN

Las modificaciones postraduccion de proteínas son importantes para la regulación de la fisiología de la célula ya que contribuyen significativamente a la diversidad estructural y funcional de las proteínas.

Una de estas modificaciones es la arginilación, la cual consiste en la unión covalente de un residuo de arginina en el extremo  $\text{NH}_2$  de proteínas aceptoras, específicamente sobre ácido aspártico, ácido glutámico, o cisteína. Esta reacción es catalizada por la enzima arginil-ARNt transferasa (Ate1) tanto en el citosol como en el núcleo celular. En nuestro laboratorio se ha establecido previamente que calreticulina (CRT), una proteína mayoritariamente residente del retículo endoplásmico (RE), se retrotransloca al citoplasma donde es uno de los sustratos de la arginilación. Además, se demostró que en condiciones de estrés que conducen a una disminución de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , CRT arginilada (R-CRT) se asocia a gránulos de estrés (GSs) que son complejos de ARNm y cuya función se correlaciona con una reducción selectiva de la traducción proteica.

En el presente trabajo se describe la función de la arginilación de CRT en relación a la tasa de recambio ("turnover") de CRT citoplasmática, la cual modularía la estabilidad de la proteína. Además, se establece la vía de degradación de R-CRT en relación al rol que desempeña la arginilación.

En este estudio se demuestra que tanto R-CRT como CRT se degradan por la vía proteosomal, aunque R-CRT tiene menor susceptibilidad que CRT a ser degradada por el proteosoma. Se determinó que la vida media de R-CRT es el doble que la de CRT citoplasmática sin arginilar. Cuando se sobre expresaron ambas proteínas en células knockout para la enzima Ate1 (células ATE1<sup>-/-</sup>), se confirmó que R-CRT es degradada de manera menos eficaz que CRT por el proteosoma. También, se encontró que CRT es degradada por una vía independiente de ubiquitina (Ub), mientras que la degradación de R-CRT es vía dependiente de Ub. En nuestro laboratorio recientemente se demostró que la arginilación de CRT promueve un alto grado de dimerización. En este sentido, la sobre expresión de una mutante de CRT (C146A-CRT-EGFP) que impide la formación de homodímeros, muestra niveles menores de R-CRT respecto de los encontrados cuando se sobre expresa CRT de tipo salvaje (wt), indicando que la dimerización de R-CRT es en parte responsable de su estabilización. Por último, se encontró que tanto la expresión citoplasmática de R-CRT como la inhibición del proteosoma incrementan los niveles de R-CRT en la superficie celular. En su conjunto, estos resultados indican que una vez que CRT alcanza el citoplasma, la misma puede ser degradada por el proteosoma a través de una vía independiente de Ub o puede ser modificada por la

enzima Ate1 formando R-CRT, la cual también es susceptible a la degradación proteosomal pero por vía dependiente de Ub, mostrando una vida media más larga que la CRT no modificada. Por otra parte, la estabilización de CRT por medio de su arginilación y dimerización, le permitiría a CRT participar en diferentes funciones en el citoplasma e incluso en otros compartimientos subcelulares a los que podría acceder desde el citoplasma.

## SUMMARY

Post-translational modifications of proteins are important events for the regulation of cell biology and may contribute significantly to the structural and functional diversity of proteins.

One such modification is the post-translational arginylation, which consists of the covalent attachment of an Arg at the N-terminal residue of acceptor proteins in the cytosol, more specifically on Asp, Glu, oxidized Cys. This reaction is mediated by the enzyme arginyl-tRNA protein transferase (Ate1), which catalyzed the arginylation of proteins in the cytosol and in the nucleus. In our laboratory, we have previously established that calreticulin (CRT), an endoplasmic reticulum resident protein, is one of the substrates of arginylation within the cytoplasm. Furthermore it was shown that under stress conditions that lead to reduced intracellular Ca<sup>2+</sup> levels, arginylated CRT (R-CRT) was associated with mRNA complexes silencing loci called stress granules (SGs).

In the present study we describe the role of arginylation of CRT in modulating the turnover rate of cytoplasmic CRT. Moreover, we established the degradation pathway of R-CRT according to the function of the post-translational arginylation.

These studies demonstrates that both isoforms, R-CRT and CRT, are degraded by the proteosomal pathway, although the half-life of R-CRT is longer than that of CRT. We determined that the half-life of R-CRT is twice than that of non-arginylated CRT. When both proteins were expressed in Ate1 knockout cells (ATE1<sup>-/-</sup> cells), we confirmed that R-CRT is degraded less efficiently than CRT. We also found that CRT is degraded by a ubiquitin (Ub)-independent pathway, whereas R-CRT is degraded by a Ub-dependent pathway. Recently, It was demonstrated that arginylation of CRT promotes a higher degree of dimerization compared to the non-arginylated protein. Thus, the expression of a CRT mutant (CRT-C146A-EGFP), which cannot form dimers, showed lower levels of R-CRT compared to those cells expressing CRT is overexpressed wild-type (wt), indicating that dimerization of R-CRT is partly responsible for its stabilization. Finally, we found that the levels of R-CRT on the cell surface increased upon cytoplasmic expression of R-CRT or proteasome inhibition treatment. These results indicate that once CRT retrotranslocates to the cytoplasm, it can be degraded by the proteasome in a Ub-independent pathway or it can be arginylated by Ate1, and this isoform is able to be ubiquitinated and degraded by the proteasome or can escape from degradation through SGs association, dimer formation or cell surface dislocation. This means that after CRT stabilization through its arginylation, this post-translational modification can determine different functions in the cytoplasm other subcellular compartments that could be accessed from the cytoplasm.

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ADNc	Acido desoxiribonucleico copia
arginil-ARNt	Acido ribonucleico de transferencia cargado con el aminoácido Arg.
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia
Asp	Aminoácido acido aspártico
Ard1	“ADP-ribosylation factor domain protein 1”
Arg	Aminoácido acido arginina
Ate1	Enzima transferasa: “arginyl-tRNA protein transferase”
ATP	Trifosfato de adenosina: “adenosin triphosphate”
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
CHX	Cicloheximida: “cycloheximide”
CRQ	Cloroquina: “Chloroquine”
CUGBP1	“ <b>CUG-binding protein 1</b> ”
Cys	Aminoácido cisteína
CRT	Calreticulina
DMEM	Medio esencial minimo de Eagle modificado por Dulbecco/Vogt: “ <i>DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ”
DTT	“ditiotreitól”
DUBs	“Deubiquitinating enzymes”
EDTA	Quelante de calcio y magnesio: “ <b>Ethylenediaminetetraacetic acid</b> ”
E.E.	Error estándar
EGFP	Proteína fluorescente verde: “ <b>enhanced green fluorescence protein</b> ”
EGTA	Agente quelante de calcio: “ <b>ethylene glycol tetraacetic acid</b> ”
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico: “ <b>endoplasmic reticulum associated degradation</b> ”
ERp57	“ <b>Endoplasmic reticulum protein 57</b> ”
EYFP	Proteína fluorescente amarilla: “ <b>enhanced yellow fluorescence protein</b> ”
FTC	Fluorescencia total por célula
Glu	Aminoácido ácido glutámico
Grp94	Proteína chaperona de 94 KDa
GSs	Gránulos de estrés.
HA	“ <b>Hemagglutinin</b> ”

HIF	“Hypoxia-inducible factors”
HEPES	“4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”
HSP90	“Heat shock protein” 90
IDPs	Proteína o motivo intrínsecamente desordenado: “intrinsically disorder proteins”
IFN	Interferón
kDa	Unidad de masa atómica Dalton (Da) 1000Da = 1kDa
LACTA	Lactacistina: “lactacystin”
Leu	Aminoácido leucina
Lys	Aminoácido lisina
K <sup>+</sup>	Ión potasio.
KDEL	Secuencia de retención en el retículo endoplásmico.
LRP1	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad: “low density lipoprotein receptor-related protein 1”
Mg <sup>2+</sup>	Ión magnesio
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I: “major histocompatibility complex class I”
mTOR	Blanco mamífero de rapamicina: “mammalian target of rapamycin”
ODC	Ornitina decarboxilasa: “ornithine decarboxylase”
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida: “polyacrilamide gel electrophoresis”
PBS	Buffer fosfato salino: “Phosphate buffered saline”
PDB	Banco de datos de proteínas: “protein data bank”
PEST	Secuencia rica en los aminoácidos prolina, glutámico, serina y treonina
PKC	Proteína quinasa C: <b>Protein kinase C</b> )
PS	Péptido señal
RAPA	Rapamicina: “rapamycin”
R-CRT	<b>Calreticulina arginilada</b>
RE	<b>Retículo endoplásmico</b>
RGS4	Proteína de la familia RGS: “Regulator of <b>G</b> protein signaling”
Rpn4	Partícula regulatoria no ATPasa 4: “Regulatory particle non-ATPase 4”
SDS	Dodecil sulfato de sodio: “sodium dodecyl sulfat <sup>e</sup> ”
SERCA	Bomba de calcio en el retículo endoplásmico: “sarcoplasmic/endoplasmic reticulum <b>Ca</b> <sup>2+</sup> -ATPase”
SRC3	“steroid receptor coactivator-3”
TCR	Receptor de células T “ <b>T</b> cell receptor”
TG	Tapsigargina: “Thapsigargin”

TIA-1	Proteína de unión a ARNm, marcador de gránulos de estrés: <b>T-cell intracytoplasmic antigen-1</b>
TIAR	Proteína de unión a ARNm: <b>"TIA-1 related protein"</b>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano (nombre IUPAC: 2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol)
TS	Timidilato sintetasa: <b>"Thymidylate synthetase"</b>
Ub	Ubiquitina: <b>"Ubiquitin"</b>
UBA	<b>"Ubiquitin-like modifier activating enzyme"</b>
UPS	<b>"Ubiquitin proteasome system"</b>
UV	Radiación Ultravioleta
WB	<b>"Western Blot"</b>
wt	<b>"wild type"</b>

# INTRODUCCION

# INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de tesis se expondrán resultados concernientes a la degradación de la isoforma arginilada de calreticulina (CRT). Tanto CRT citoplasmática como calreticulina arginilada (R-CRT), también citoplasmática, son degradadas por el sistema proteosomal. Sin embargo, la arginilación postraducción incrementa el tiempo de vida media de CRT y es necesaria para su ubiquitinación. La arginilación le confiere a CRT diferentes localizaciones subcelulares en circunstancias de estrés celular y un comportamiento diferente frente a la homodimerización, lo cual le proporciona mayor estabilidad metabólica.

A continuación serán introducidos varios conceptos en relación a la arginilación postraducción de proteínas, la degradación de proteínas y las características de CRT, los cuales serán fundamentales para la comprensión de los resultados y discusión de este trabajo.

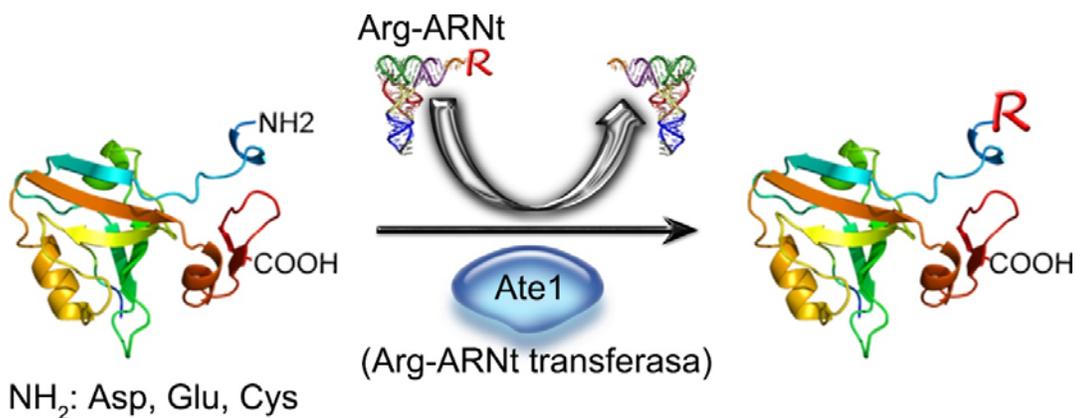
## ***Modificación postraducción de proteínas***

Las modificaciones postraducción de las proteínas imparten una gran complejidad a los proteomas eucariotas, en los cuales el número de isoformas puede ser varios órdenes de magnitud mayor que el número de genes en los genomas. La modificación de la secuencia de aminoácidos o de sus cadenas laterales son mecanismos esenciales de las células eucariotas para diversificar la función de sus proteínas y coordinar dinámicamente sus redes de señalización. Las modificaciones postraducción pueden cambiar las propiedades físico químicas de una proteína, influir en la actividad de una enzima, en su localización subcelular, en las interacciones con otras moléculas, en la modulación de cascadas de señalización e incluso en su estabilidad. De esta manera, las modificaciones postraducción juegan un papel crítico en la regulación de la fisiología de célula.

Las modificaciones más comunes incluyen la fosforilación (Morandell, Stasyk et al. 2006), acetilación (Polevoda and Sherman 2002), glicosilación (Harvey 2005), acilación (McIlhinney 1990), aminoacilación (Kaji, Kaji et al. 1963), nitrosilación (Kim, Kim et al. 2002), tirosinación y detirosinación (Barra, Arce et al. 1973; Hallak, Rodriguez et al. 1977), algunas de las cuales pueden establecerse y/o ser removidas de forma dinámica como un mecanismo para el control de la función de las proteínas. El estudio de las modificaciones postraducción comprende un campo de significancia biológica creciente ya que la evidencia sugiere que gobiernan diversos procesos fisiológicos que son usados para regular dinámicamente la función de las proteínas.

## **Arginilación postraducción de proteínas: una modificación multi-función**

Entre las modificaciones postraducción se encuentra la arginilación de proteínas, la cual consiste en la adición de una Arg, mediante unión peptídica en el extremo NH<sub>2</sub> de varias proteínas aceptoras en el citosol, sobre los aminoácidos Asp, Glu, o Cys (Soffer 1971; Kaji 1976; Hallak, Bongiovanni et al. 1991; Eriste, Norberg et al. 2005). Varios análisis bioquímicos sugieren que el aminoácido Cys en la posición NH<sub>2</sub> terminal no es un sustrato directo de la arginilación sino que primero es oxidado en ácido sulfínico Cys [CysO<sub>2</sub>(H)] o ácido sulfónico Cys [Cys O<sub>3</sub>(H)], generando una estructura que imita al Asp (Kwon, Kashina et al. 2002). La Arg que va a ser transferida es activada bajo la forma de arginil-ARNt por acción de la arginil-ARNt sintetasa, usando ATP, Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, como co-factores (Barra, Rodriguez et al. 1973; Hallak, Barra et al. 1985; Ciechanover, Ferber et al. 1988). Luego, en una segunda etapa, Arg es transferida a la proteína aceptora desde el arginil-ARNt por acción de la enzima arginil-ARNt transferasa (Ate1) (**Esquema 1**).



### **Esquema 1. Incorporación postraducción de Arg en proteínas.**

*El aminoácido Arg es transferido desde el arginil-ARNt a la proteína aceptora que posee en la posición NH<sub>2</sub> terminal un residuo Asp, Glu, o Cys. Esta reacción es catalizada por la enzima arginil-ARNt transferasa (Ate1 empleando como co-factores ATP, Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>).*

La enzima Ate1 se encuentra presente en todas las especies eucariotas, desde levaduras hasta humanos, y contienen un sólo gen que la codifica (Manahan and App 1973; Balzi, Choder et al. 1990; Kwon, Kashina et al. 1999; Rai and Kashina 2005). En procariontes, existe una modificación similar donde una enzima homóloga, la transferasa L/F, modifica a las proteínas por adición de los aminoácidos Leu y Phe (Graciet, Hu et al. 2006). Por lo tanto, la adición postraducción de aminoácidos a las proteínas se halla

altamente conservada por la evolución. El gen *ATE1* de ratón y humano codifica al menos seis isoformas generadas por “splicing” alternativo (Kwon, Kashina et al. 1999; Rai and Kashina 2005; Hu, Brower et al. 2006). Aunque estas isoformas tienen diferente actividad, niveles de expresión en tejidos y especificidad de sustrato, la diferencia funcional *in vivo* entre ellas no se conoce. En experimentos de fusión de Ate1 con la proteína fluorescente verde, se la ha localizado tanto en el citoplasma como en el núcleo y no posee secuencias de translocación al retículo endoplásmico (RE) (Kwon, Kashina et al. 1999). Por un lado la enzima Ate1 es esencial para la embriogénesis en mamíferos ya que ratones deficientes en esta enzima presentan letalidad embrionaria y defectos graves en el desarrollo cardiovascular, gametogénesis y morfología craneofacial (Kwon, Kashina et al. 2002; Rai, Wong et al. 2008; Leu, Kurosaka et al. 2009; Kurosaka, Leu et al. 2010). Por otro lado, la delección postnatal de *ATE1* afecta a varios sistemas fisiológicos, ocasionando pérdida de peso, retardo mental e infertilidad (Brower and Varshavsky 2009). En consecuencia, resulta claro la importancia fisiológica de Ate1, ya que su función en procesos de desarrollo es requerida para la supervivencia.

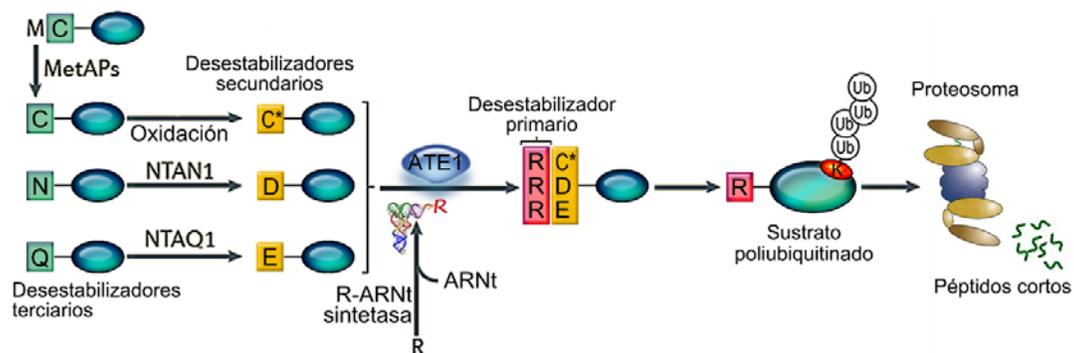
Respecto a los sustratos de Ate1, la evidencia demuestra que proteínas de diversos organismos, tipos celulares y fracciones subcelulares pueden servir como aceptores postraducción de Arg. Proteínas y péptidos tales como angiotensina II, neurotensina- $\beta$ -melanocito, albúmina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, tiroglobulina, insulina, y RGS4, entre otros, son sustrato de la reacción de arginilación (Soffer 1971; Soffer 1975; Ciechanover, Ferber et al. 1988; Zhang and Salter 1998; Davydov and Varshavsky 2000; Eriste, Norberg et al. 2005), sugiriendo que esta modificación constituye un mecanismo regulatorio elemental para su procesamiento intracelular previo a la secreción. Estas proteínas son arginiladas en el NH<sub>2</sub> terminal luego de la remoción del péptido señal (Soffer 1971; Ciechanover, Ferber et al. 1988). Además, numerosas proteínas solubles pueden incorporar Arg en diversos tejidos incluyendo el cerebro, riñón, hígado y células en cultivo (Barra, Arce et al. 1973; Rao and Kaji 1977; Hallak, Bongiovanni et al. 1991; Fissolo, Bongiovanni et al. 2000). Mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, distintas proteínas fueron identificadas como sustratos de la arginilación postraducción *in vitro* e *in vivo* (Fissolo, Bongiovanni et al. 2000; Lee, Tasaki et al. 2005; Decca, Bosc et al. 2006; Decca, Carpio et al. 2007; Wong, Xu et al. 2007; Xu, Wu et al. 2007). Entre estas proteínas se encontraron proteínas citosólicas, de la vía secretoria, factores de transcripción, genes relacionados a tumores, etc. En nuestro laboratorio se realizaron estudios sobre uno de los sustratos identificados: CRT (Decca, Bosc et al. 2006).

A través de los años, diversos estudios han reportado que procesos tales como envejecimiento, estrés, regeneración, sensibilidad a la temperatura, etc. se

correlacionan con los niveles de arginilación intracelular (Tanaka and Kaji 1974; Rao and Kaji 1977; Kaji, Hara et al. 1980; Lamon and Kaji 1980; Lamon, Vogel et al. 1980; Bongiovanni, Fissolo et al. 1999; Freitas Junior, Berti et al. 1999). Por lo tanto, la función de la arginilación *in vivo* parece ser altamente diversa e incluye la regulación de una gran variedad de proteínas y procesos fisiológicos probablemente relacionados con el desarrollo cardiovascular, angiogénesis y otros importantes procesos biológicos tanto en el período embrionario como en la adultez.

## **La arginilación y su relación con la degradación de proteínas**

Se ha postulado que una de las funciones de la arginilación postraduccion es inducir la degradación de proteínas por la vía proteosomal dependiente de ubiquitina (Ub) siguiendo la denominada regla de la N (**Esquema 2**) (Bachmair, Finley et al. 1986; Ciechanover, Gonen et al. 1990). Esta regla establece que el tiempo de vida media de las proteínas depende de la naturaleza del aminoácido en la posición NH<sub>2</sub> terminal. En eucariotas, hay dos ramas en la vía de la regla de la N, una dependiente de la arginilación del sustrato y la otra dependiente de la acetilación. De aquí en más nos referiremos únicamente a la regla de la N vía arginilación.



### **Esquema 2. Regla de la N en organismos eucariotas.**

Las enzimas Met amino peptidasas se encargan de remover en la mayoría de las proteínas el primer aminoácido Met con el que son sintetizadas. Los aminoácidos Cys, Asn o Gln son denominados desestabilizadores terciarios cuando se encuentran en el NH<sub>2</sub> terminal de una proteína. Cada uno de estos aminoácidos puede transformarse en un desestabilizador secundario: Cys oxidada ([C\*] por oxidación), Asp y Glu (deamidación mediada por NTAN1 o NTAQ1) respectivamente. A su vez estos aminoácidos son reconocidos por la enzima Ate1 que incorpora el residuo Arg (desestabilizador primario) en el NH<sub>2</sub> terminal, permitiendo el reconocimiento por el sistema de poliubiquitinación de proteínas. Esta última modificación postraduccion permite que la proteína blanco sea reconocida por el proteosoma 26S que se encarga de degradarla.

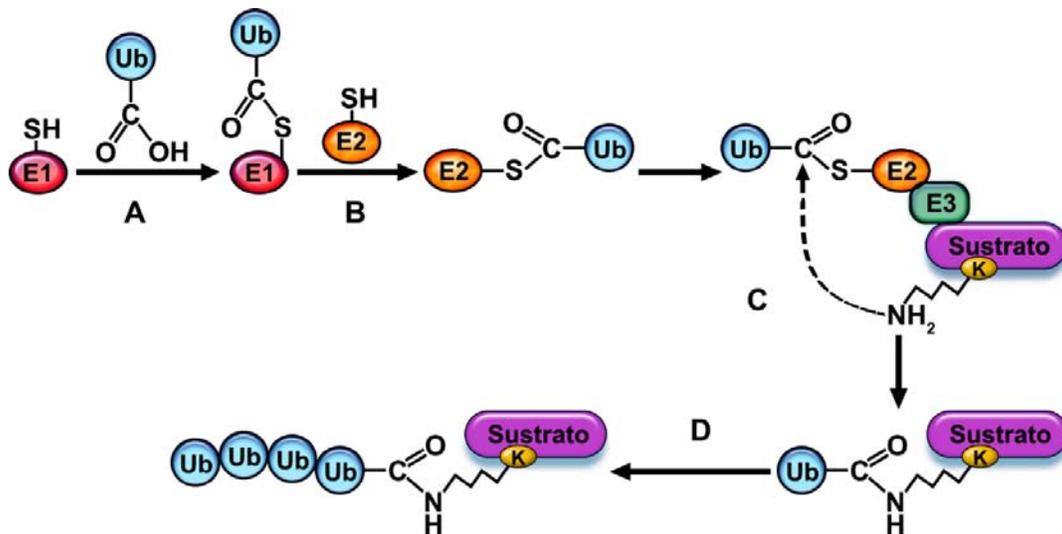
Los estudios iniciales modificando el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la proteína β-galactosidasa mediante la técnica de fusión de Ub fueron llevados a cabo por el grupo

de Varshavsky (Bachmair, Finley et al. 1986; Levy, Johnsson et al. 1996). Esta técnica genera proteínas con un aminoácido en el NH<sub>2</sub> terminal distinto a Met (residuo con el cual comienzan todas las proteínas al inicio de la traducción) a través del clivaje co-traducciona de la quimera Ub-X-péptido en la unión Ub-X por medio de una enzima deubiquitinasa, dejando expuesto el residuo NH<sub>2</sub> terminal de interés en la proteína. Empleando esta técnica, se determinó el tiempo de vida media *in vivo* para distintas isoformas de β-galactosidasa expresadas en *S. cerevisiae*. Así es como determinaron que el aminoácido Arg induce una proteólisis rápida de β-galactosidasa, disminuyendo su vida media de 20 h a 2 min aproximadamente. Esta estrategia también se empleó para controlar la concentración de la proteína de dominio de factor de ribosilación de ADP (Ard1) expresada en *S. cerevisiae* obteniéndose resultados similares (Park, Finley et al. 1992). También se empleó la técnica de fusión de Ub para desarrollar proteínas fluorescentes de vida media corta (10 min-2 h) (Dantuma, Lindsten et al. 2000). En base a estos experimentos, se concluyó que los residuos básicos e hidrofóbicos en el extremo NH<sub>2</sub> terminal son los que confieren el menor tiempo de vida media a la proteína y los denominaron aminoácidos desestabilizantes primarios. Los aminoácidos terminales Glu y Asp (sustratos de la arginilación) han sido denominados desestabilizantes secundarios porque son arginilados y las proteínas se tornan metabólicamente inestables (Gonda, Bachmair et al. 1989; Varshavsky 1992; Varshavsky 1995). Los aminoácidos Gln y Asn son desestabilizantes terciarios ya que por su deamidación dan lugar a la formación de aminoácidos desestabilizantes secundarios. De esta manera se constituyó la denominada regla de la N, que establece que el tiempo de vida media de una proteína está determinado por la naturaleza de su extremo NH<sub>2</sub> terminal (Varshavsky, Bachmair et al. 1987; Varshavsky 1996; Tasaki, Sriram et al. 2012).

Asimismo, se determinó que la arginilación postraducciona facilita la conjugación de Ub con la proteína, causando su posterior degradación vía proteosoma (Elias and Ciechanover 1990). El reconocimiento de sustratos que van a ser degradados por el proteosoma, requiere que los mismos tengan una cadena de poli-Ub formada por más de cinco unidades de Ub (Hicke 1999). En cambio, la adición de una sola unidad de Ub ha sido vinculada con la endocitosis y posterior degradación vía lisosoma de algunos receptores de membrana (Helliwell, Losko et al. 2001; Hicke and Dunn 2003).

La Ub es un péptido de 76 aminoácidos presente en todas las células eucariotas. La secuencia de esta molécula es muy conservada desde insectos a humanos (Hershko and Ciechanover 1986; Jentsch, Seufert et al. 1991). La función más conocida de la Ub es la de dirigir a las proteínas al complejo multicatalítico proteosoma para su degradación (Hershko, Ciechanover et al. 1980). Numerosos procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, respuesta a estrés, apoptosis y ciclo celular son

regulados por la degradación de proteínas ubiquitinadas (Joazeiro and Hunter 2000; Sriram, Kim et al. 2011).



**Esquema 3. Cascada de ubiquitinación.**

(A) La enzima E1 se une a Ub a través del grupo sulfidrilo (SH) de un residuo Cys. (B) Por medio de una reacción de transtioesterificación, la enzima E1 transfiere Ub a la enzima E2. (C) La Enzima E2 en forma concertada con la enzima E3 transfiere Ub al grupo  $\text{NH}_2$  de la cadena lateral de una Lys interna del sustrato. (D) Elongación de la cadena de Ub.

En la ubiquitinación postraducción de proteínas, Ub se une a una Lys interna de la proteína mediante unión covalente entre el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys y el ácido carboxílico de la Gly terminal de Ub, formando un enlace amida isopeptídico (Pickart 2001). En esta reacción intervienen al menos tres componentes enzimáticos (Neutzner and Neutzner 2012) (**Esquema 3**). La primera enzima en la cascada se denomina E1 y activa Ub ligándola a un residuo Cys de la enzima, proceso que es dependiente de ATP (**Esquema 3A**). Uba1 y Uba6 son las enzimas activadoras E1, de las cuales Uba1 es la principal enzima responsable de la conjugación de Ub, mientras que Uba6 es una enzima alternativa que representa el 5-10 % de Uba1 (Jin, Li et al. 2007). La enzima E1 transfiere Ub a la enzima E2 (se han descrito entre 10 y 20 enzimas E2 en una determinada especie) a través de una reacción de transtioesterificación (**Esquema 3B**), la cual por sí misma o en forma concertada con la enzima E3 ligasa, adiciona Ub al sustrato (**Esquema 3C**). A diferencia de Uba1 que interviene con una gran variedad de enzimas E2, Uba6 lo hace solo con una de ellas, Use1 (Jin, Li et al. 2007). Dada la gran variedad de enzimas E3 ligasas, se cree que son las que proveen especificidad en el momento de determinar qué sustratos deben ser ubiquitinados y aceleran la transferencia de Ub desde una enzima E2 al sustrato. Una vez unida la primera molécula

de Ub al sustrato, otras unidades de Ub se adicionan a una lisina interna de la primera formando una cadena de poli-Ub (**Esquema 3D**) que es reconocida por el complejo multicatalítico proteosoma (Hershko and Ciechanover 1998; Neutzner and Neutzner 2012).

Existen varias formas por las cuales se reconocen los sustratos que han de ser ubiquitinados; entre ellas: la naturaleza del aminoácido NH<sub>2</sub> terminal, la fosforilación, el plegamiento incorrecto (“misfolding”) de la proteína, etc. Para algunos sustratos, la ubiquitinación está determinada por alguna modificación en la E3 ligasa, que la convierte a una forma activada capaz de reconocer al sustrato. Al parecer, cada sustrato que va a ser degradado sigue una vía propia, temporalmente regulada por el estado fisiológico de la célula, con una combinación particular de enzimas E2 y E3 (de Bie and Ciechanover 2011).

Entre las enzimas E3 ligasas, Ubr1, Ubr2, Ubr4 y Ubr5 son las que están involucradas en el reconocimiento de proteínas dependiendo de la naturaleza del extremo NH<sub>2</sub> terminal (Tasaki, Mulder et al. 2005; Tasaki, Zakrzewska et al. 2009). Estas E3 ligasas reconocen en el NH<sub>2</sub> terminal de las proteínas sustratos a los aminoácidos básicos Arg, Lys e His, denominados desestabilizadores primarios tipo I, y a los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Phe, Tyr, Trp e Ile, llamados desestabilizadores primarios tipo II (Bartel, Wunning et al. 1990). En las E3 ligasas Ubr1 y Ubr2, el mecanismo de la selectividad de sustrato viene dado por el dominio UBR box, el cual consta de un motivo dedos de zinc que actúa como un dominio de reconocimiento de sustrato tipo I (Tasaki, Mulder et al. 2005; Xia, Webster et al. 2008; Tasaki, Zakrzewska et al. 2009). Las E3 ligasas mencionadas también requieren un residuo de Lys interno (sitio de la poliubiquitinación) y una extensión desestructurada del NH<sub>2</sub> terminal. Una vez que la E3 ligasa se une al residuo desestabilizador primario, media la ubiquitinación de las proteínas junto con Uba1 (E1) y Ube2 activada (E2) o Uba6 (E1) y Use activada (E2), y su degradación subsecuente por el proteosoma. En consecuencia, el aminoácido básico Arg es el principal señalizador de degradación en eucariotas a través de la arginilación postraducción de proteínas, ya que el agregado de Arg en el extremo NH<sub>2</sub> terminal posibilitaría el reconocimiento por alguna de las enzimas E3 ligasas mencionadas anteriormente. Además, los NH<sub>2</sub> terminales Asn, Gln, Asp y Glu, así como también Cys bajo determinadas condiciones metabólicas, son desestabilizadores debido a sus modificaciones previas, las cuales incluyen la deamidación y la arginilación del NH<sub>2</sub> terminal.

Numerosos investigadores han observado en diversos tipos celulares la degradación de proteínas en el citosol (Bohley, Kopitz et al. 1988; Bohley, Kopitz et al. 1988; Bischoff, Bischoff et al. 1998) y lograron identificar proteínas blancas para la

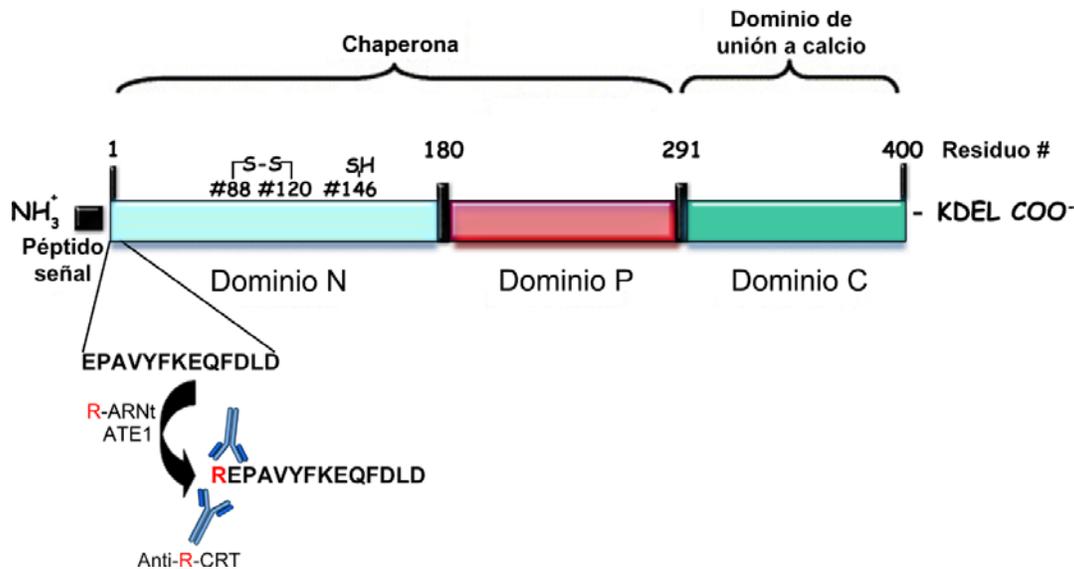
degradación por una vía dependiente de arginilación (Ciechanover, Ferber et al. 1988). Elias y Ciechanover demostraron que  $\alpha$ -lactalbumina, el inhibidor de la tripsina de soja y la cadena liviana  $\beta$  de la molécula de inmunoglobulina G humana, requieren la incorporación de Arg para ser reconocidas por Ubr1 (Elias and Ciechanover 1990). Todas estas proteínas poseen Glu en su extremo  $\text{NH}_2$  terminal. También se demostró que la arginilación de RGS4, RGS5 y RGS16 torna a estas proteínas metabólicamente inestables (Davydov and Varshavsky 2000; Lee, Tasaki et al. 2005). La degradación de estos sustratos incluye la escisión de Met en el  $\text{NH}_2$  terminal exponiendo así un residuo Cys el cual es arginilado generando un desestabilizante primario. También, se ha demostrado que los niveles de incorporación de Arg aumentan en condiciones en las que se incrementan el plegamiento incorrecto y la degradación de proteínas. Por ejemplo, luego de producirse una injuria por el pinzado del nervio ciático de rata, los niveles de incorporación de arginina se incrementan en diez veces (Shyne-Athwal, Riccio et al. 1986). Este resultado se interpretó como un mecanismo relacionado con la remoción de las proteínas dañadas durante la injuria. En este sentido, se descubrieron fragmentos naturales asociados a la neurodegeneración que son selectivamente destruidos previa arginilación y siguiendo la regla de la N, sugiriendo que esta vía contrarresta la neurodegeneración (Brower, Piatkov et al. 2013). Los fragmentos peptídicos corresponden a la porción COOH terminal de las proteínas Tau, TDP43 y  $\alpha$ -sinucleína y se demostró que son estabilizados metabólicamente en fibroblastos  $\text{ATE1}^{-/-}$  produciéndose acumulación y agregación de estos fragmentos. Análogamente, se determinó que una fracción del péptido A $\beta$ 42, derivado de la proteína precursora amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer, se arginila y es degradado por la vía de la regla de la N (Bongiovanni, Fidelio et al. 1995; Brower, Piatkov et al. 2013).

Por otra parte, la arginilación podría estar involucrada en la regulación de la estabilidad genómica a través del control de la degradación de la enzima deubiquitinasa Usp1, que se arginila luego de la deamidación del residuo Gln en el  $\text{NH}_2$  terminal (Piatkov, Colnaghi et al. 2012). Además, se descubrió que fragmentos proapoptóticos tales como Cys-RIPK1, Cys-TRAF1, Asp-BRCA1, Leu-LIMK1, Tyr-NEDD9, Arg-BID, Asp-BCL, Arg-BIM, Asp-EPHA4 y Tyr-MET son regulados vía regla de la N a través de su degradación selectiva (Piatkov, Brower et al. 2012). Inclusive, la característica desestabilizadora de los residuos del  $\text{NH}_2$  terminal de estos fragmentos se encuentra altamente conservada por la evolución, sugiriendo que la arginilación podría estar contribuyendo a establecer los umbrales que impiden a una señal proapoptótica, débil o transitoria, determinar un punto de compromiso con la apoptosis (Piatkov, Brower et al. 2012).

No obstante, se demostró que en algunos casos la arginilación y el destino metabólico de las proteínas arginiladas, no estaría vinculada con su degradación (Saha and Kashina 2011). En conjunto, estas evidencias indican que, aun cuando la degradación de proteínas juega un rol importante en determinar la estabilidad intracelular de ciertas proteínas arginiladas, el efecto global de la arginilación parece ser más complejo y se extiende a mecanismos de regulación de proteínas que afectan su estructura, las interacciones moleculares y las funciones *in vivo*. En este sentido, recientemente se ha demostrado que la arginilación de un fragmento proteolítico de talina, proteína importante en la adhesión célula-matriz dependiente de integrina, tiene función en la adhesión célula-célula (Zhang, Saha et al. 2012). Por otro lado, la arginilación de miosina en plaquetas afecta su regulación por fosforilación y su contractilidad normal (Lian, Suzuki et al. 2013). También, la arginilación de  $\beta$ -actina *in vivo* facilita la migración celular (Karakozova, Kozak et al. 2006) y la correcta polimerización de la misma (Saha, Mundia et al. 2010). Sin embargo, en este caso hay un vínculo con la degradación dependiente de arginilación, ya que la arginilación de  $\gamma$ -actina es responsable de su degradación. Esta selección de destinos muy diferentes entre homólogos cercanos por medio de su arginilación ocurre a través de un mecanismo no convencional que relaciona la secuencia codificante del ARNm, la estabilidad de la proteína y la velocidad de traducción (Zhang, Saha et al. 2010). Por lo tanto, hay efectos de la arginilación que son dependientes y otros independientes de degradación y probablemente ambos jueguen un papel importante en la regulación de proteínas por arginilación *in vivo*.

### ***Estructura, localización subcelular y degradación de CRT***

CRT es una proteína multifuncional de 46 kDa que se encuentra mayoritariamente en el lumen del RE, donde conjuntamente con otras proteínas residentes de este compartimiento subcelular como calnexina y ERp57 (disulfuro isomerasa), cumple funciones de chaperona involucrada en el acompañamiento y plegamiento de polipéptidos nacientes, proteínas y glicoproteínas que transitan el RE (Hebert and Molinari 2007; Caramelo and Parodi 2008; Labriola, Giraldo et al. 2011). Además, CRT es la principal almacenadora de  $\text{Ca}^{2+}$  y participa en la regulación del metabolismo de este ión afectando una gran variedad de funciones celulares, participando en la señalización intracelular (Kwon, Park et al. 2000; Arnaudeau, Frieden et al. 2002).



**Esquema 4. Representación de los dominios de CRT.**

La proteína contiene una secuencia señal N-terminal (región negra), dominio-N (región celeste), dominio-P (región roja), dominio-C (región verde) y una secuencia KDEL C-terminal de retención en el RE. Los aminoácidos que participan en la formación del puente disulfuro se indican como S-S. La secuencia correspondiente a los primeros 13 aminoácidos del dominio-N es reconocida por el anticuerpo Anti-R-CRT únicamente cuando se encuentra arginilada.

CRT se muestra dividida en tres dominios (**Esquema 4**): el dominio N-terminal, correspondiente a la región más conservada de CRT; el dominio P, que se localiza en la región central; y el dominio C-terminal, el cual posee baja afinidad y alta capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . El dominio N-terminal y parte del C-terminal forman una estructura globular tipo lectina. En cambio, el dominio P consiste de una estructura tipo lazo que interrumpe el dominio globular y contiene dos motivos de secuencia ricas en Pro que se repiten en tándem tres veces. Hasta el momento solo se ha logrado cristalizar el dominio globular de CRT determinándose su estructura por cristalografía de rayos-X (Kozlov, Pocanschi et al. 2010; Pocanschi, Kozlov et al. 2011), mientras que el dominio de lazo se ha determinado por resonancia magnética nuclear (RMN) (Ellgaard, Riek et al.). Por una lado, el dominio N-terminal de CRT contiene una secuencia escindible o péptido señal N-terminal que la dirige al RE e incluye los sitios de unión a polipéptidos y carbohidratos (Leach, Cohen-Doyle et al. 2002; Kapoor, Ellgaard et al. 2004), un sitio de unión a  $\text{Zn}^{2+}$  (Baksh, Spamer et al. 1995) y un puente disulfuro entre las Cys88 y Cys120 (Andrin, Corbett et al. 2000). Además, la presencia de un sitio de alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  en este dominio le confiere estabilidad estructural a esta chaperona (Li, Stafford et al. 2001; Brockmeier, Brockmeier et al. 2009; Kozlov, Pocanschi et al. 2010), de tal modo que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es resistente a la acción de enzimas proteolíticas (Corbett

2000). El dominio P contiene los sitios de interacción con otras proteínas del RE, tales como ERp57 (Frickel, Riek et al. 2002; Leach, Cohen-Doyle et al. 2002) y ciclofilina-B (peptidil prolil isomerasa) (Kozlov, Bastos-Aristizabal et al. 2010), y presenta cierta flexibilidad que puede ser importante durante el plegamiento de otras proteínas. Tanto el dominio-N como el dominio-P son requeridos para la actividad chaperona de CRT (Leach, Cohen-Doyle et al. ; Kozlov, Pocanschi et al. 2010). Finalmente, el dominio-C es de especial interés porque contiene un gran número de residuos cargados negativamente que son responsables de la función de almacenamiento y regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Baksh and Michalak 1991; Nakamura, Zuppini et al. 2001; Wijeyesakere, Gafni et al. 2011). Este dominio une alrededor del 50% del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en el lumen del RE (Nakamura, Zuppini et al. 2001). Células deficientes en CRT tienen disminuida su capacidad de almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE (Nakamura, Zuppini et al.). En ratones, el déficit de CRT es letal durante el estadio embrionario debido a las alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Mesaeli, Nakamura et al. ; Guo, Nakamura et al. 2002). La región altamente ácida del dominio C-terminal también es responsable de la migración anómala de CRT a 60 kDa en ensayos de SDS-PAGE, en lugar de a 46 kDa correspondiente con su peso molecular. Además, la presencia del motivo KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) en este dominio especifica su unión al receptor KDEL, el cual recicla hacia el RE a proteínas que contienen KDEL y escapan hacia el complejo de Golgi (Dancourt and Barlowe 2010). El dominio C-terminal también es importante para la retrotranslocación de CRT desde el RE hacia citoplasma (Afshar, Black et al. 2005; Labriola, Conte et al. 2010), proceso que ocurre normalmente con proteínas mal plegadas destinadas a su degradación.

Como se mencionó previamente, CRT contiene una secuencia señal N-terminal escindible que la dirige al RE y una señal de KDEL de retención en este compartimiento (Denning, Leidal et al. 1997). Si bien, estas secuencias de aminoácidos son las responsables de su retención en el lumen del RE, desde su descubrimiento hace más de 35 años (Ostwald and MacLennan 1974), CRT sigue estando involucrada en una gran variedad de procesos que tienen lugar fuera del RE (Gold, Eggleton et al. 2010). En este sentido, se ha demostrado que CRT retrotransloca desde el RE hacia el citoplasma (Afshar, Black et al. 2005; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010; Petris, Vecchi et al. 2011), proceso que se ve exacerbado cuando existe una disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. El hallazgo de R-CRT en las células constituyó uno de los primeros indicios de la retrotranslocación de CRT (Decca, Carpio et al. 2007), ya que esta proteína solo se arginila si escapa hacia el citoplasma donde se encuentra la enzima Ate1. En cuanto a las funciones de CRT en el citoplasma, se ha descrito que esta proteína se une a la secuencia KXGFFKR del tallo citoplasmático de  $\alpha$ -integrina (Rojiani,

Finlay et al. 1991). Como resultado de esto, CRT ha sido propuesta como un activador de integrinas y un transductor de señal entre integrinas y canales de  $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática, mediando el acoplamiento entre la liberación y el influjo de  $Ca^{2+}$  (Kwon, Park et al. 2000). Otros estudios determinaron que CRT puede interactuar directamente con los receptores hormonales, tales como el receptor de glucocorticoides y andrógenos, y podría actuar como un antagonista inhibiendo la transcripción de genes sensibles a esteroides (Burns, Duggan et al. 1994; Dedhar, Rennie et al. 1994). Independientemente de este último trabajo, ha sido propuesto también que CRT participa en la exportación nuclear (Holaska, Black et al. 2001; Holaska, Black et al. 2002).

Además de la localización citoplasmática de CRT, también se ha encontrado a esta proteína en el núcleo, incluso en la superficie celular y la matriz extracelular (Roderick, Campbell et al. 1997; Ogden, deCathelineau et al. 2001; Goicoechea, Pallero et al. 2002; Somogyi, Petersson et al. 2003). En el núcleo, CRT es un componente de la matriz nuclear (Perrone, Tell et al. 1999; Yoon, Lee et al. 2000) y se une a histonas (Kobayashi, Uchiyama et al. 2006). En la superficie celular, CRT participaría en la presentación del antígeno y activación del complemento (Gao, Adhikari et al. 2002; Ghebrehiwet, Jesty et al. 2002; Donnelly, Roake et al. 2006), remoción de células apoptóticas (Gardai, McPhillips et al. 2005), inmunogenicidad de muerte celular en tumores (Obeid, Tesniere et al. 2007), cicatrización de heridas (Gold, Rahman et al. 2006; Nanney, Woodrell et al. 2008) y en adhesión y migración celular a través de señalización mediada por trombospondina y la proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) (Goicoechea, Pallero et al. 2002; Orr, Elzie et al. 2003; Orr, Pedraza et al. 2003). Debido al papel de CRT en estas actividades biológicas, esta proteína clásicamente residente del RE está siendo considerada un mediador crítico de procesos fisiológicos y patológicos, tales como la cicatrización de heridas, la respuesta inmune y el cáncer. Sin embargo, la regulación de procesos celulares mediada por CRT localizada en un determinado compartimiento celular, ya sea dentro del RE, o el citoplasma, o la superficie celular o la matriz extracelular, sigue siendo poco conocida.

Está bien establecido que CRT se expresa de manera diferente en los distintos tejidos, así como en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas (Qiu and Michalak 2009). Por ejemplo, condiciones de estrés del RE incrementan la expresión de CRT (Zhang, Szabo et al. 2007). Sin embargo, existen escasas evidencias acerca de la regulación proteolítica de CRT. En células mieloides humanas HL-60, CRT presenta una vida media de 4,5 días (Clark, Li et al. 2002), mientras que en la línea celular híbrida de neuroblastoma y glioma de ratas NG108-15 es de apenas 40 h (Xiao, Chung et al. 1999).

Estos valores de vida media corresponden al total de CRT en la célula sin hacer mención a ningún compartimiento subcelular. Dado que la mayor parte de CRT se encuentra en el RE se debería suponer que los tiempos de vida media determinados reflejan en mayor medida la estabilidad de la proteína en este compartimiento. En células NG108-15, se determinó que la vida media de CRT en la membrana plasmática es sustancialmente menor a la vida media de CRT interna, siendo de 12 h y 40 h respectivamente (Xiao, Chung et al. 1999). El sistema lisosomal es el responsable de la proteólisis de CRT de membrana ya que la inhibición lisosomal impide la degradación de CRT de membrana mientras que los inhibidores proteosomales no fueron capaces de bloquear su degradación. De modo similar, la vida media de CRT citoplasmática también podría ser diferente a la de CRT del RE. En este caso, es controversial si CRT es un sustrato del proteosoma (Afshar, Black et al. 2005; Labriola, Conte et al. 2010). Dada la importancia de CRT a nivel biológico y las funciones que desempeña, es relevante conocer su regulación metabólica en las diferentes localizaciones subcelulares en que se encuentra la proteína.

### ***Dimerización y oligomerización de CRT***

CRT contiene en su secuencia tres cisteínas, de las cuales Cys 88 y Cys 120 forman un puente disulfuro intramolecular, mientras que la tercera Cys 146 está libre (Hojrup, Roepstorff et al. 2001). Este grupo SH puede quedar expuesto y ser capaz de formar dímeros en condiciones que favorecen un desplegamiento parcial de la proteína tales como urea en concentraciones por encima de 2,6 M o dodecil sulfato de sodio (SDS) en concentraciones mayores a 0,025% (Jorgensen, Ryder et al. 2003). CRT también posee la capacidad de formar oligómeros a través de interacciones no covalentes, tal como se ha descrito para otras chaperonas como Grp94, Hsp90 (Wearsch and Nicchitta 1996; Yonehara, Minami et al. 1996; Nemoto, Ono et al. 2001) y calnexina (Ou, Bergeron et al. 1995; Zapun, Darby et al. 1998; Ihara, Cohen-Doyle et al. 1999). Aunque la formación de puentes disulfuros en CRT no parece ser necesaria para el proceso de oligomerización, no se descarta la posibilidad de que el dímero conteniendo puente disulfuro pueda participar en la estabilidad de los oligómeros (Jorgensen, Ryder et al. 2003). Los oligómeros de CRT son bastante estables, pero pueden ser disociados por la adición de agentes desnaturizantes tales como urea 8 M o SDS 1%.

Funcionalmente, los dímeros de CRT, al igual que los oligómeros, muestran un incremento en su actividad chaperona en relación al monómero, reconociendo más eficientemente a las proteínas desnaturizadas (Jorgensen, Ryder et al. 2003).

Además, se ha demostrado que los oligómeros de CRT son activadores de macrófagos más potentes que el monómero de CRT (Huang, Zhao et al. 2013).

### ***Gránulos de estrés (GSs)***

Las células eucariotas responden a los estímulos de estrés interrumpiendo la síntesis de proteínas para redirigir la energía anabólica hacia la reparación del daño inducido. Este arresto en la traducción es selectivo, ya que la traducción de algunos transcritos se reprime mientras que la de otros se mantiene o incluso aumenta (Williams 2001). Los ARNm que presentan un incremento en la traducción, corresponden especialmente a factores de transcripción y proteínas chaperonas del tipo “heat shock proteins” (Kawai, Fan et al. 2004).

Los GSs son complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) que se forman como respuesta a una injuria celular como por ejemplo, estrés térmico, estrés oxidativo, estrés del RE, privación de nutrientes, etc. Los GSs están constituidos por subunidades ribosomales pequeñas, factores de iniciación de la traducción y proteínas de unión a ARNm vinculados al silenciamiento de la traducción o estabilidad de los ARNm. Aunque los GSs son represores de la traducción y su formación se correlaciona con la disminución de la traducción de proteínas (Kedersha, Ivanov et al. 2013), no conllevan necesariamente a una represión global de la traducción (Buchan and Parker 2009; Mokaš, Mills et al. 2009). Durante esta respuesta al daño, muchas proteínas que participan normalmente en la traducción de ARNm asumen funciones diferentes determinando el destino (almacenamiento, degradación o reiniciación de la traducción) de los transcritos según la severidad del estrés generado (Anderson and Kedersha 2002; Anderson and Kedersha 2006). De esta forma las células pueden activar mecanismos de defensa para sobrevivir o bien, si esta activación no alcanza para revertir el daño, se inicia el proceso de muerte celular programada (apoptosis). Esto depende del tipo, duración y severidad del daño ocasionado por el estrés. Luego de la supresión del estrés, y siempre que no se haya sobrepasado un umbral de daño que determine apoptosis, los GSs se dispersan rápidamente luego de fusionarse en pequeños agregados (Kedersha, Cho et al. 2000). Por lo tanto, la formación de GSs tiene un rol importante en determinar el destino de la célula, estableciendo si es capaz de recuperarse o inducir apoptosis.

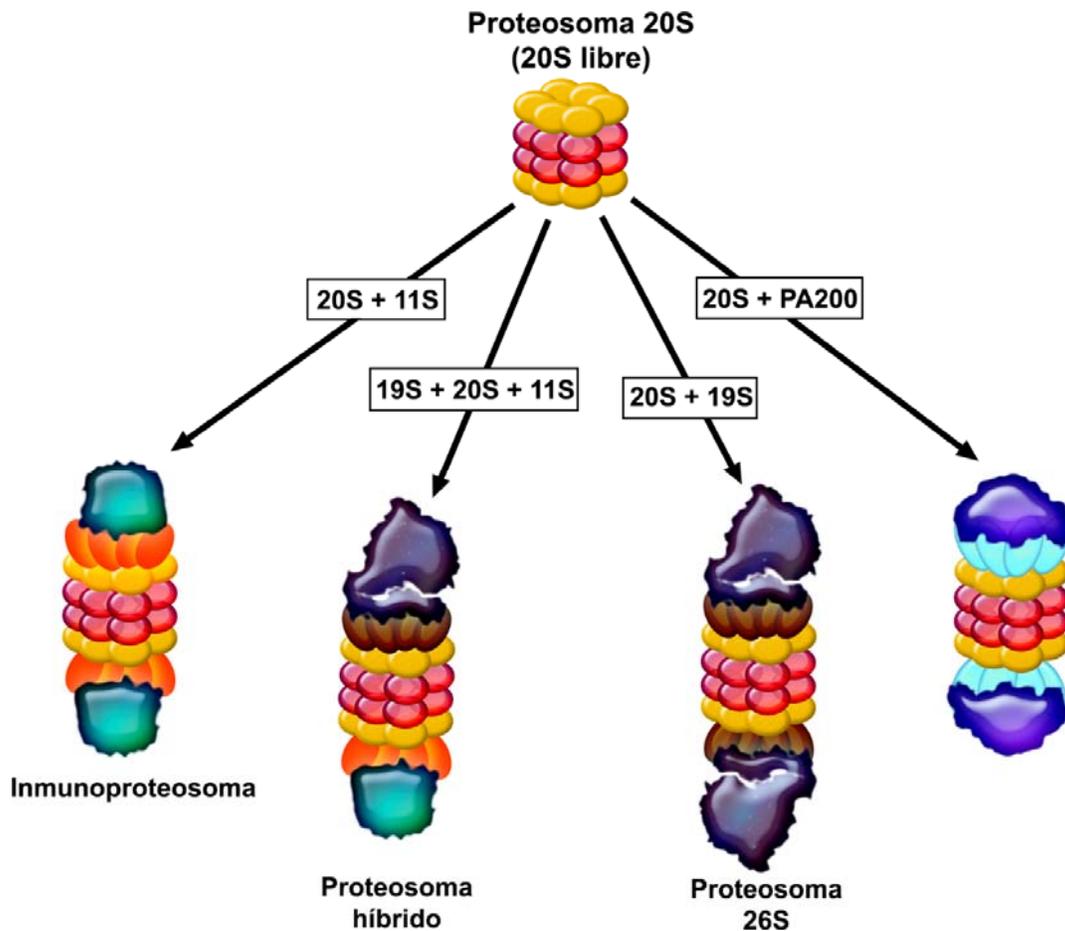
La composición de los GSs es muy variable y dependiente del inductor de estrés (Baez and Boccaccio 2005; Kedersha, Stoecklin et al. ; Leung, Calabrese et al. 2006). Además, la formación de los GSs puede estar inducida por la sobreexpresión de múltiples factores e inhibida por la depleción de otros (Ohn, Kedersha et al.). Otra característica de estas estructuras transitorias citoplasmáticas es que su forma y tamaño

varían con el tiempo y carecen de organización estructural (Gilks, Kedersha et al. 2004). Algunas de las proteínas asociadas a los GSs funcionan como andamiajes moleculares definiendo los dominios estructurales de los GSs (Anderson and Kedersha 2008). Entre las proteínas requeridas para el ensamblaje de los GSs se encuentran las proteínas de unión a ARNm TIA1 y TIAR (Kedersha, Gupta et al. 1999; Kedersha, Cho et al. 2000; Kedersha, Chen et al. 2002). Se postula que las modificaciones postraduccion de las proteínas integrantes de los GSs serían importantes para modular la función del ARNm durante el estrés, ya que modificaciones rápidas y reversibles, en algunos casos, permiten la adaptación al mismo sin necesidad de sintetizar nuevas proteínas (Ceman, O'Donnell et al. 2003; Ohn and Anderson 2010). Por lo tanto, el estudio de los sustratos de varias modificaciones postraduccion y de los mecanismos subyacentes a sus efectos es importante para comprender el origen, ensamblaje y función de estos agregados citoplasmáticos.

### ***El proteosoma, un complejo multi-proteico y multi-catalítico***

La naturaleza ha desarrollado una variedad de mecanismos de control de calidad de proteínas para mantener la proteostasis, minimizando el daño que las proteínas mal plegadas le pueden ocasionar a la célula. En las células hay dos sistemas de degradación de proteínas que desempeñan un rol central en esta función, uno es el proteosomal y el otro es el autofágico-lisosomal.

El sistema proteosomal está constituido por un complejo multi-proteico y multi-catalítico denominado proteosoma 20S al que se asocian diferentes clases de proteínas reguladoras que da origen a diferentes formas de proteosomas (Tanahashi, Murakami et al. 2000). Este complejo proteosomal es de 700 kDa, tiene actividad proteasa y se encuentra tanto en las bacterias archaea como en las células de animales y plantas (Lowe, Stock et al. 1995; Stock, Ditzel et al. 1995). La estructura del proteosoma 20S (**Esquema 5**) es cilíndrica, constituida por cuatro anillos dispuestos en un arreglo  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  (Groll, Ditzel et al. 1997; Unno, Mizushima et al. 2002), donde cada anillo  $\alpha$  o  $\beta$  está formado por siete subunidades diferentes, de las cuales solo tres subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$ ) presentan actividad proteolítica:  $\beta_1$  presenta una actividad del tipo caspasa (escinde luego de un aminoácido ácido);  $\beta_2$  presenta una actividad del tipo tripsina (escinde luego de un aminoácido básico); y  $\beta_5$  presenta una actividad del tipo quimotripsina (escinde luego de un aminoácido neutro) (Groll and Huber 2004).



**Esquema 5. El proteosoma eucariota y sus diferentes formas.**

Las distintas clases de proteosomas se encuentran formadas por el complejo 20S y uno o dos complejos reguladores (11S, 19S, PA200) que lo hace distintivo.

En estado “inactivo”, el proteosoma presenta baja actividad debido a que los dominios NH<sub>2</sub> terminales de las subunidades α bloquean la entrada de los sustratos a la cámara proteolítica. Sin embargo, estos NH<sub>2</sub> terminales tienen un motivo común YDR (Tyr8-Asp9-Arg10) que puede actuar como una “junta” curvando hacia afuera los extremos terminales que bloquean la entrada a la cámara proteolítica, permitiendo el ingreso de los sustratos a la misma (Groll, Bajorek et al. 2000). La entrada del proteosoma 20S “inactivo” tiene un diámetro de 0,9 nm mientras que en estado activado se extiende a 1,3-2,0 nm, lo cual es suficiente para el ingreso de una cadena polipeptídica (Kohler, Cascio et al. 2001). Así el proteosoma puede degradar proteínas desplegadas que exponen regiones hidrofóbicas, las cuales son reconocidas por las subunidades α. Si bien no se conoce el mecanismo de reconocimiento de estos sustratos, se postula que hay un cambio conformacional en las subunidades α inducido por la unión de residuos hidrofóbicos (Pratt, Morishima et al. 2010). Por otra parte, el

despliegamiento de las cadenas polipeptídicas de los sustratos proteosomales puede ser promovida por la disrupción de los enlaces disulfuro, por ejemplo, la ausencia de puentes disulfuro en  $\alpha$ -lactalbúmina es un prerrequisito para su degradación mediada por proteosoma (Wenzel and Baumeister 1995).

El proteosoma participa en la mayoría de los procesos celulares básicos degradando proteínas regulatorias o estructuralmente dañadas. De esta manera el sistema proteosomal desempeña funciones claves en la transducción de señales, la progresión del ciclo celular, la muerte celular, la respuesta inmune, el metabolismo, el control de calidad de las proteínas, etc. (Glickman and Ciechanover 2002; Varshavsky 2005; Finley 2009). En las células eucariotas, las proteínas reguladoras y las modificaciones postraducción le agregan un grado más de complejidad al sistema proteosomal y los procesos que controla, por lo que resulta importante entender cómo se entrelazan y se desempeñan en la célula.

### ***Complejos proteosomales y mecanismos de degradación***

Durante la evolución, el proteosoma fue ganando funciones gracias al desarrollo de proteínas reguladoras. Estos complejos reguladores se unen al proteosoma 20S modificando su afinidad por los sustratos y sus actividades proteolíticas (**Esquema 5**). En las células de mamíferos existen muchos reguladores e inhibidores del proteosoma 20S, el cual está involucrado en casi todas las funciones celulares así como también en el mantenimiento del funcionamiento celular.

El complejo regulador que mejor se conoce es el PA700 de 700 kDa (19S), el cual forma el proteosoma 26S (19S+20S) y el proteosoma 30S (19S+20S+19S), también llamado 26S, constituyendo de esta manera la principal proteasa del sistema Ub-proteosoma (UPS) (DeMartino, Moomaw et al. 1994; Liu, Millen et al. 2002). Este complejo regulador contiene al menos 19 subunidades diferentes, de las cuales 6 subunidades tienen actividad ATPasa (Rpt1-Rpt6) (Glickman, Rubin et al. 1998; Finley 2009). El complejo regulador PA700 se encarga de desplegar a las proteínas sustrato e introducir la cadena polipeptídica en el complejo proteosomal 20S, en un proceso dependiente de ATP,  $Mg^{2+}$  y Ub (Tanaka, Waxman et al. 1983; Deveraux, Jensen et al. 1995). Mientras que el complejo proteosomal 20S sólo reconoce y degrada proteínas dañadas o desplegadas, el proteosoma 26S degrada proteínas nativas y funcionales (Jung, Catalgol et al. 2009). En este caso, la poliubiquitinación de los sustratos constituye la señal de degradación para que el complejo regulador 19S los reconozca. Luego del reconocimiento del sustrato, esta cadena de poliubiquitina es desensamblada por enzimas deubiquitininasas (DUBs) para regenerar los monómeros de Ub que serán reutilizados en nuevos ciclos de ubiquitinación (Verma, Aravind et al. 2002; Yao and

Cohen 2002). Las DUBs producen un balance dinámico entre poliubiquitinación y deubiquitinación ayudando a mantener el estado estacionario del “pool” de proteínas de la célula. Además de degradar proteínas nativas y funcionales, el UPS también participa del control de calidad de proteínas mal plegadas y la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) (Raasi and Wolf 2007).

Otro tipo de proteosoma es el inmunoproteosoma inducible por IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , o lipopolisacáridos que se encuentra formado por el complejo regulador 11S (también llamado PA28 o REG) (Piccinini, Mostert et al. 2003; Stratford, Chondrogianni et al. 2006). Esta forma de proteosoma desempeña funciones específicas en la presentación de antígenos mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) durante la respuesta inmune, aunque no se descarta que pueda tener funciones no relacionadas a la respuesta inmune (Nelson, Loukissa et al. 2000). También se han hallado otros tipos de proteosomas en las células, tales como el proteosoma híbrido (19S-20S-11S) y el proteosoma formado por el complejo regulador PA200 (Tanahashi, Murakami et al. 2000). Sin embargo, no se conoce con exactitud la función de estos proteosomas, aunque se cree que el proteosoma formado por PA200 podría estar vinculado a la reparación del DNA (Ustrell, Hoffman et al. 2002) y a la espermatogénesis (Khor, Bredemeyer et al. 2006), ya que este complejo regulador solo se encuentra en núcleo. En células HeLa, se han determinado las cantidades relativas de cada tipo de proteosoma, siendo el proteosoma 20S libre un 41%, el inmunoproteosoma un 20%, el proteosoma híbrido un 24% y solo un 15% correspondería al proteosoma 26S (Tanahashi, Murakami et al. 2000). A pesar que más del 60% de los proteosomas participarían en vías independientes de Ub, son pocos los sustratos identificados que seguirían esta vía de degradación en comparación con la cantidad de sustratos de UPS identificados. De manera similar, la baja representatividad del proteosoma 26S en la degradación proteosomal contrasta con el hecho de que es el que mejor se conoce actualmente.

Estudios proteómicos sugieren que el 20% de los sustratos proteosomales se degradan por vía independiente de Ub indicando que todavía resta identificar muchos sustratos de esta vía degradativa (Baugh, Viktorova et al. 2009). Entre los sustratos del proteosoma que se degradan de manera independiente de Ub se encuentra la ornitina decarboxilasa (ODC) (Kopitz, Rist et al. 1990; Murakami, Matsufuji et al. 1992). Esta proteína puede ser degradada el proteosoma 26S en forma dependiente de ATP y antiénzima (AZ) (Murakami, Matsufuji et al. 1992). Un dominio COOH terminal de AZ promueve su unión a ODC, y un dominio NH<sub>2</sub> terminal estimula su degradación por proteosoma (Li and Coffino 1994). Además, ODC también es degradada por el proteosoma 20S, siendo inhibida esta degradación por la unión de la oxidoreductasa

NAD(P)H quinona 1 (NQO1) (Asher, Bercovich et al. 2005). Otra proteína que es degradada por ambos proteosomas (20S y 26S) de manera independiente de Ub es calmodulina (Tarcsa, Szymanska et al. 2000). Se ha descrito que la oxidación de la región NH<sub>2</sub> terminal de calmodulina induce un desplegamiento en la molécula que es esencial para la degradación mediada por el proteosoma 20S (Balog, Lockamy et al. 2009). Otras proteínas que se han descrito como sustratos proteosomales independientes de Ub incluyen:  $\alpha$ -synucleína, la fosfoproteína NS2 codificada por el parvovirus, LC-3, timidilato sintetasa (TS), Fra-1, y TCR $\alpha$  (Yu, Kaung et al. 1997; Miller and Pintel 2001; Tofaris, Layfield et al. 2001; Gao, Gammoh et al. 2010; Melo, Yoshida et al. 2010). La degradación de esta última, como consecuencia de su mal plegamiento en el RE, es catalizada por el proteosoma de manera independiente de Ub luego de su translocación al citosol.

Existen otras proteínas que son sustratos de ambos sistemas proteosomales, 26S dependiente de Ub y 20S independiente de Ub. Los sustratos mixtos más difundidos son p21, c-Fos, c-Jun y p53, aunque también se ha descrito a la partícula reguladora no-ATPasa 4 (Rpn4), el coactivador de los receptores esteroideos 3 (SRC3), el factor inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$ , tau y a un grupo de proteínas (p105, p107 y p130) que pertenecen a la familia de supresores de tumor de retinoblastoma (Rb) (Orlowski and Wilk 2003; Jariel-Encontre, Bossis et al. 2008; Eroles and Coffino 2013). En estos casos cada sistema proteosomal contribuiría de forma diferente al control de la tasa de recambio de la proteína dependiendo del contexto en el que se encuentre. Por ejemplo, la región NH<sub>2</sub> terminal de c-FOS controla su degradación dependiente de Ub cuando la proteína es citoplasmática y la degradación es independiente de Ub cuando la proteína es nuclear como en la fase G0/G1, mientras que la región COOH terminal de c-FOS solo se ha visto involucrada en la degradación vía independiente de Ub (Bossis, Ferrara et al. 2003; Sasaki, Kojima et al. 2006). Otro ejemplo, es HIF-1 $\alpha$  que en condiciones de normoxia es degradada rápidamente por el proteosoma de manera dependiente de Ub y en condiciones de hipoxia es estabilizada, pero se degrada por la vía independiente de Ub en presencia de inhibidores de la histona acetil transferasa o en condiciones de hipoxia crónica (Bardos and Ashcroft 2005; Kong, Lin et al. 2006). Sin embargo, en la mayoría de las proteínas no se conoce cuál sería el determinante bioquímico o estructural que las direcciona a uno u otro sistema proteosomal para su degradación.

La señalización de un sustrato del proteosoma podría ser llevada a cabo por una molécula accesoria o por una secuencia dentro del mismo sustrato. Ejemplo de lo primero son la antienzima AZ que promueve la degradación de ODC (Li and Coffino 1994); la proteína pp71 que induce la degradación de las proteínas Rb (Kalejta, Bechtel et al. 2003). Ejemplo de lo segundo es LC-3 en donde las hélices de su NH<sub>2</sub> terminal

actúan como señales para su degradación (Gao, Gammoh et al. 2010); Rpn4 requiere los residuos 1-80 (Ju and Xie 2004); TS necesita del residuo Pro en la posición 2 así como también la región NH<sub>2</sub> terminal (Pena, Melo et al. 2009); en Fra-1 son necesarios los últimos 30-40 aminoácidos (Basbous, Chalbos et al. 2007); etc. También, la mayoría de las proteínas que son degradadas por el proteosoma vía independiente de Ub pertenecen a la familia de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs), las cuales son desestructuradas en toda su extensión o parcialmente en una región de la molécula (Jariel-Encontre, Bossis et al. 2008). Ejemplo de proteínas sustratos del proteosoma que poseen regiones intrínsecamente desordenadas son ODC, Rpn4, TS, p21, p53, c-Jun,  $\alpha$ -synucleína, etc. Una característica particular de las regiones desordenadas es que le confieren a las proteínas función biológica cuando interaccionan con otras proteínas, adquiriendo una estructura particular en ese proceso y permaneciendo desordenadas cuando no participan de una interacción (Tompa, Szasz et al. 2005). Además, se ha descrito que las proteínas dañadas por estrés oxidativo serían degradadas principalmente por el proteosoma 20S, ya que el proteosoma 26S no puede hacerlo eficientemente (Jung and Grune 2008). En concordancia, esta degradación de proteínas oxidadas no requiere hidrólisis de ATP ni poliubiquitinación del sustrato (Davies 2001). Por otra parte, las modificaciones postraduccionales también pueden modificar el reconocimiento de los sustratos tal como lo hace la arginilación de proteínas (ver Introducción-La arginilación y su relación con la degradación de proteínas).

Como se puede deducir de este recopilado de proteínas degradadas por diferentes mecanismos proteosomales, la degradación proteosomal de proteínas es compleja y variada, ya que una misma proteína puede degradarse por más de una vía proteosomal, posiblemente dependiendo de modificaciones postraduccionales que tengan lugar en la molécula.

### ***Arginilación de CRT***

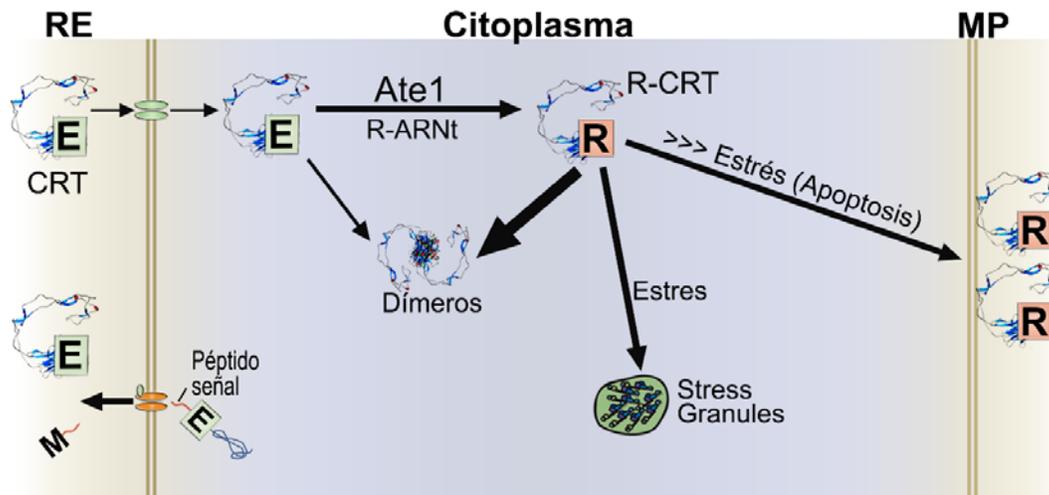
En nuestro laboratorio se identificaron varios sustratos de arginilación *in vitro* (Decca, Bosc et al. 2006), entre ellos CRT, el cual se demostró *in vivo* que es un sustrato de Ate1 en el citoplasma celular (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). CRT de rata y ratón exponen en la proteína madura dentro del RE un residuo Asp luego del clivaje del péptido señal del extremo NH<sub>2</sub> terminal, mientras que CRT humana expone un residuo Glu, siendo ambos residuos blancos de arginilación. Una vez que CRT retrotransloca desde el RE al citosol, se arginila por la enzima Ate1 (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Células ATE1<sup>-/-</sup>, no presentan CRT arginilada (R-CRT), demostrando que la arginilación de CRT se lleva a cabo con la intervención de la enzima Ate1 en células en cultivo. En concordancia con estos resultados, se ha

postulado que la arginilación postraducción de CRT dentro del RE no es posible debido a la localización citoplasmática y nuclear de la enzima Ate1 (Kwon, Kashina et al. 1999). Además, el alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE impediría la arginilación, ya que se demostró que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la misma se encuentra inhibida (Decca, Carpio et al. 2007). Estas evidencias indican que la arginilación debe ocurrir en el citoplasma donde reside la maquinaria enzimática que lleva a cabo esta modificación.

Los cambios en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden establecer un estrés celular y estimular la retrotranslocación de CRT (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Del mismo modo, condiciones de estrés oxidativo, "shock" térmico y estrés de RE generan una alteración en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010) y como consecuencia se induce la formación de GSs (Anderson and Kedersha 2008). Se determinó que en estas condiciones R-CRT se asocia a los GSs (Decca, Carpio et al. 2007), mientras que cuando no se genera una alteración en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos, como ocurre en el estrés inducido por radiación UV, R-CRT permanece con una distribución homogénea similar a lo observado en situación control, indicando que no hay asociación a los GSs por más que haya formación de los mismos (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Por lo tanto, la arginilación de CRT es esencial para su asociación a los GSs.

Se ha demostrado que la arginilación de CRT provoca un cambio conformacional o al menos un re-arreglo local en la proteína, que se potencia cuando CRT se encuentra en un entorno de baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (similar a la del citoplasma celular), induciendo un incremento en la dimerización y oligomerización de R-CRT (Carpio, Decca et al. 2013). Además, se determinó que la dimerización de R-CRT es fundamental para el andamiaje de los GSs en condiciones de estrés térmico, quizás reclutando proteínas que participan en la integridad de los GSs (Carpio, Decca et al. 2013).

Por último, se ha demostrado que R-CRT se une a la membrana plasmática donde cumpliría un rol preapoptótico, ya que el agregado exógeno de R-CRT aumenta el número de células apoptóticas tanto en células ATE1<sup>+/+</sup> como en células ATE1<sup>-/-</sup> (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). Además, se determinó que en condiciones de estrés oxidativo las células ATE1<sup>-/-</sup> son menos susceptibles a apoptosis que las células ATE1<sup>+/+</sup> (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). La localización subcelular de R-CRT varía según la duración del estrés oxidativo: a tiempos cortos R-CRT se localiza mayoritariamente en los GSs, mientras que a tiempos más prolongados, cuando se ven signos de apoptosis, R-CRT incrementa en la membrana plasmática (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). Por lo tanto, la arginilación de CRT podría estar involucrada en la regulación de su localización subcelular y de varias funciones celulares, entre ellas la sobrevivencia. Estos hallazgos se encuentran resumidos en siguiente esquema:



**Esquema 6. Tráfico de CRT desde el RE a los GSs y la membrana plasmática.**

CRT se sintetiza en el RE. La depleción de  $Ca^{2+}$ , como consecuencia del estrés, induce la retrotranslocación de CRT. CRT citosólica se arginila por acción de Ate1. Una vez que CRT se encuentra arginilada, adquiere la capacidad de asociarse con los GSs en su forma dimérica y monomérica. R-CRT participa en el andamiaje de los GSs de gran tamaño durante el ensamblado. Si el estrés persiste, los GSs se desensamblan, R-CRT se libera de estos agregados y se dirige a la membrana plasmática (MP) desde donde, actúa como una señal de apoptosis temprana.

# OBJETIVOS

# OBJETIVOS

## ***Objetivos generales***

La degradación intracelular de las proteínas es fundamental para la regulación de una variedad de procesos celulares, tales como el ciclo y la división celular, la regulación de factores de transcripción y garantizar el control de calidad de las proteínas. Considerando el rol de la arginilación postraduccion en la degradación de proteínas, este trabajo de tesis tiene como objetivo general determinar y ampliar las implicancias funcionales de R-CRT a fin de poder dilucidar el rol fisiológico de esta modificación en relación a la proteólisis de CRT.

## ***Objetivos específicos***

Nuestros objetivos están orientados a determinar la relevancia que tendría la arginilación postraduccion sobre el recambio proteico de CRT a nivel citoplasmático. Estos estudios están dirigidos a:

1. Establecer si el sistema proteosomal y/o autofágico-lisosomal están implicados en la regulación proteolítica R-CRT intracelular.
2. Estudiar el rol de la arginilación postraduccion sobre su participación en la degradación proteosomal de CRT.
3. Evaluar la ubiquitinación de R-CRT y establecer si la arginilación de CRT es necesaria para su ubiquitinación.
4. Establecer si la arginilación de CRT que facilita la formación de dímeros influye sobre el recambio de esta proteína a nivel citoplasmático.
5. Determinar si la inhibición proteosomal afecta la distribución citoplasmática de R-CRT en la membrana plasmática.

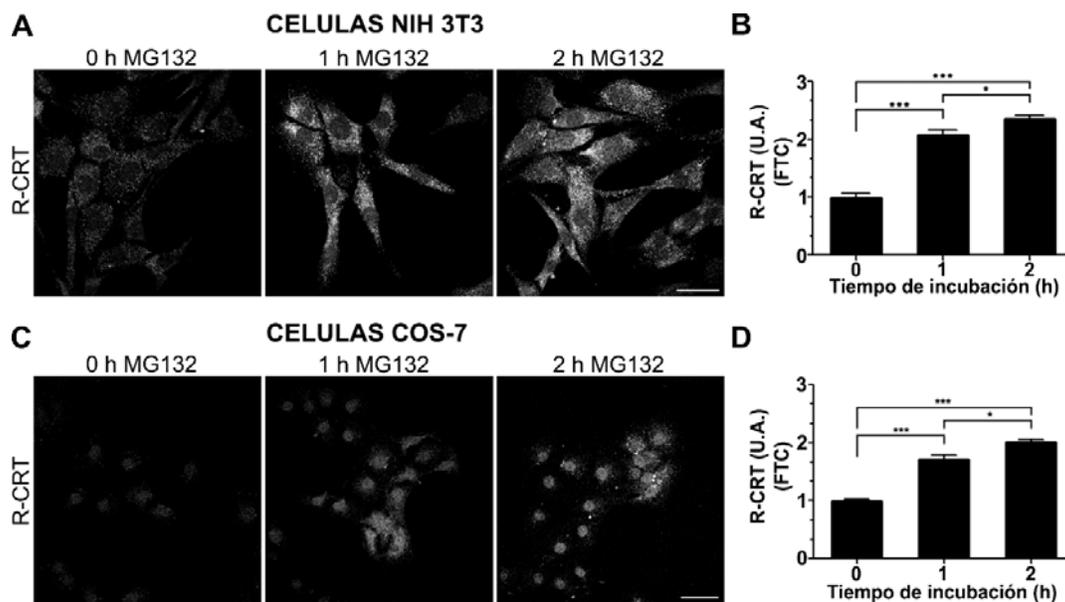
# RESULTADOS

# RESULTADOS

## Capítulo 1: Degradación de R-CRT endógena

### Efecto del inhibidor proteosomal en los niveles intracelulares de R-CRT

El estudio de la función de la arginilación de CRT en su regulación proteolítica, surge de considerar el residuo NH<sub>2</sub> terminal Arg como un desestabilizante primario de acuerdo a lo postulado en la regla de la N (Bachmair, Finley et al. 1986), por lo que evaluamos los niveles citoplasmáticos de R-CRT en células tratadas con un inhibidor proteosomal. Las células NIH 3T3 se trataron con el inhibidor reversible MG132 y se examinó mediante inmunofluorescencia el contenido celular de R-CRT endógena empleando un anticuerpo contra R-CRT (**Figura 1A**). Por análisis de microscopía confocal, se observa que las células NIH 3T3 tratadas durante 1 h con MG132 presentan un incremento de dos veces en los niveles de R-CRT relativos a los de las células control (no tratadas) ( $p < 0,001$ ) (**Figura 1B**). Después de 2 h de tratamiento con MG132, el contenido celular de R-CRT aumenta ligeramente respecto a los de 1 h de tratamiento ( $p < 0,05$ ) (**Figura 1B**).



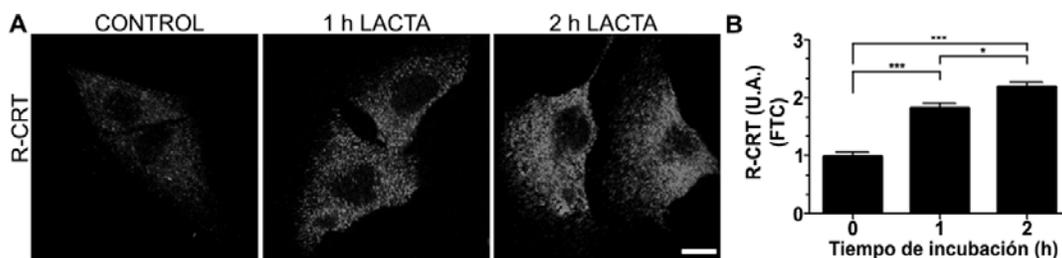
**Figura 1. La inhibición proteosomal en células NIH 3T3 y COS-7 induce acumulación de R-CRT.**

(A) Las células NIH 3T3 o (C) COS-7 se incubaron en presencia de MG132 (10  $\mu$ M) durante 1 y 2 h (control: 0 h MG132). El análisis se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT y microscopía confocal. Barra de escala, 40  $\mu$ m. (B, D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en

los datos mostrados en A y C. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitrarias (U.A.) relativas al control (0 h). Se cuantificaron 200 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  para las comparaciones respecto al control.

Teniendo en cuenta que la retrotranslocación de CRT fue descrita inicialmente en la línea celular COS-7, también fue de interés determinar en esta línea celular el contenido citoplasmático de R-CRT en presencia del inhibidor MG132 (**Figura 1C,D**). En este caso, se observaron resultados similares a los obtenidos en las células NIH 3T3 (**Figura 1A,B**).

Se ha descrito que el MG132 también podría inhibir a las cisteín-proteasas (Bogyo and Wang 2002), caracterizadas por presentar un residuo de Cys que media la ruptura de otras proteínas, por lo que realizamos un estudio similar empleando un inhibidor específico para el proteosoma, lactacistina (LACTA), que no afecta las cisteín-proteasas y se une de manera irreversible al proteosoma (Bush, Goldberg et al. 1997; Goll, Thompson et al. 2003). Se obtuvieron resultados similares (**Figura 2A, B**) a los obtenidos mediante inhibición proteosomal con MG132 (**Figura 1**), indicando que esta acumulación se debe a la inhibición proteosomal y no a la inhibición de las cisteín-proteasas.



**Figura 2. Lactacistina también induce acumulación de R-CRT.**

(A) Las células NIH 3T3 se incubaron en presencia de lactacistina (LACTA [10  $\mu$ M]) durante 1 y 2 h (control: 0 h lactacistina). El análisis se llevó a cabo de igual forma que en la figura 1. Barra de escala, 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en los datos mostrados en (A). La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitraria (U.A.) relativas al control (0 h). Se cuantificaron 200 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  para las comparaciones respecto al control.

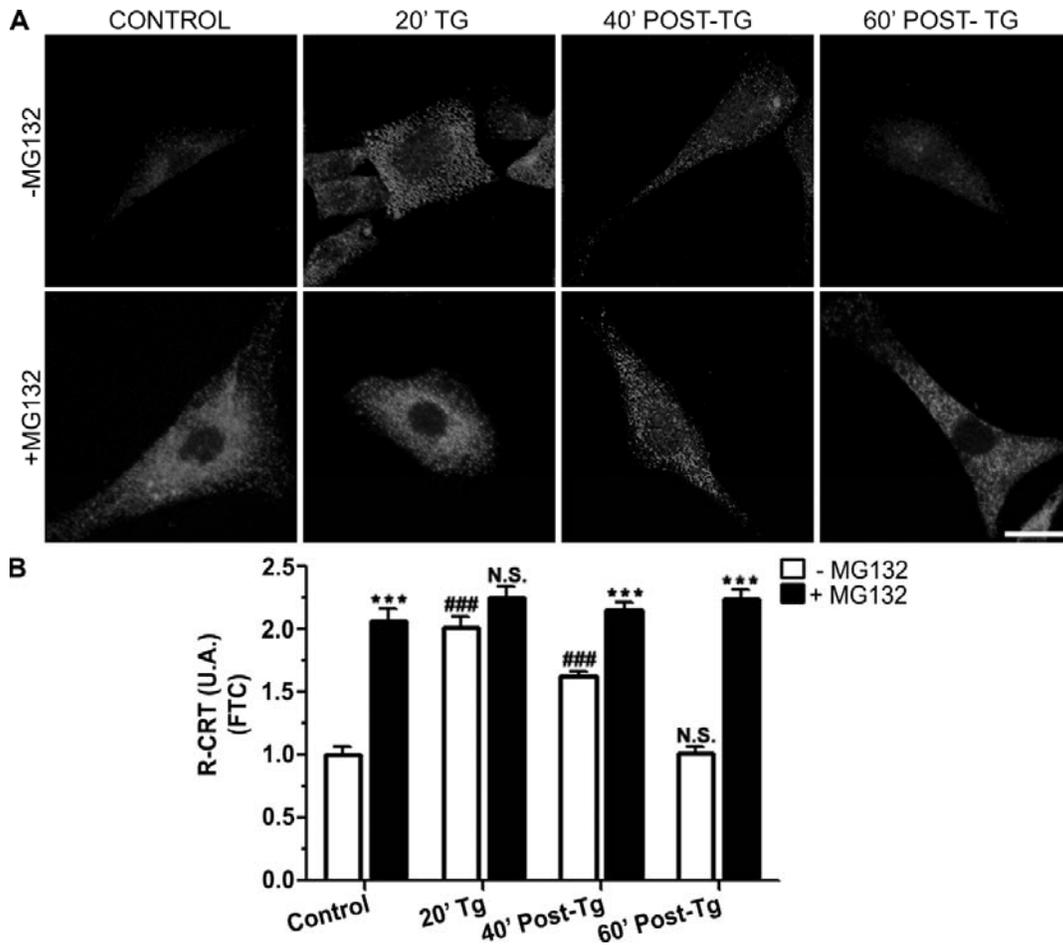
Adicionalmente, se ha descrito que la inhibición proteosomal gatilla la respuesta a estrés térmico, produciendo un incremento en la síntesis de proteínas de ER, entre ellas CRT (Bush, Goldberg et al. 1997). Por otra parte, no se conocen los efectos del MG132 en la retrotranslocación de proteínas desde el RE hacia el citoplasma, si bien Afshar y colaboradores exponen que el MG132 no produciría un aumento en la

retrotranslocación de CRT (Afshar, Black et al. 2005). Por consiguiente, el incremento del contenido celular de R-CRT observado luego de la inhibición del proteosoma podría deberse a un aumento de la síntesis y la retrotranslocación de CRT. En base a ello, realizamos experimentos con diferentes enfoques a fin de distinguir entre estas posibilidades: (i) acumulación de R-CRT por inhibición de su degradación proteosomal, y (ii) aumento del contenido de R-CRT por aumento de la síntesis y retrotranslocación de CRT.

### ***R-CRT endógena es sustrato del sistema proteolítico proteosomal***

El proceso por el cual una proteína sale del RE hacia el citoplasma se conoce como retrotranslocación o dislocación (Hampton and Sommer 2012). Aun no se ha dilucidado el mecanismo de retrotranslocación, por lo que existe escasa información acerca de su regulación. Se ha demostrado previamente que la droga tapsigargina ([Tg]; inhibidor de la bomba SERCA del RE), normalmente empleado como estresor del RE, induce la retrotranslocación de CRT y produce un aumento del contenido de R-CRT (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Con el fin de determinar si este incremento de R-CRT se ve afectado por la inhibición proteosomal, evaluamos el contenido celular de R-CRT en células NIH 3T3 tratadas con Tg en presencia y ausencia de MG132.

Para ello utilizamos una metodología similar al caso anterior, realizando experimentos de inmunocitoquímica empleando el anticuerpo anti-R-CRT. El contenido de R-CRT en las células tratadas con Tg aumentó en similar grado, independientemente de la presencia o ausencia de MG132 (**Figura 3A, B**). Sin embargo, cuando se removió el Tg después de 20 min de tratamiento, el incremento de R-CRT se mantuvo durante 40 y 60 min sólo en las células tratadas con MG132 (**Figura 3A, B**). El contenido de R-CRT en células tratadas solamente con Tg no aumenta mediante el agregado de MG132 (**Figura 3B**, 20' Tg, barra blanca vs barra negra), indicando que MG132 no activa la retrotranslocación de CRT. Por lo tanto, los niveles de R-CRT incrementados por el tratamiento con Tg y mantenidos por la presencia de MG132 luego de la remoción del Tg del medio de cultivo, se debió al bloqueo de la degradación proteosomal. Como la presencia de CRT en el citoplasma es producto de la retrotranslocación de un "pool" de CRT almacenada en el ER, no es posible evaluar la degradación de CRT utilizando sólo inhibidores de síntesis. Además de inhibir la síntesis de proteínas, se debería inhibir la retrotranslocación de CRT, pero no se conocen hasta el momento inhibidores de este proceso. Teniendo en cuenta los resultados expuestos, inferimos que CRT se arginila luego de su paso por el RE y se degrada por el sistema de degradación proteosomal.



**Figura 3. La inhibición proteosomal previene la remoción de R-CRT luego de estrés del RE.**

(A) Las células NIH 3T3 incubadas en presencia o ausencia de MG132 (10  $\mu$ M) y tratadas con Tg (2  $\mu$ M) durante 20 min (20' TG) se analizaron 40 y 60 min después de haber removido el Tg (40' POST-TG y 60' POST-TG). El análisis se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT y microscopía confocal. Barra de escala, 20  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitrarias (U.A.) relativas al control en ausencia de MG132. Se cuantificaron 200 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones intragrupo (columna negra vs columna blanca dentro de cada uno de los cuatro grupos experimentales); ###,  $P < 0,001$  para las comparaciones intergrupo respecto al grupo Control (columnas blancas o negras correspondientes a los grupos 20' TG, 40' POST-TG, o 60' POST-TG vs. la correspondiente columna del grupo Control).

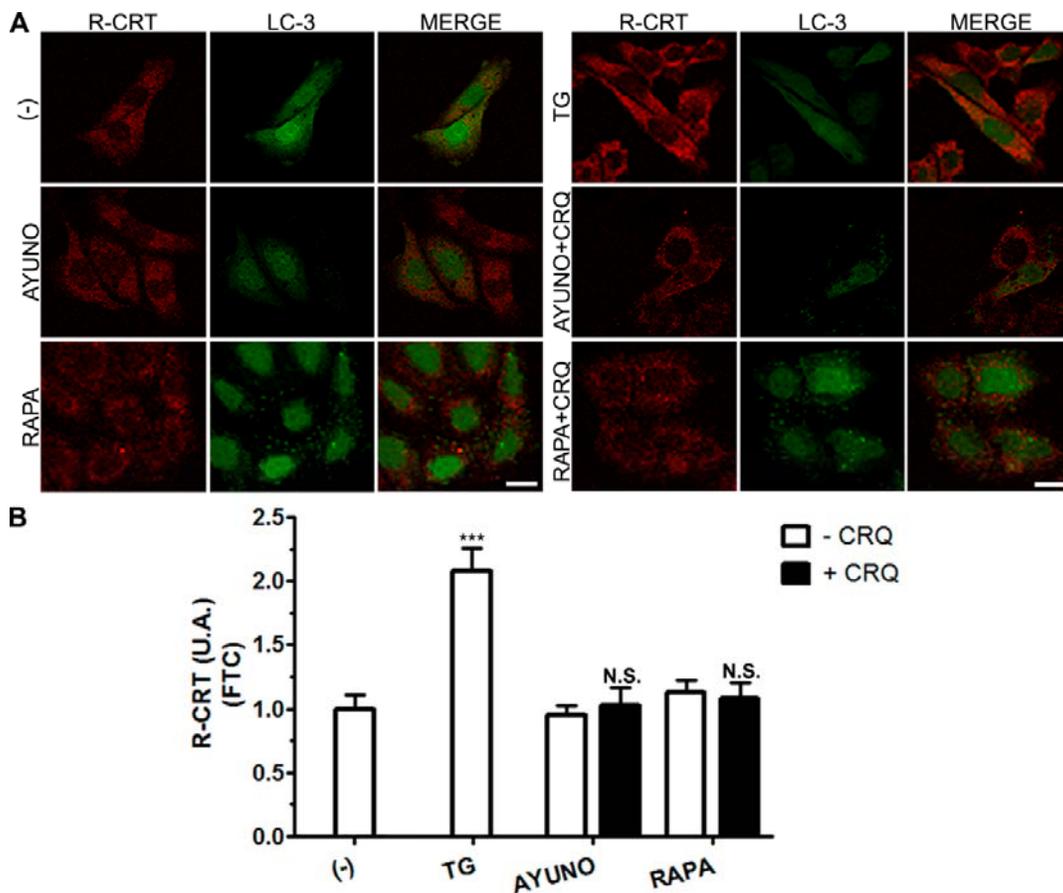
### **La degradación de R-CRT es independiente de la vía autofágica**

Otra vía de degradación posible para R-CRT es la autofágica-lisosomal (Ding and Yin 2008; Vicencio, Lavandero et al. 2010; Wang and Mandelkow 2012), inclusive Petris y colaboradores habían sugerido que CRT podría seguir esa ruta de degradación luego

de su retrotranslocación (Petris, Vecchi et al. 2011). Durante la autofagia, los autofagosomas engullen componentes citoplasmáticos, incluyendo desde proteínas citoplasmáticas hasta organelas enteras. Los autofagosomas se fusionan luego con los lisosomas y forman los autofagolisosomas, donde el contenido de los autofagosomas es degradado por hidrolasas lisosomales (Tanida 2011).

Con el fin de averiguar si R-CRT es degradada por la vía autofágica se realizaron experimentos de inmunocitoquímica empleando el anticuerpo anti-R-CRT en una línea celular estable CHO que expresa GFP-LC-3. LC-3 es una proteína que se presenta en dos formas diferentes, una con distribución citosólica y nuclear (LC-3 I) y otra que se forma por clivaje proteolítico de la primera y se conjuga con fosfatidiletanolamina (LC-3 II), la cual es reclutada a la membrana de los autofagosomas (Kabeya, Mizushima et al. 2000). De esta manera, LC-3 constituye un marcador de autofagosomas (Kabeya, Mizushima et al. 2000). Si bien la actividad autofágica en las células es usualmente baja en condiciones fisiológicas normales (autofagia constitutiva), se conoce que puede ser inducida por privación de nutrientes e inhibidores de mTOR entre otros inductores (Sarkar, Ravikumar et al. 2009). Por lo tanto, se incubaron las células que expresan GFP-LC3 en medio sin nutrientes (ayuno) o en presencia de rapamicina (inhibidor de mTOR [RAPA]) para inducir la vía autofágica, y a su vez se emplearon estos tratamientos en presencia de cloroquina (inhibidor lisosomal [CRQ]), el cual bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. En todos los casos examinamos por inmunofluorescencia el contenido de R-CRT y su colocalización con GFP-LC-3. Por análisis de microscopía confocal se observa la inducción de autofagia mediante el cambio de distribución de LC-3, de homogénea y citosólica en células control a punteada en células tratadas (**Figura 4A**, AYUNO y RAPA). Si R-CRT fuera degradada por la vía autofágica se esperaría una disminución de sus niveles al inducir autofagia en ausencia de CRQ, y colocalización con LC-3 en presencia de CRQ con o sin aumento del contenido de R-CRT en comparación a células sin tratamiento. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de R-CRT cuando se indujo autofagia en comparación a células control (**Figura 4B**), como así tampoco colocalización entre la marca de R-CRT y LC-3, ni aun en células tratadas con CRQ (**Figura 4A**, AYUNO+CRQ y RAPA+CRQ). Por otro lado, se evaluó la inducción de autofagia en las mismas células tratadas con Tg durante 20 min, el cual genera un estrés del RE que induce mayor retrotranslocación de CRT y por lo tanto un aumento del contenido de R-CRT (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). El análisis por inmunofluorescencia de GFP-LC-3 muestra una distribución homogénea, por lo que el estrés generado de ese modo no induce autofagia (**Figura 4A**, TG). En este caso, la colocalización parcial entre R-CRT y LC-3 (**Figura 4A**, TG [MERGE]) se debe a la

localización citoplasmática de ambas proteínas. Estos hallazgos indican que la vía autofágica-lisosomal no está involucrada en la degradación de R-CRT citoplasmática.



**Figura 4. La inducción de la vía autofágica no altera el contenido celular de R-CRT.**

(A) Las células CHO estables que expresan LC-3 se incubaron durante 2 h en medio sin nutrientes (ayuno), o en presencia de rapamicina (RAPA [50  $\mu$ g/mL]), y en presencia o ausencia de cloroquina (CRQ [50  $\mu$ M]). El análisis se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT y microscopía confocal. Barra de escala, 20  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitrarias (U.A.) relativas al control sin tratamiento. Se cuantificaron 150 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones respecto a células no tratadas; N.S., no significativo.

## **Capítulo 2: Expresión citoplasmática de CRT, R-CRT y CRT no arginilable fusionadas a EGFP y degradación proteosomal**

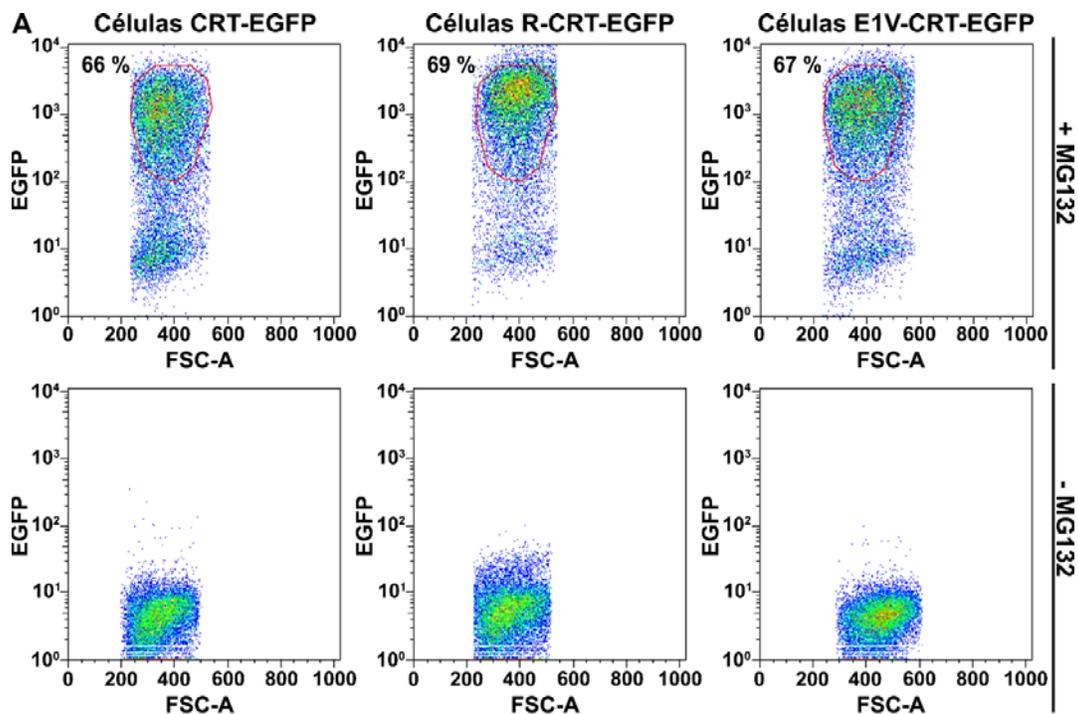
Numerosos estudios proporcionan evidencias de que la arginilación funciona como un señalizador para la degradación proteosomal de proteínas (Bachmair, Finley et al. 1986; Levy, Johnsson et al. 1996). Sin embargo, múltiples evidencias utilizando ensayos bioquímicos, proteómicos y funcionales indican que la arginilación tendría otras funciones además de señalar a proteínas para su degradación (Wong, Xu et al. 2007). Por ejemplo, la arginilación de la proteína  $\beta$ -amiloidea facilita su conformación de alfa hélice previniendo su mal plegamiento y acumulación patológica (Bongiovanni, Fidelio et al. 1995). La arginilación de un fragmento proteolítico de talina es importante en la adhesión célula-célula (Zhang, Saha et al. 2012). En plaquetas, la arginilación de miosina afecta su regulación por fosforilación y la contractilidad normal (Lian, Suzuki et al. 2013). La arginilación de  $\beta$ -actina facilita la migración celular y la polimerización de actina (Karakozova, Kozak et al. 2006; Saha, Mundia et al. 2010). Sin embargo, en este caso se describió que la arginilación de su homólogo cercano  $\gamma$ -actina es responsable de su degradación proteosomal a través de un mecanismo no convencional que relaciona la secuencia de ARNm con la velocidad de traducción y la estabilidad de la proteína (Zhang, Saha et al. 2010). Por lo tanto, se postula que habría un pool de proteínas sustratos cuya arginilación serviría como señalización para la degradación, mientras que en otro grupo de sustratos la arginilación tendría funciones no relacionadas a la degradación. En el caso de CRT, se demostró que su arginilación es necesaria en condiciones de estrés para su unión a los GSs y en el capítulo 1 demostramos que R-CRT es sustrato del proteosoma. Para determinar si la arginilación de CRT tiene alguna influencia en la degradación proteosomal de R-CRT se comparó su susceptibilidad a la degradación con la de CRT sin arginilar. Con el fin de llevar a cabo esta comparación entre las isoformas de CRT respecto a la degradación proteosomal, generamos líneas estables CHO que expresan CRT, o R-CRT o una mutante no arginilable en la cual se sustituyó el aminoácido Glu por Val (E1V-CRT), todas ellas fusionadas a EGFP. Alternativamente, CRT-EGFP o R-CRT-EGFP se expresaron en el citoplasma de células ATE1<sup>-/-</sup>.

### **Obtención de líneas celulares estables**

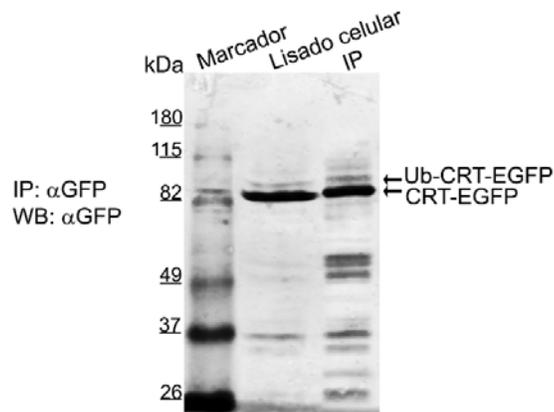
La obtención de líneas estables que expresan constitutivamente en el citoplasma CRT, R-CRT o E1V-CRT fusionadas a EGFP permite comparar la degradación

proteosomal *in vivo* de las isoformas de CRT y constituye una herramienta útil para el estudio de las funciones de CRT y R-CRT a nivel citoplasmático. Además, al evitarse de este modo el tránsito de CRT por el RE, el estudio se enfoca exclusivamente en el destino metabólico que tienen las variantes de CRT en el citoplasma sin que el fenómeno de retrotranslocación interfiera en los resultados. En las líneas estables los niveles de expresión de las variantes de CRT se mantienen por debajo de aquellos alcanzados mediante transfección transiente, pero por encima de los niveles de CRT endógena que se genera en el citoplasma por retrotranslocación de CRT del RE. Esto último permite medir los niveles de esta proteína en el citoplasma mediante “Western Blot” (WB) además de con microscopía confocal. Otra ventaja de la expresión citoplasmática de CRT, es que se evita emplear métodos de semipermeabilización con detergentes para separar CRT del RE de la citoplasmática que fácilmente conllevan a artefactos técnicos.

Las líneas estables se prepararon a partir de células CHO, las cuales se eligieron por que presentan una eficiencia de transfección elevada en comparación a otras líneas celulares. Estas células se transfectaron con los constructos que codifican para la expresión de las proteínas de fusión Ub-CRT-EGFP, Ub-R-CRT-EGFP o Ub-E1V-CRT-EGFP. El motivo de Ub dirige la síntesis de la proteína de interés en el citoplasma y enzimas C-terminal hidrolasas presentes allí se encargan de remover a Ub de la proteína de estudio que contiene el aminoácido de elección en la posición NH<sub>2</sub> terminal (Dantuma, Lindsten et al. 2000). Las células estables se seleccionaron mediante la resistencia a geneticina (G418) seguido de “cell sorting” detectando la fluorescencia de EGFP. Sin embargo, a menos que las células fueran tratadas previamente con MG132, no se observó fluorescencia en las células (**Figura 5A**). Este hecho sugiere que las tres variantes de CRT son sustratos del proteosoma. Las células estables que presentaron fluorescencia en presencia del inhibidor reversible MG132 fueron aisladas por cell sorting y recuperadas en medio libre de MG132 para los estudios posteriores. El clivaje del motivo de Ub se confirmó por inmunoprecipitación de CRT-EGFP con un anticuerpo anti-GFP y posterior WB empleando el mismo anticuerpo. La mayor parte de la proteína de fusión se encuentra como CRT-EGFP mientras que el precursor Ub-CRT-EGFP solo se puede observar en “blots” revelados por exposición prolongada (**Figura 5B**). A continuación se emplearon estas células para estudiar el comportamiento de las diferentes variantes de CRT en presencia de inhibidor proteosomal.



**B**



**Figura 5. Células estables que expresan CRT-EGFP, R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP en el citoplasma.** (A) Las células CHO transfectadas de manera estable con Ub-CRT-EGFP, Ub-R-CRT-EGFP o Ub-E1V-CRT-EGFP, se seleccionaron en presencia de G418 (500  $\mu$ g/mL) durante 15 días, y se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) durante toda la noche. El análisis se llevó a cabo mediante "cell sorting" detectando la emisión de fluorescencia de EGFP. Las células con similar niveles de EGFP en todos los casos se aislaron por "cell sorting" y se recuperaron en medio libre de MG132. Este procedimiento se repitió dos veces para aumentar el enriquecimiento de células estables. (B) Células CHO estables que expresan CRT-EGFP se incubaron en presencia de MG132 (10  $\mu$ M) durante toda la noche. A partir de lisados de estas células, se inmunoprecipitó CRT-EGFP empleando el anticuerpo anti-GFP y se analizaron las proteínas mediante WB usando el mismo anticuerpo y alta exposición de la membrana en el revelado. Se indican los tamaños correspondientes a la proteína procesada (CRT-EGFP) y a la proteína precursora (Ub-CRT-EGFP).

### ***La degradación de CRT en el citoplasma es independiente de la arginilación***

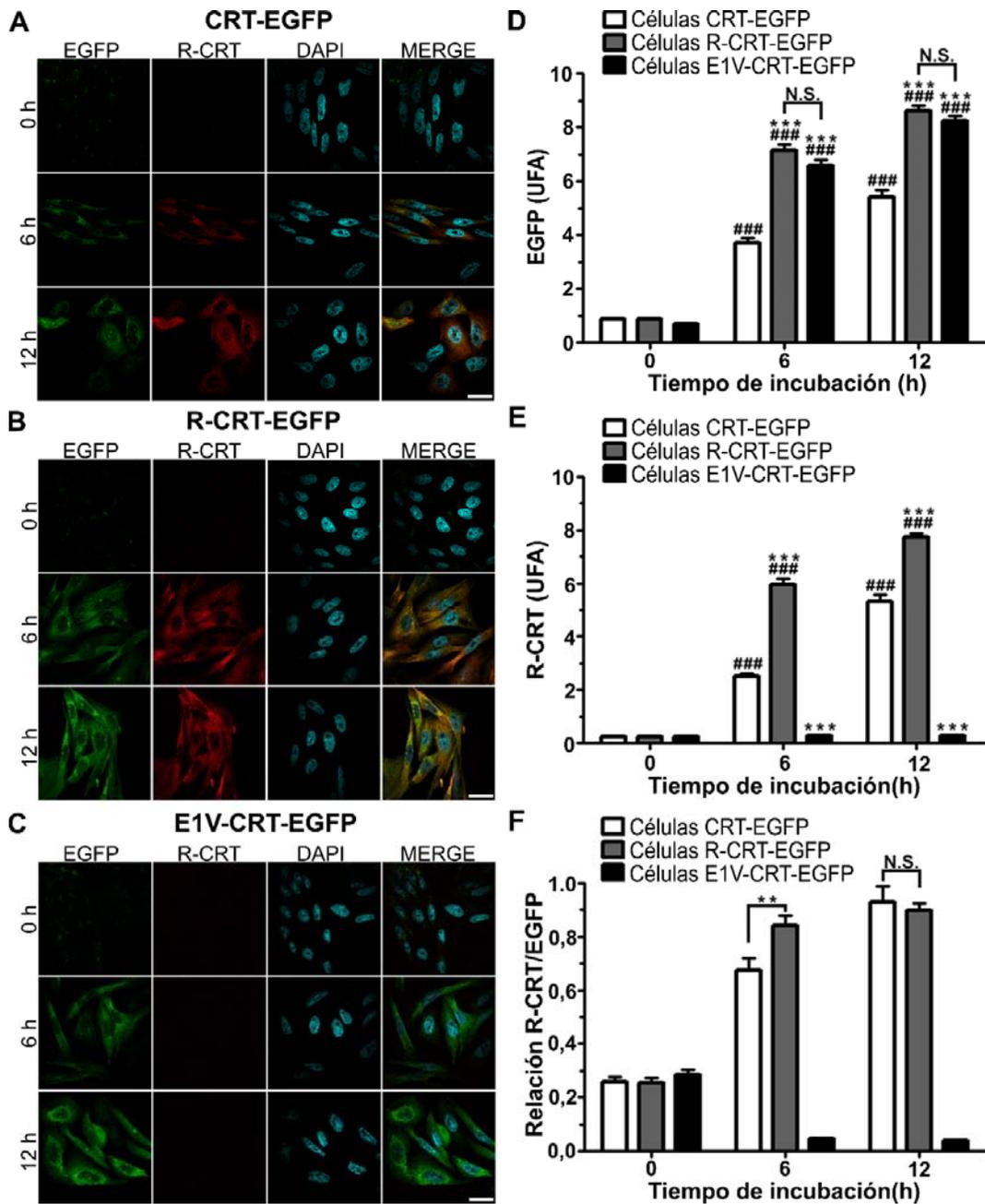
Con el fin de determinar si la arginilación de CRT es requerida para su degradación proteosomal, evaluamos la degradación de CRT en condiciones que impiden la arginilación postraduccion del aminoácido NH<sub>2</sub> terminal. Para ello, analizamos la degradación proteosomal de CRT, R-CRT y CRT no arginilable (E1V-CRT) expresadas directamente en el citoplasma.

Se emplearon las líneas estables expresando CRT-EGFP, R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP obtenidas anteriormente (**Figura 5**) y se analizó la fluorescencia de EGFP por microscopía confocal. Las tres líneas estables mostraron ausencia de EGFP, probablemente debido a la rápida degradación de las tres isoformas de CRT (**Figura 6A-C**). En las células tratadas con MG132, el contenido celular de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP incrementó de manera dependiente con el tiempo del tratamiento (**Figura 6D**). El análisis mediante inmunocitoquímica de las células que expresan CRT-EGFP y R-CRT-EGFP empleando el anticuerpo anti-R-CRT, reveló una acumulación similar de R-CRT (**Figura 6E**). En cambio, no se detectó R-CRT en las células que expresan E1V-CRT-EGFP, lo cual está de acuerdo con el supuesto que el residuo Val en la posición NH<sub>2</sub> terminal no incorpora Arg (**Figura 6C,E**). Las células que expresan CRT-EGFP también presentan R-CRT-EGFP, la cual se genera por acción de la enzima endógena Ate1 sobre CRT-EGFP (**Figura 6A,E**). Al analizar en estas células la relación entre R-CRT detectado por el anticuerpo anti-R-CRT y la fluorescencia de EGFP, se encontró que a 6 h de tratamiento con MG132 la mayor parte de CRT-EGFP está arginilada (~80%), llegando a ser ~100% para las 12 h (**Figura 6F**). Para descartar que la acumulación en presencia de MG132 de la variante no arginilada de CRT se deba a la inhibición de otras proteasas, se incubaron células estables que expresan E1V-CRT-EGFP en presencia de LACTA (inhibidor irreversible específico del proteosoma) o de un cóctel de inhibidores de proteasas que incluye a dos inhibidores de las cisteín-proteasas: E-64 y leupeptin. Se analizó la presencia de E1V-CRT-EGFP mediante WB usando el anticuerpo anti-GFP y se detectó esta proteína únicamente en presencia de LACTA y no en presencia del cóctel de proteasas, confirmando que es la inhibición del proteosoma la responsable de su acumulación (**Figura 7**).

Aunque las tres variantes de CRT se acumularon en presencia de MG132, el análisis por WB usando el anticuerpo anti-GFP reveló diferencias en su velocidad de acumulación (**Figura 8A-C**). Se observó un incremento de los niveles de R-CRT-EGFP luego de 2 h de tratamiento con MG132, mientras que las células que expresan E1V-CRT-EGFP (no arginilable) o CRT-EGFP (arginilable), requirieron 4 y 6 h de tratamiento con MG132 respectivamente (**Figura 8A-C**, fila EGFP). En las células que

expresan CRT-EGFP tratadas con MG132, su acumulación se detectó con el anticuerpo anti-GFP prácticamente al mismo tiempo en que se observa la aparición de R-CRT con el anticuerpo anti-R-CRT mediante WB (**Figura 8A**). Al igual que en los ensayos de inmunocitoquímica, no se detectó R-CRT en las células que expresan E1V-CRT-EGFP, confirmando que el residuo Val en la posición NH<sub>2</sub> terminal no incorpora Arg (**Figura 8C**). Este resultado podría deberse a una diferencia de estabilidad entre las isoformas arginiladas y no arginiladas, siendo R-CRT más estable, o a diferencias en sus velocidades de síntesis. Teniendo en cuenta los resultados expuestos, los mismos indican que la inhibición proteosomal provoca la acumulación de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP, y sugieren que la arginilación de CRT no es esencial para su degradación.

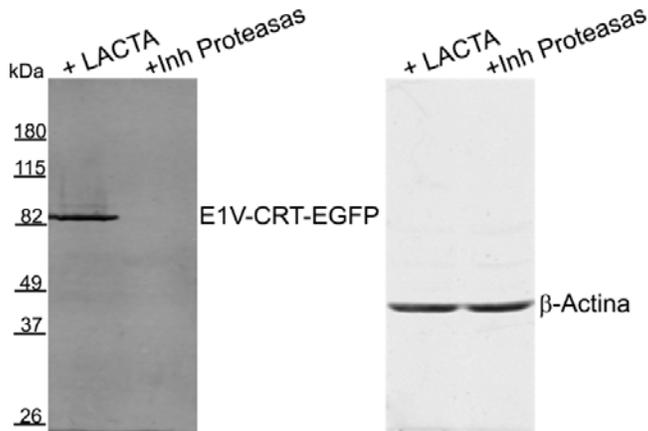
Interesantemente, durante la acumulación de las diferentes variantes de CRT por efecto del MG132, se observan a partir de las 6 h de tratamiento pequeños agregados que se localizan mayoritariamente en la región perinuclear (**Figura 9A-C**, 6 h MG132). A tiempos más prolongados de tratamiento (18 h) con MG132, gran parte de la marca de EGFP de las tres variantes de CRT se concentra en la región perinuclear (**Figura 9A-C**, 18 h MG132). Dada la ausencia de una distribución homogénea y uniforme esperable de una proteína citoplasmática y la presencia de agregados, se llevó a cabo un ensayo de solubilidad en células tratadas con MG132, lisadas en PBS suplementado con Tritón X-100 1% y centrifugadas a 12000 xg durante 10 min. Las fracciones de sobrenadante y precipitado se analizaron por SDS-PAGE y WB utilizando el anticuerpo anti-GFP. Las tres variantes de CRT se distribuyeron en ambas fracciones, Tritón X-100-soluble y Tritón X-100-insoluble, sugiriendo que estas proteínas estarían asociadas a alguna estructura resistente a la solubilización con Tritón X-100. En su conjunto, estos resultados indican que la formación de agregados de cyt-CRT en presencia de MG132 es independiente de su estado de arginilación.



**Figura 6. Cyt-CRT con diferentes NH<sub>2</sub> terminales se degrada rápidamente vía proteosomal.**

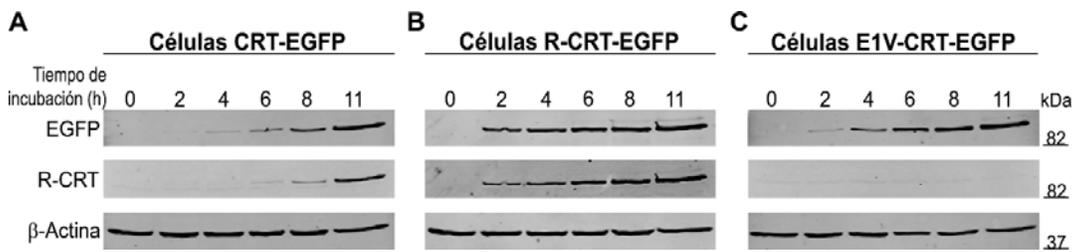
(A) Las células estables que expresan CRT-EGFP, (B) R-CRT-EGFP, o (C) E1V-CRT-EGFP se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) a distintos tiempos. El análisis se llevó a cabo mediante triple inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT, DAPI y detección de la emisión de EGFP. La colocalización entre la marca de EGFP y el anticuerpo anti-R-CRT fue monitoreada por microscopía confocal y está representada en amarillo en las imágenes fusionadas. Barra de escala, 20  $\mu$ m. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del set de datos de (D) EGFP o (E) anti-R-CRT. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades de fluorescencia arbitrarias (U.F.A.). Se cuantificaron 180 células por cada condición. (F) Relación entre la UFA de anti-R-CRT y EGFP. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones intragrupo, es decir, columna gris (o negra) vs columna blanca dentro de cada uno de los

tres grupos experimentales; ###,  $P < 0,001$  para las comparaciones intergrupo respecto al grupo control en ausencia de MG132, es decir, columnas blancas, grises o negras vs la correspondiente columna del grupo Control; N.S., diferencia no significativa.



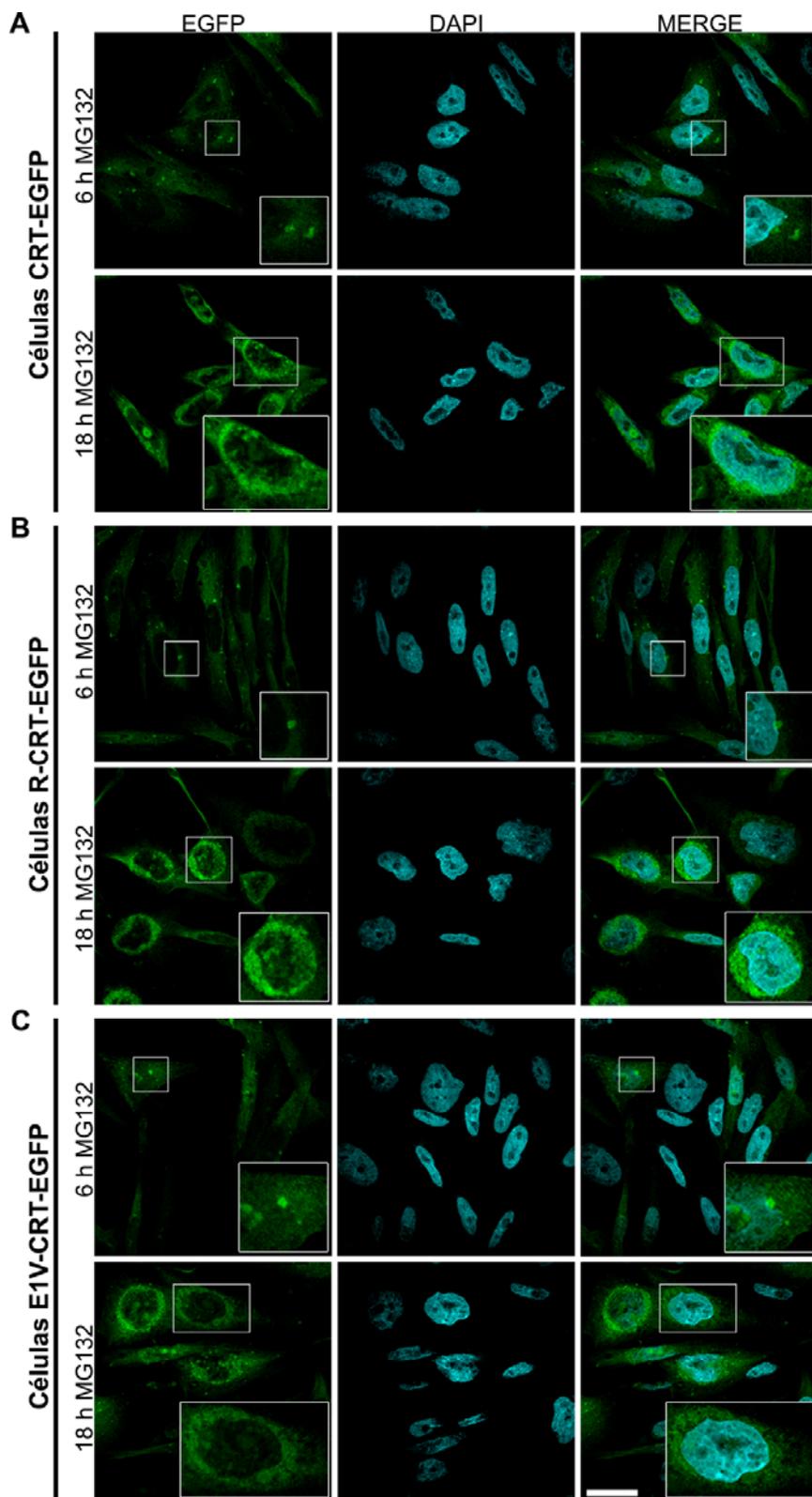
**Figura 7. Inhibidores de proteasas no inducen la acumulación de E1V-CRT-EGFP.**

(A) Las células estables que expresan E1V-CRT-EGFP se trataron con lactacistina (LACTA [ $10 \mu\text{M}$ ]) o un cóctel de inhibidores de proteasas durante 8 h. El análisis se llevó a cabo mediante WB empleando los anticuerpos anti-GFP y anti- $\beta$ -Actina.



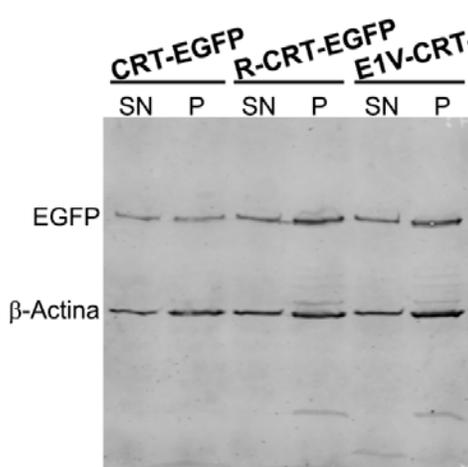
**Figura 8. R-CRT-EGFP se acumula más rápidamente en presencia de MG132.**

(A) Las células estables que expresan CRT-EGFP, (B) R-CRT-EGFP, o (C) E1V-CRT-EGFP se trataron con MG132 ( $10 \mu\text{M}$ ) a distintos tiempos. El análisis se llevó a cabo mediante WB empleando los anticuerpos anti-R-CRT, anti-GFP y anti- $\beta$ -Actina. Resultado representativo de cuatro experimentos independientes.



**Figura 9. Distribución perinuclear y formación de agregados de Cyt-CRT en presencia de MG132.**  
**(A)** Las células estables que expresan CRT-EGFP, **(B)** R-CRT-EGFP, o **(C)** E1V-CRT-EGFP se trataron con MG132 ( $10 \mu\text{M}$ ) durante 6 y 18 h. El análisis se llevó a cabo mediante doble inmunofluorescencia

detectando la emisión de EGFP y tiñendo los núcleos con DAPI. La localización de la marca de EGFP fue monitoreada por microscopía confocal. La distribución perinuclear observada y los agregados se encuentran resaltados en las regiones con zoom de interés (inserciones). Resultados representativos de tres experimentos independientes. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. Una fracción de Cyt-CRT es resistente a la solubilización con Tritón X-100.**

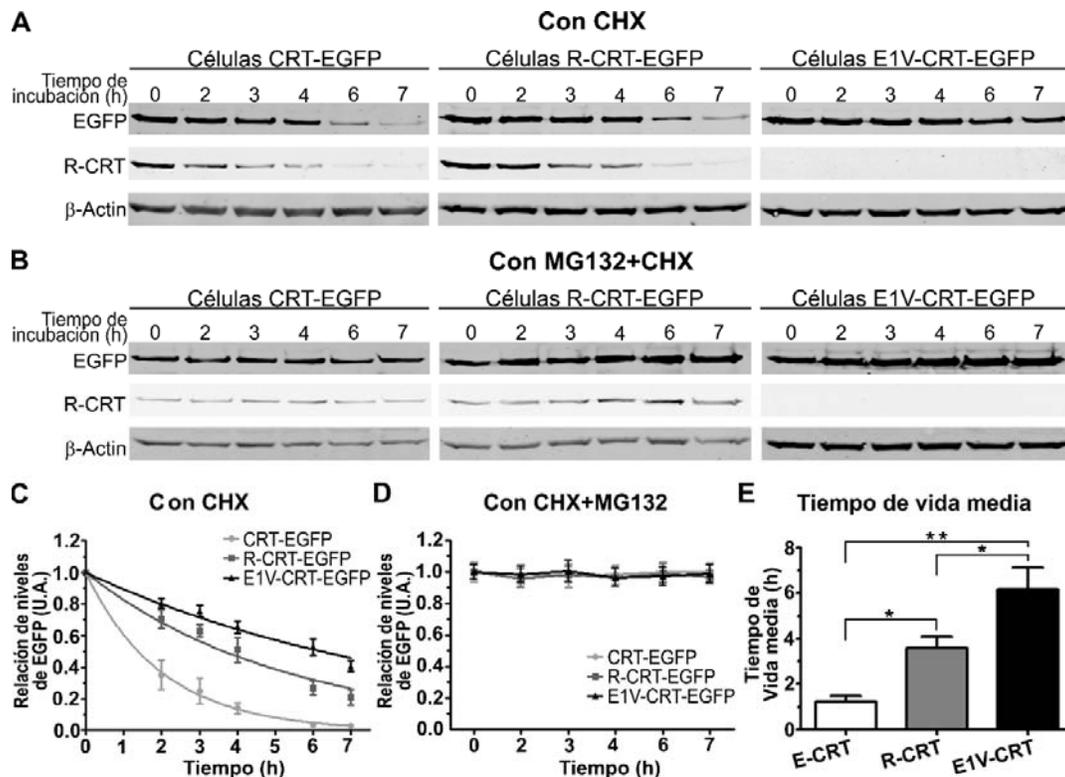
Ensayo de solubilidad en Tritón X-100 de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, o E1V-CRT-EGFP expresadas por líneas estables CHO tratadas con MG132 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 8 h. El análisis se llevó a cabo mediante WB de las fracciones precipitado (P) y sobrenadante (SN) empleando los anticuerpos anti-GFP y anti- $\beta$ -actina (Se usó actina como control de proteína que se distribuye en ambas fracciones).

Si bien la arginilación de CRT no es esencial para su degradación proteosómica, la misma podría alterar el tiempo de vida media de la proteína. Para elucidar esta posibilidad, realizamos determinaciones del tiempo de vida media de las tres variantes de CRT expresadas en el citoplasma de células CHO.

### **Efecto del aminoácido NH<sub>2</sub> terminal en la vida media de CRT**

La acumulación observada de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP observada por efecto del inhibidor de proteosoma MG132 se podría deber a diferencias en sus velocidades de síntesis (Alvarez-Castelao, Martín-Guerrero et al. 2009). Para descartar esta posibilidad y evaluar si el terminal NH<sub>2</sub> altera la tasa de recambio de CRT en el citoplasma, determinamos la vida media de cada una de estas proteínas en presencia del inhibidor de síntesis cicloheximida (CHX). Las líneas estables descritas anteriormente (ver página 41) se incubaron en presencia MG132 para permitir la acumulación de las proteínas correspondientes (CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, E1V-CRT-EGFP), y después se removió este inhibidor del medio de cultivo. Luego, las células se trataron con CHX y se determinaron los niveles de EGFP a distintos tiempos mediante WB empleando el anticuerpo anti-GFP (**Figura 11A**). La degradación fue más pronunciada para CRT-EGFP que para R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP (**Figura 11A,C**). No se observaron cambios en los niveles de las tres variantes cuando las

células fueron tratadas con CHX y MG132 (**Figura 11B,D**), indicando que el proteosoma es el responsable de la degradación de dichas proteínas cuando las células están en presencia de CHX. La vida media en presencia de CHX fue de ~1,2 h para CRT-EGFP, ~3,6 h para R-CRT-EGFP y ~6.1 h para E1V-CRT-EGFP (**Figura 11E**); en otras palabras, la vida media de CRT-EGFP es 60% más corta que la de R-CRT-EGFP y 80% más corta que la de E1V-CRT-EGFP.

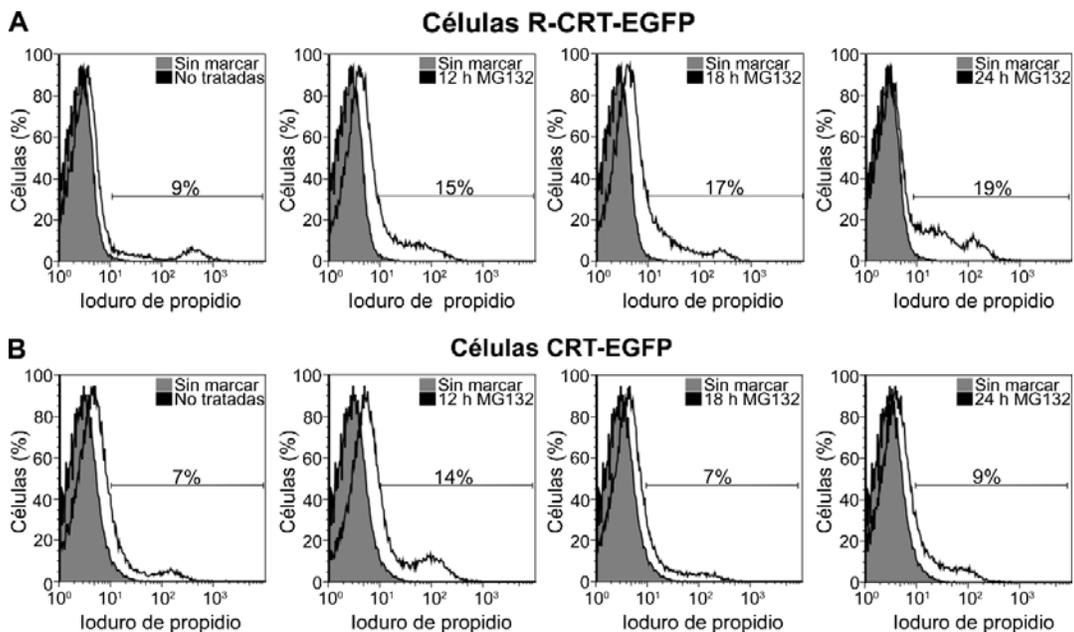


**Figura 11. CRT arginilable tiene una vida media más corta que R-CRT y E1V-CRT.**

Las células estables que expresan CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, o E1V-CRT-EGFP se trataron con MG132 para acumular estas proteínas. Luego de remover el MG132, las células se incubaron en presencia de (A) CHX o (B) CHX+MG132 a distintos tiempos. Para determinar el tiempo de vida media, se analizaron los niveles de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, o E1V-CRT-EGFP mediante WB utilizando los anticuerpos anti-GFP, anti-R-CRT y anti- $\beta$ -actina. (C,D) Se determinaron las intensidades de las bandas correspondientes a la marca de EGFP relativas a las de  $\beta$ -actina, se expresaron en unidades arbitrarias (U.A.) y se representaron como una fracción de la intensidad de la banda a tiempo inicial (0 h). Los datos del gráfico C se ajustaron a una curva de decaimiento exponencial. (E) Los tiempos de vida media estimados de CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, y E1V-CRT-EGFP se extrapolaron de las curvas de decaimiento exponencial del gráfico C por regresión no lineal. Los valores mostrados son representativos de cinco experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ .

Se ha descrito que el MG132 puede inducir apoptosis a tiempos prolongados o dosis elevadas (Guo and Peng 2013), por lo que este inhibidor podría afectar

indirectamente los niveles de CRT por medio de algún mecanismo relacionado a la apoptosis. Para descartar esta posibilidad, se incubaron células CHO expresando CRT-EGFP o R-CRT-EGFP en presencia de MG132 y se analizó la muerte celular por citometría de flujo tiñendo las células con ioduro de propidio. Bajo estas condiciones, no se observó una diferencia significativa en la población de células apoptóticas tratadas con MG132 vs las células control (**Figura 12A,B**). La inducción leve de apoptosis en las células R-CRT-EGFP a 24 h de tratamiento con MG132 puede ser causado por una mayor acumulación de R-CRT en la membrana plasmática (ver Figura 21, capítulo 3), la cual es una señal proapoptótica (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012).



**Figura 12. Los tratamientos ensayados de MG132 no inducen apoptosis.**

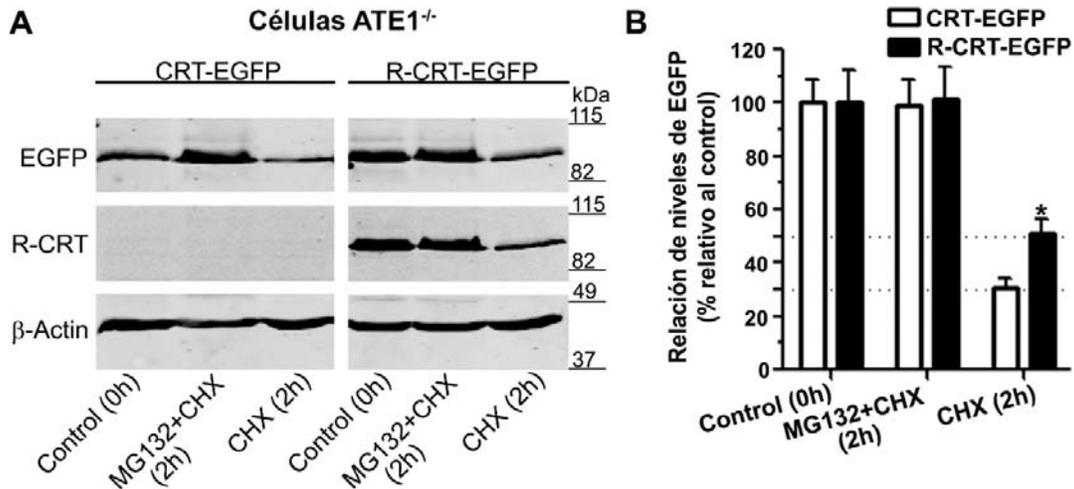
Las células estables que expresan (A) R-CRT-EGFP, o (B) CRT-EGFP se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) a diferentes tiempos (12, 18 y 24 h). Se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo de células marcadas con ioduro de propidio. El porcentaje de células apoptóticas hallado en cada caso se indica en los histogramas correspondientes. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes, el 100% de los valores corresponden a 50.000 células.

En su conjunto, estos hallazgos demuestran fehacientemente que las tres variantes, CRT-EGFP, R-CRT-EGFP, y E1V-CRT-EGFP se degradan por la vía proteosomal. Además, la arginilación de CRT no es esencial para esta proteólisis. Debido a que parte de CRT-EGFP es arginilada por Ate1 endógena, y otra parte podría permanecer sin arginilar, se esperaba que su vida media estuviera comprendida entre la de R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP. Sin embargo, el tiempo de vida media de CRT-EGFP es más corto que el de R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP (**Figura 11E**),

sugiriendo que las variantes arginiladas y no arginiladas de CRT podrían seguir mecanismos de degradación diferentes con poblaciones de proteosomas distintas involucradas en cada caso. De esta manera, en células que expresan CRT-EGFP, donde están presentes ambas isoformas (arginilada y no arginilada), el efecto global sería un tiempo de vida media más corto, ya que ambas proteínas se degradarían independientemente. Otra posibilidad es que la mutación introducida en CRT para la preparación de E1V-CRT podría, además de prevenir su arginilación, afectar la susceptibilidad a la degradación proteosomal ya sea por cambios conformacionales inducidos en la proteína, o por modificación de interacciones con proteínas de reconocimiento de sustratos proteosomales, entre otros mecanismos. A continuación se emplearon células ATE1<sup>-/-</sup> (Kwon, Kashina et al. 2002; Karakozova, Kozak et al. 2006) para estudiar la degradación de CRT no arginilada.

### ***Degradación de CRT-EGFP y R-CRT-EGFP en células ATE1<sup>-/-</sup>***

Con el objetivo de comparar la degradación proteosomal entre R-CRT y CRT no arginilada, decidimos emplear una segunda estrategia, examinando la degradación de CRT-EGFP en células ATE1<sup>-/-</sup>. Estas células fueron transfectadas con Ub-CRT-EGFP o Ub-R-CRT-EGFP y se trataron con MG132 durante 18 h para permitir la acumulación de CRT-EGFP o R-CRT-EGFP en el citoplasma. Luego se removió el inhibidor proteosomal y las células se cultivaron en presencia de CHX por 2 h. Los niveles de CRT-EGFP y R-CRT-EGFP se analizaron mediante WB empleando los anticuerpos anti-GFP y anti-R-CRT. En concordancia con los resultados mostrados en la figura 12, el contenido de CRT-EGFP y R-CRT-EGFP disminuyó cuando se inhibió la síntesis de proteínas usando CHX, y no se modificó en presencia de CHX y MG132 (**Figura 13A,B**). Luego de 2 h en presencia de CHX, los niveles de R-CRT disminuyeron en menor medida que los de CRT, existiendo una diferencia de al menos 40% entre ellos ( $p < 0.05$ ) (**Figura 13B**). La interpretación más simple de estos hallazgos es que la arginilación de CRT altera su degradación y que diferentes vías proteosomales estarían involucradas en la degradación de CRT y R-CRT. En este caso CRT-EGFP no se arginila ya que en estas células la enzima Ate1 no está presente, y aun así CRT-EGFP es más susceptible a la degradación proteosomal que R-CRT-EGFP. En cambio, en las células CHO la variante no arginilable E1V-CRT-EGFP presenta mayor tiempo de vida media que R-CRT-EGFP. Esto indica que la mutación puntual sustituyendo Glu por Val, con el fin de que CRT no incorpore Arg, podría alterar de alguna forma la vida media de la proteína.



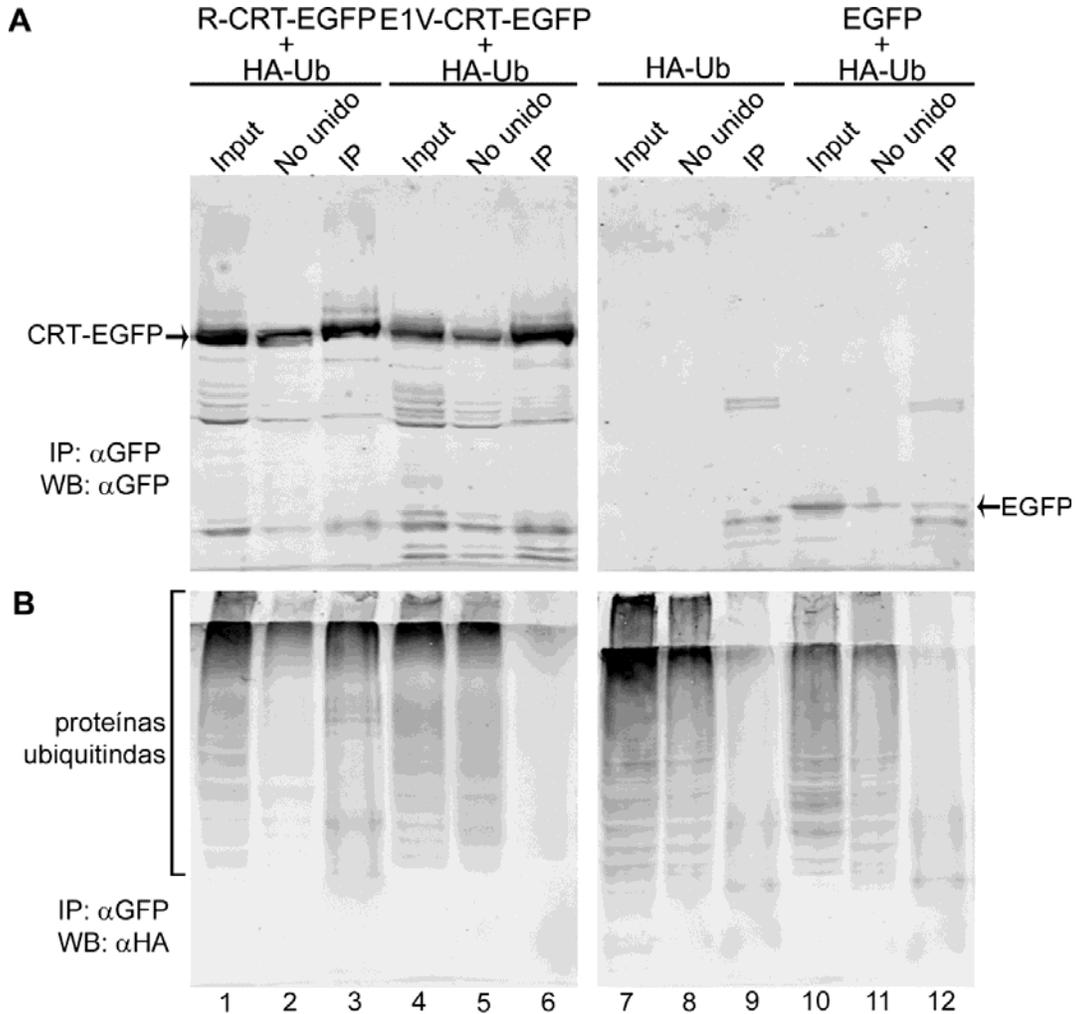
**Figura 13. CRT no arginilada es más susceptible que R-CRT a la degradación proteosomal.**

Células ATE1<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con Ub-CRT-EGFP o Ub-R-CRT-EGFP, y se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) durante 18 h para acumular CRT-EGFP o R-CRT-EGFP. Luego de remover el inhibidor proteosomal, las células se incubaron en ausencia o presencia de cicloheximida (CHX) o CHX+MG132 durante 2 h. (A) WB empleando los anticuerpos anti-GFP, anti-R-CRT y anti- $\beta$ -Actina. (B) Intensidades de las bandas de EGFP representadas como un porcentaje respecto de la intensidad de la banda inicial (control: 0h). Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*,  $P < 0,05$ .

### La arginilación es esencial para la ubiquitinación de R-CRT

El hallazgo de que CRT-EGFP arginilable tiene un tiempo de vida media más corto que el de R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP (Figura 11) indica que estas variantes podrían estar sujetas a diferentes mecanismos de degradación proteosomal. Por lo tanto, se examinó la participación del sistema Ub-proteosoma en el proceso de degradación de R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP. Se llevó a cabo un ensayo de ubiquitinación en células CHO co-transfectadas con HA-Ub y Ub-R-CRT-EGFP o Ub-E1V-CRT-EGFP para aumentar la expresión de Ub y generar las variantes arginilada y no arginilada de CRT en el citoplasma. Seis horas después de la co-transfección, las células se incubaron con MG132 durante 18 h para permitir la acumulación de los conjugados de Ub. Luego, se inmunoprecipitaron R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP de los lisados celulares empleando el anticuerpo anti-GFP (Figura 14A). El estado de ubiquitinación de ambas variantes de CRT se examinó por WB con un anticuerpo anti-HA que reconoce el epítipo de HA fusionado a Ub. Los conjugados con Ub se detectaron solamente para R-CRT (Figura 14B), indicando que la arginilación es necesaria para la ubiquitinación de R-CRT y que una vía proteosomal independiente de Ub es responsable de la degradación de CRT no arginilable. El aspecto “chorreado” de

las bandas conteniendo los conjugados ubiquitinados de R-CRT-EGFP sugiere que se trataría de poliubiquitinación, siendo probable que constituyan intermediarios en el proceso de degradación proteosomal.



**Figura 14. La arginilación es necesaria para la ubiquitinación de CRT.**

Células CHO fueron co-transfectadas con Ub fusionada al epítipo HA y Ub-R-CRT-EGFP o Ub-E1V-CRT-EGFP. Como control, las células fueron transfectadas con Ub-HA o co-transfectadas con Ub-HA y EGFP. Las células transfectadas se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) durante 18 h para acumular los conjugados de Ub, R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP. Los lisados de estas células fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-GFP ( $\alpha$ GFP) y se analizaron por WB empleando los anticuerpos (A) anti-GFP ( $\alpha$ GFP) y (B) anti-HA ( $\alpha$ HA). Los carriles 3, 6, 9 y 12 corresponden a las proteínas inmunoprecipitadas (IP). Los carriles 1, 4, 7 y 10 corresponden al total de los lisados celulares (input). Los carriles 2, 4, 8, y 11 corresponden a la fracción no inmunoprecipitada (no unido). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

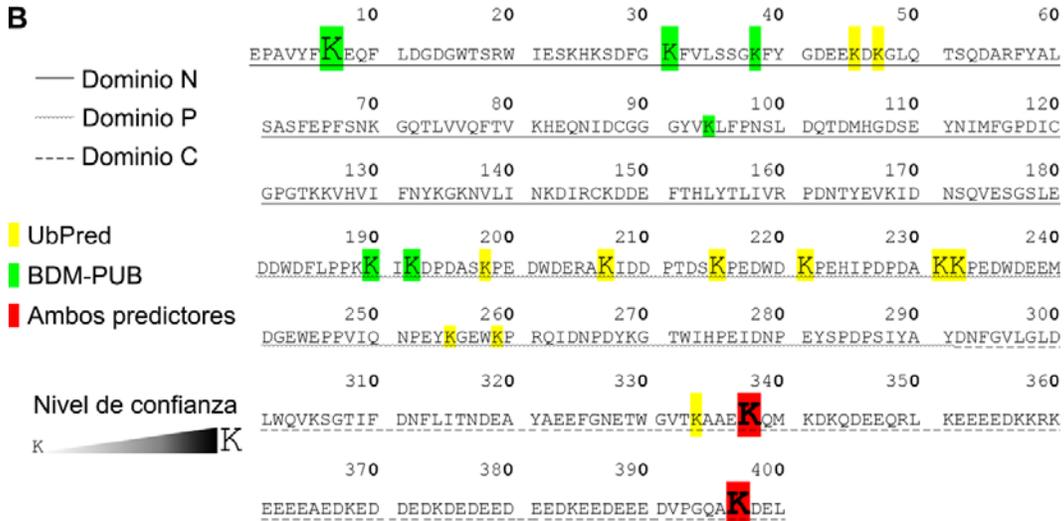
Si bien CRT se caracteriza por ser una proteína con predominio de los aminoácidos ácidos, también posee 57 residuos básicos distribuidos en toda su secuencia, de los cuales 42 corresponden a Lys que es el aminoácido donde se puede unir Ub. Para predecir los sitios de ubiquitinación más probables entre todas las Lys que contiene la secuencia de CRT, se emplearon dos predictores informáticos: UbPred (<http://ubpred.org/>) (Radivojac, Vacic et al. 2010) y BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org>) (publicación en curso). El primero, se basa en la técnica de bosques aleatorios y fue entrenado con un conjunto combinado de 266 sitios de ubiquitinación no redundantes verificados experimentalmente (Hitchcock, Auld et al. 2003; Peng, Schwartz et al. 2003). Este predictor identificó 13 residuos Lys probables de ubiquitinación en la secuencia de CRT, los cuales fueron clasificados en residuos de confianza baja (6) y de confianza media (7), según el umbral establecido (**Figura 15A**). Los residuos identificados mapean en los 3 dominios de CRT, pero los de mayor probabilidad (Lys: 207, 215, 221, 231, 232, 338 y 397) se encuentran en los dominios P y C (**Figura 15B**). El segundo método, se basa en el método de discriminación bayesiano (BDM) y fue entrenado con un conjunto de 260 sitios de ubiquitinación no redundantes que provienen de 154 sustratos (Xue, Li et al. 2006). Este predictor identificó 8 aminoácidos Lys probables de ubiquitinación, de los cuales 3 tuvieron una puntuación alta y 5 una puntuación media (**Figura 15A**). Los residuos identificados se distribuyen en los 3 dominios de CRT, siendo los de mayor probabilidad Lys7, 338 y 397) que se encuentran en los dominios N y C (**Figura 15B**). Ambos predictores coinciden en que los residuos Lys338 y 397 que se encuentran en el dominio C serían sitios de ubiquitinación (**Figura 15A,B**). Los residuos Lys de mayor puntuación predichos por ambos predictores como sitios de ubiquitinación se encuentran conservados en mamíferos (resultado no mostrado).

**A**

**Predicción de sitios de ubiquitinación en la secuencia de CRT humana.**

	Posición	Puntaje	Umbral	Nivel de confianza
<b>UbPred</b>	45	0,66	0,62	Baja
	47	0,68	0,62	Baja
	198	0,62	0,62	Baja
	207	0,76	0,62	Media
	215	0,79	0,62	Media
	221	0,80	0,62	Media
	231	0,73	0,62	Media
	232	0,78	0,62	Media
	255	0,66	0,62	Baja
	259	0,68	0,62	Baja
	334	0,63	0,62	Baja
	338	0,70	0,62	Media
397	0,72	0,62	Media	
<b>BDM-PUB</b>	7	1,89	1,00	Alta
	31	1,33	1,00	Media
	38	1,15	1,00	Baja
	94	1,14	1,00	Baja
	190	1,45	1,00	Media
	192	1,45	1,00	Media
	338	3,40	1,00	Alta
	397	2,39	1,00	Alta

**B**



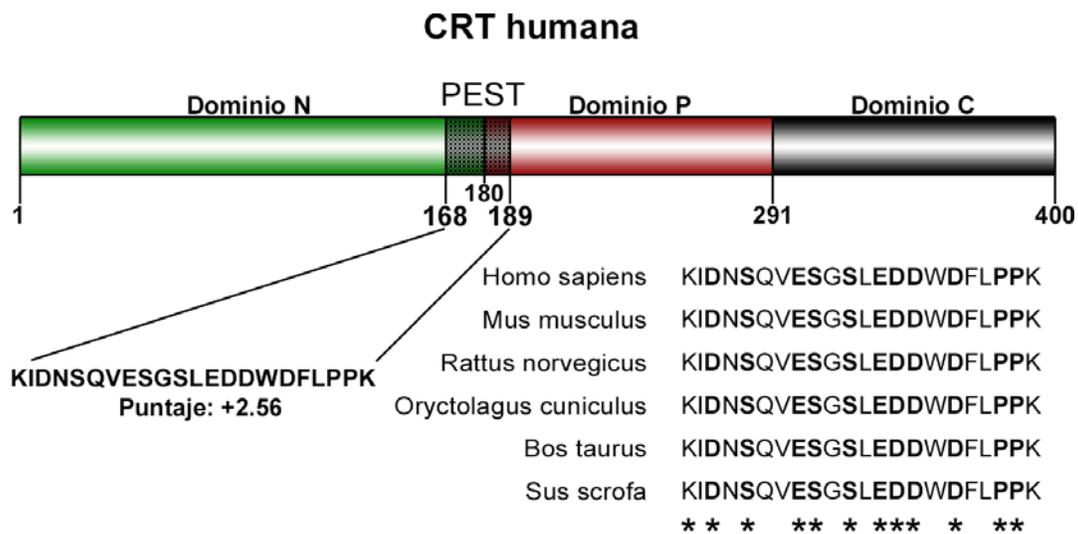
**Figura 15. Predicción de los sitios de ubiquitinación en CRT.**

(A) Tabla que resume los sitios putativos de ubiquitinación predichos por los servicios informáticos de UbPred (<http://ubpred.org>) y BDM-UB (<http://bdmpub.biocuckoo.org>), así como los puntajes y umbrales asignados por cada predictor. A cada sitio hallado se le asigna un nivel de confianza de acuerdo a cuan por encima se encuentre del umbral establecido. (B) Representación de los sitios putativos de ubiquitinación dentro de los distintos dominios de la secuencia de CRT. Los sitios con mayor puntaje (nivel de confianza alta y media) se encuentran conservados en una variedad de especies de mamíferos (resultados no mostrados).

**Posibles secuencias de CRT que podrían señalar para su degradación proteosomal por una vía independiente de Ub**

Aunque la arginilación de CRT es necesaria para su ubiquitinación, la misma no lo es para su degradación proteosomal ya que CRT no arginilable también es sustrato del proteosoma (**Figura 11**). Por lo tanto, debe existir alguna otra señal que dirija CRT hacia la degradación proteosomal, aun si la ubiquitinación de R-CRT participa en la señalización para su degradación proteosomal.

Desde hace tiempo se tratan de encontrar los determinantes moleculares que se exponen o conjugan para destinar a las proteínas a la degradación. Además de la regla de la N, otras secuencias han sido implicadas como señales de reconocimiento para la degradación de proteínas. Entre ellas se encuentra la secuencia PEST, la cual se trata de un péptido rico en Pro, Glu, Ser y Thr (Rogers, Wells et al. 1986). La presencia de motivos PEST en la secuencia de las proteínas ha sido asociado con una reducción en su tiempo de vida media metabólico (Rogers, Wells et al. 1986). Para determinar estas regiones en la estructura primaria de CRT se utilizó el servicio informático Pestfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pestfind>) y se encontraron 5 secuencias putativas. La secuencia con mayor puntuación se encontró en el dominio N-terminal de CRT (169-190 aminoácidos) (**Figura 16**), sugiriendo que el reconocimiento por el proteosoma es mediado por un péptido señal ubicado dentro de la secuencia de CRT.



**Figura 16. Representación de secuencias PEST predichas en CRT.**

La secuencia PEST con mayor puntaje, identificada usando el servicio informático PESTfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pestfind>), se representó en un esquema que muestra la distribución de los dominios de CRT. Tabla que resume los sitios putativos de ubiquitinación predichos por los servicios informáticos de UbPred (<http://ubpred.org/>) y BDM-UB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/>), así como

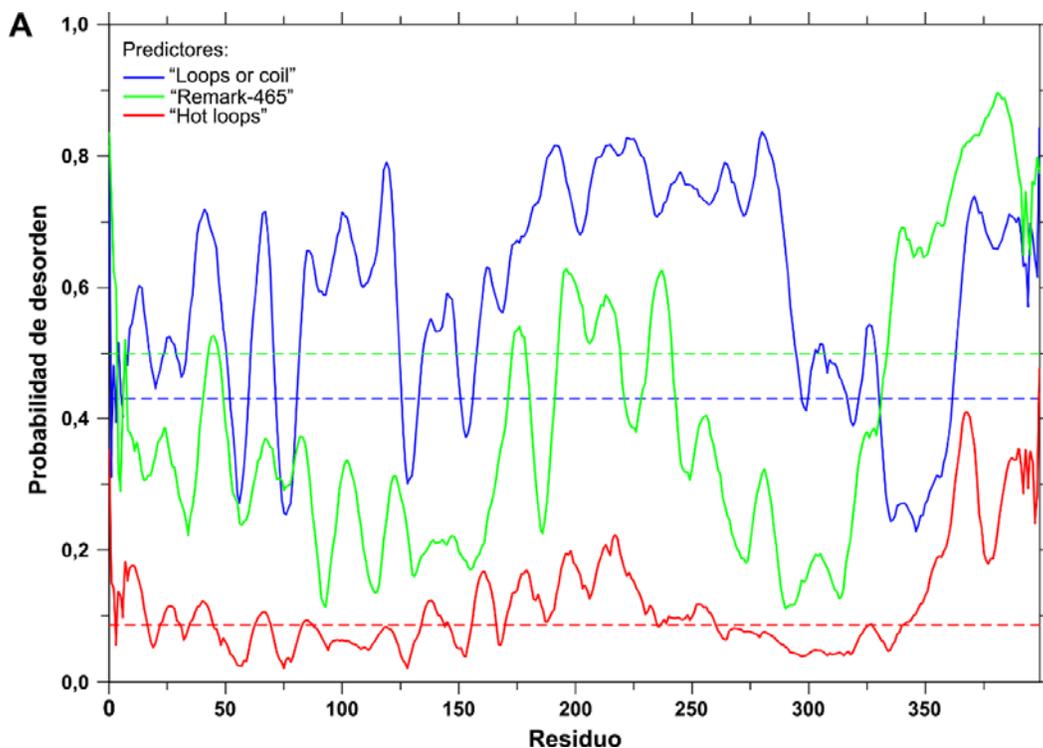
*los puntajes y umbrales asignados por cada predictor. Esta secuencia PEST de CRT se encuentra conservada en la variedad de especies de mamíferos mostrada.*

Por otra parte, también se ha postulado que la presencia de regiones desordenadas desempeña un rol impotante en la señalización para la degradación proteosomal de proteínas. Este es el caso de Rpn4, TS y ODC, las cuales presentan regiones desordenadas (Erales and Coffino 2013). Además, se sugiere que las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) que se degradan vía proteosomal pueden alcanzar los sitios catalíticos del proteosoma por difusión pasiva a través de la entrada a la cámara proteolítica (Liu, Li et al. 2006). Las IDPs son proteínas o dominios en estado nativo que se encuentran completamente desordenados o contienen grandes regiones desordenadas. Se conocen más de 100 proteínas pertenecientes a esta categoría, incluyendo Tau, priones, Bcl-2, p53, 4E-BP1 y EIF1A (Tompa 2002; Uversky 2002). Aunque existe escaso conocimiento acerca de la función de las IDPs, se postula que se generaría orden en estas regiones mediante su unión a otra molécula (Radhakrishnan, Perez-Alvarado et al. 1997) o por medio de cambios en el entorno bioquímico (Dunker, Lawson et al. 2001; Dunker, Brown et al. 2002; Uversky 2002). Debido a que estas regiones no son genéricas y no existe un mecanismo general de degradación para esta clase de proteínas, este tipo de señalización para la degradación de proteínas se halla poco desarrollado.

Con el fin de determinar si la estructura primaria de CRT puede contener regiones desordenadas, se utilizó el servicio informático DisEMBL (<http://dis.embl.de>) (Linding, Jensen et al. 2003). DisEMBL predice y muestra la probabilidad de segmentos desordenados o desestructurados dentro de la secuencia de una proteína, pero como no existe una definición clara de desorden en la estructura de una molécula, el mismo se determina midiendo parámetros basados en varias definiciones alternativas. Este predictor emplea tres criterios diferentes para asignar desorden en una secuencia: (i) bucles y espirales (“loops and coils”) tal como lo define DSSP (Kabsch and Sander 1983), el cual constituye una definición útil pero algo promiscua para predecir regiones desordenadas ya que los bucles y espirales no son necesariamente regiones desordenadas, aunque estas últimas se encuentran solamente dentro de los bucles; (ii) bucles calientes (“hot loops”), el cual constituye una categoría refinada de los anteriores, siendo aquellos bucles con alto grado de movilidad determinados por factores de temperatura del  $C\alpha$  (Smith, Radivojac et al. 2003); (iii) coordenadas que faltan en las estructuras de rayos-X definidas por las entradas “remark465” en PDB, las cuales son densidades de electrones no asignadas que generalmente refleja el desorden intrínseco (Li, Obradovic et al. 2000). Esta última definición determina regiones desordenadas con

precisión pero se limita a proteínas para las cuales se obtuvieron datos cristalográficos. Mediante el predictor DisEML, se encontraron varias regiones desordenadas en la molécula de CRT (**Figura 17A,B**), de las cuales se destacaron dos que son comunes a las tres aproximaciones empleadas por el predictor (“loops and coils”, “hot loops” y “remark465”) (**Figura 17C**). Una de estas regiones se encuentra sobre el dominio P de CRT y la otra sobre el dominio C, ambas en posiciones altamente flexibles de la estructura de CRT (**Figura 17C**). De estas dos regiones, la que se encuentra sobre el dominio P es la más conservada entre varias especies de mamíferos (**Figura 17D**). Aunque la región desordenada del dominio C presenta solo ~60% de homología con la de otras especies, mediante DisEMBL se determinó que en todas ellas este fragmento de CRT es una región desordenada (resultado no mostrado).

Estos resultados muestran la presencia de secuencias PEST e IDPs en la estructura primaria de CRT que podrían estar implicadas en el señalamiento para su degradación proteosomal en el citoplasma. El desarrollo futuro de variantes de CRT con sustituciones en los aminoácidos Pro, Glu y Ser del sitio PEST, y deleciones de las regiones desordenadas, servirán para determinar experimentalmente la influencia de estos sitios en la inestabilidad de CRT en el citoplasma.



**Figura 17. Predicción de regiones desordenadas (IDPs) en la estructura primaria de CRT.**

Mediante los servicios informáticos de DisEMBL () se buscaron regiones desordenadas en la estructura primaria de CRT. (A) El gráfico que representan la probabilidad de desorden de cada residuo en la

**B** Dominios de CRT: — Dominio N — Dominio P ---- Dominio C

“Loops or coil”	“Hot loops”	“Remark-465”
<u>EPAVYFKEQF LDGDGWTSRW IESKHKSDFG</u>	<u>EPAVYFKEQF LDGDGWTSRW IESKHKSDFG</u>	<u>EPAVYFKEQF LDGDGWTSRW IESKHKSDFG</u>
<u>KFVLSGGKGY GDEEKDKGLQ TSQDARFYAL</u>	<u>KFVLSGGKGY GDEEKDKGLQ TSQDARFYAL</u>	<u>KFVLSGGKGY GDEEKDKGLQ TSQDARFYAL</u>
<u>SASFEPFSNK GQTLVVQFTV KHEQNIDCGG</u>	<u>SASFEPFSNK GQTLVVQFTV KHEQNIDCGG</u>	<u>SASFEPFSNK GQTLVVQFTV KHEQNIDCGG</u>
<u>GYVKLFPNSL DQTMHGDSE YNIMFGPDIC</u>	<u>GYVKLFPNSL DQTMHGDSE YNIMFGPDIC</u>	<u>GYVKLFPNSL DQTMHGDSE YNIMFGPDIC</u>
<u>GPGTKKVHVI FNYKGNVLI NKDIRCKDDE</u>	<u>GPGTKKVHVI FNYKGNVLI NKDIRCKDDE</u>	<u>GPGTKKVHVI FNYKGNVLI NKDIRCKDDE</u>
<u>FTHLYTLIVR PDNTYEVKID NSQVESGSLE</u>	<u>FTHLYTLIVR PDNTYEVKID NSQVESGSLE</u>	<u>FTHLYTLIVR PDNTYEVKID NSQVESGSLE</u>
<u>DDWDFLPPKK IKDPDASKPE DWDERAKIDD</u>	<u>DDWDFLPPKK IKDPDASKPE DWDERAKIDD</u>	<u>DDWDFLPPKK IKDPDASKPE DWDERAKIDD</u>
<u>PTDSKPEDWD KPEHIPDPDA KKPEDWDEEM</u>	<u>PTDSKPEDWD KPEHIPDPDA KKPEDWDEEM</u>	<u>PTDSKPEDWD KPEHIPDPDA KKPEDWDEEM</u>
<u>DGEWEPPIQ NPEYKGEWKP RQIDNPDYKG</u>	<u>DGEWEPPIQ NPEYKGEWKP RQIDNPDYKG</u>	<u>DGEWEPPIQ NPEYKGEWKP RQIDNPDYKG</u>
<u>TIWHPIDNP EYSPDPSIYA YDNFGVLGLD</u>	<u>TIWHPIDNP EYSPDPSIYA YDNFGVLGLD</u>	<u>TIWHPIDNP EYSPDPSIYA YDNFGVLGLD</u>
<u>LWQVKSQTIF DNFLITNDEA YAEFNGNETW</u>	<u>LWQVKSQTIF DNFLITNDEA YAEFNGNETW</u>	<u>LWQVKSQTIF DNFLITNDEA YAEFNGNETW</u>
<u>GVTKAAEQM KDKQDEEQRLL KEEEDKRRK</u>	<u>GVTKAAEQM KDKQDEEQRLL KEEEDKRRK</u>	<u>GVTKAAEQM KDKQDEEQRLL KEEEDKRRK</u>
<u>EEEAEDKED DEDKDEEED EEDKEEED</u>	<u>EEEAEDKED DEDKDEEED EEDKEEED</u>	<u>EEEAEDKED DEDKDEEED EEDKEEED</u>
<u>DVPGQAKDEL</u>	<u>DVPGQAKDEL</u>	<u>DVPGQAKDEL</u>

**C**

	10	20	30	40	50	60	70
	<u>EPAVYFKEQF</u>	<u>LDGDGWT</u>	<u>SRW IESKHKSDFG</u>	<u>KFVLSGGKGY</u>	<u>GDEEKDKGLQ</u>	<u>TSQDARFYAL</u>	<u>SASFEPFSNK</u>
	80	90	100	110	120	130	140
<span style="background-color: yellow;">■</span> Doble coincidencia	<u>GQTLVVQFTV</u>	<u>KHEQNIDCGG</u>	<u>GYVKLFPNSL</u>	<u>DQTMHGDSE</u>	<u>YNIMFGPDIC</u>	<u>GPGTKKVHVI</u>	<u>FNYKGNVLI</u>
<span style="background-color: green;">■</span> Triple coincidencia	150	160	170	180	190	200	210
	<u>NKDIRCKDDE</u>	<u>FTHLYTLIVR</u>	<u>PDNTYEVKID</u>	<u>NSQVESGSLE</u>	<u>DDWDFLPPKK</u>	<u>IKDPDASKPE</u>	<u>DWDERAKIDD</u>
— Dominio N	220	230	240	250	260	270	280
— Dominio P	<u>PTDSKPEDWD</u>	<u>KPEHIPDPDA</u>	<u>KKPEDWDEEM</u>	<u>DGEWEPPIQ</u>	<u>NPEYKGEWKP</u>	<u>RQIDNPDYKG</u>	<u>TIWHPIDNP</u>
--- Dominio C	290	300	310	320	330	340	350
	<u>EYSPDPSIYA</u>	<u>YDNFGVLGLD</u>	<u>LWQVKSQTIF</u>	<u>DNFLITNDEA</u>	<u>YAEFNGNETW</u>	<u>GVTKAAEQM</u>	<u>KDKQDEEQRLL</u>
	360	370	380	390	400		
	<u>KEEEDKRRK</u>	<u>EEEAEDKED</u>	<u>DEDKDEEED</u>	<u>EEDKEEED</u>	<u>DVPGQAKDEL</u>		

**D Conservación de las regiones desordenadas de CRT**

	IDP del dominio P	IDP del dominio C
Homo sapiens	PDASKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWD	EEAE-DKEDDEDK-DEDEEEDKEEED- VPGQAKDEL
Mus musculus	PDAAKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWD	EEAE-DKEDDDR-DEDEEEDKEEED- - SPGQAKDEL
Rattus norvegicus	PDAAKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWD	EEAE-DKEDDDR-DEDEEEDKEEED- - ATGQAKDEL
Oryctolagus cuniculus	PDASKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWD	EEAEDEEDKDDKEDEDEEDKDEEEEA- - AAGQAKDEL
Bos taurus	PDAAKPEDWDRAKIDDPTDSKPEDWD	EEAD- -KDDDEDK-DEDEEEDKEEEDAAAGQAKDEL
Sus scrofa	PDAVKPEDWDERAKIDDPTDSKPEDWD	EEVD- -KEEEDK-DEDEEEDKEEEDAAAGQAKDEL
	*** **	** * * * * *

secuencia de aminoácidos de CRT madura (sin péptido señal) según tres definiciones diferentes de desorden. La curva verde corresponde a la predicción de coordenadas perdidas en cristalografía de rayos X (“remark-465”); la curva roja, “hot loops”; y la curava azul, “loops and coil”. Las líneas de punto horizontal corresponden al nivel de expectativa de aleatoriedad para cada predictor, los cuales deben ser considerados como un mínimo absoluto; para “coils” y “hot loops” se utilizaron las probabilidades a priori, mientras que para “remark-465” se utiliza una puntuación de “neural network” de 0,5. (B) Representación de las regiones desordenadas determinadas por cada predictor dentro de los distintos dominios de la secuencia de CRT. (C) Representación de las regiones deseordenadas dentro de cada dominio de CRT, predecida por los tres predicores (verde) o dos de ellos (amarillo). (D) Homología de las dos regiones

*desordenadas de mayor extensión predichas por las tres aproximaciones; \*, indica residuos conservados;  
-, indica una brecha en la secuencia.*

### **Capítulo 3: ¿Por qué R-CRT no sigue la regla de la N?**

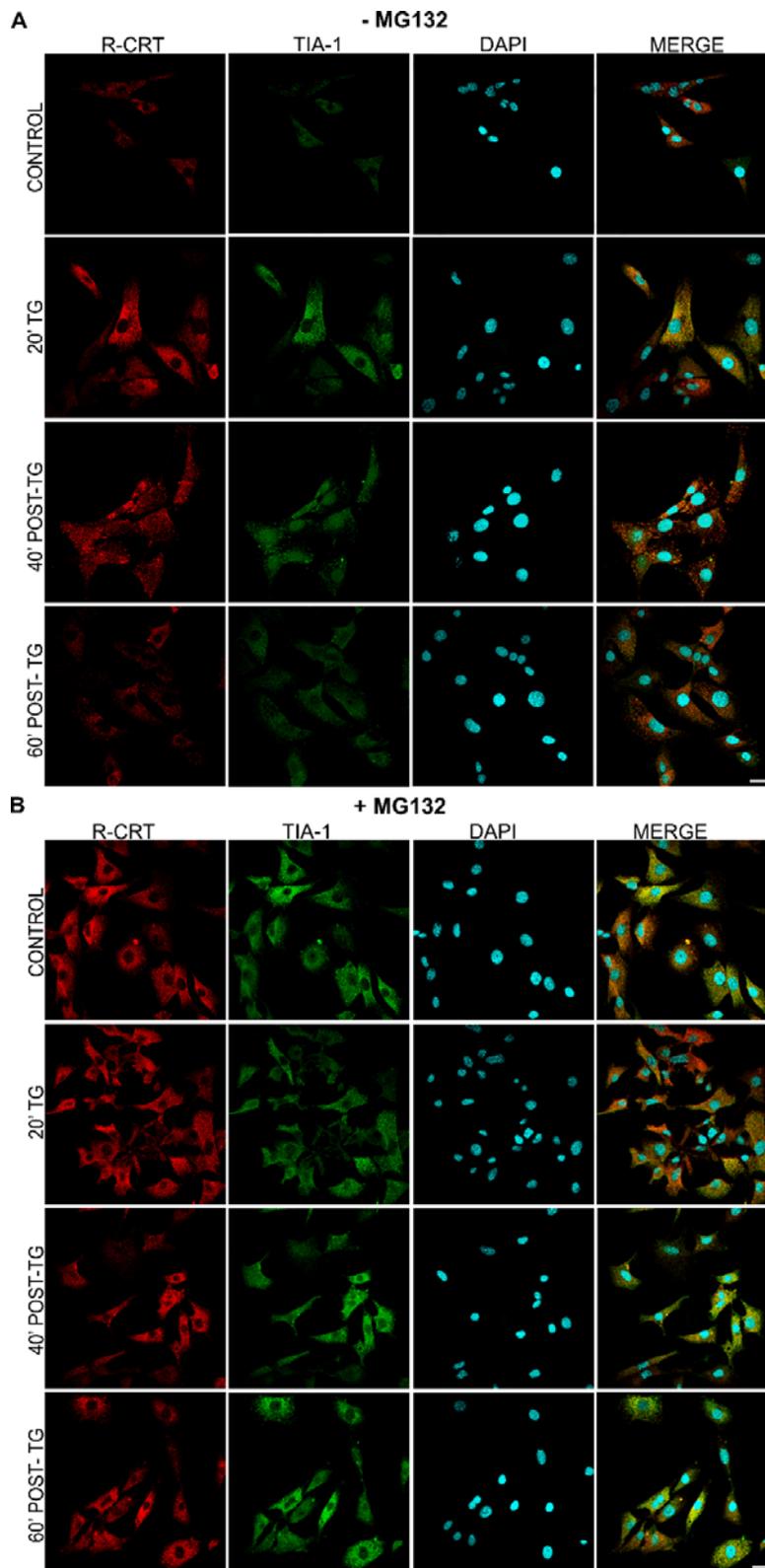
Un residuo Arg en el terminal NH<sub>2</sub> de una proteína es, según la regla de la N, un desestabilizador primario que dirige a las proteínas para su degradación vía el sistema Ub-proteosoma (Varshavsky 2011; Tasaki, Sriram et al. 2012). Sin embargo, se encontró que la vida media de CRT, la cual posee un residuo Glu en su posición NH<sub>2</sub> terminal, es más corta que la de R-CRT ¿Cuál es la causa del mayor tiempo de vida media de R-CRT?

A continuación presentamos varios hallazgos que explicarían por qué la arginilación de CRT prolongaría su vida media.

#### ***La inhibición proteosomal produce acumulación de R-CRT en los GSs***

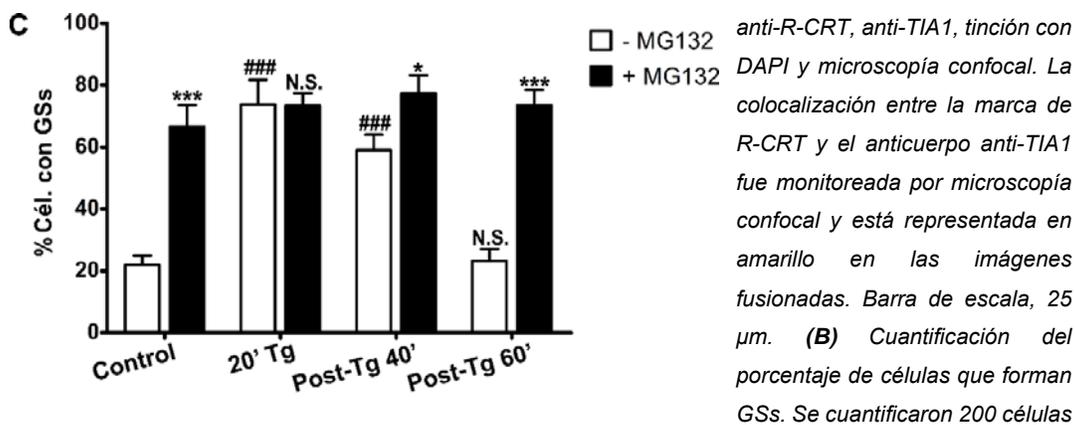
Ha sido demostrado que la formación de los GSs está vinculado al silenciamiento de la traducción o estabilidad del ARNm (Anderson and Kedersha 2009). Los GSs albergan diversos factores de regulación apoptótica, ofreciendo una función de protección durante el estrés (Baguet, Degot et al. 2007; Kwon, Zhang et al. 2007; Eisinger-Mathason, Andrade et al. 2008). Estos complejos de ribonucleoproteínas también podrían funcionar como sitio de anclaje para proteínas y protegerlas de la degradación, aunque hasta el momento no se conoce ninguna proteína que por su asociación a los GSs haya evitado su degradación.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que CRT debe estar arginilada para adquirir su capacidad de asociación a los GSs bajo condiciones de estrés, ya que en las células ATE1<sup>-/-</sup> CRT no se asocia a los GSs al inducir la formación de los mismos (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Dado el rol proapoptótico de R-CRT en la membrana plasmática (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012), se ha postulado que los GSs podrían secuestrar y/o anular factores proapoptóticos como una estrategia celular para otorgarle la posibilidad a la célula de revertir los efectos generados por el estrés y evitar así la muerte celular. En el caso de reversión del estrés celular, la célula debería suprimir el efecto proapoptótico de estos factores, siendo una alternativa su degradación. Teniendo en cuenta que R-CRT es un sustrato del proteosoma y en células tratadas con el estresor Tg, R-CRT se asocia a los GSs (Decca, Carpio et al. 2007), mientras que el proteosoma permanece activo (Menendez-Benito, Verhoef et al. 2005), evaluamos si esta proteína también se acumula en los GSs cuando el proteosoma permanece inactivo.



**Figura 18. R-CRT se acumula en los GSs en presencia de MG132.**

(A) Las células NIH 3T3 incubadas en presencia o ausencia de MG132 (10  $\mu$ M) y tratadas con Tg (2  $\mu$ M) durante 20 min (20' TG) se analizaron 40 y 60 min después de haber removido el Tg (40' POST-TG y 60' POST-TG). El análisis se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia empleando los anticuerpos



por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  DE. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones intragrupo (columna negra vs columna blanca dentro de cada uno de los cuatro grupos experimentales); ###,  $P < 0,001$  para las comparaciones intergrupo respecto al grupo Control (columnas blancas o negras correspondientes a los grupos 20' TG, 40' POST-TG, o 60' POST-TG vs. la correspondiente columna del grupo Control); N.S., diferencia no significativa.

Para evaluar esta hipótesis se emplearon células NIH en las cuales se analizó la formación de los Gs en presencia de MG132 y se determinó la colocalización entre R-CRT y los Gs mediante doble inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT y anti-TIA1, un marcador específico de los Gs. Luego de la cuantificación encontramos que R-CRT es reclutada en los Gs a 1 h del tratamiento con MG132 (**Figura 18A,B**) donde ~60% de las células contienen Gs (**Figura 18C**). Por otra parte, se estudió la formación de Gs y su colocalización con R-CRT durante la reversión del estrés inducido por Tg. Al cabo de 40 min de la remoción del Tg del medio de cultivo, los Gs comienzan a desensamblarse y el ~50% de las células poseen Gs (**Figura 18C**). A los 60 min de haber removido el Tg, se observa que los niveles de R-CRT comienzan a reducirse (**Figura 3**), y tanto el contenido celular de R-CRT como el porcentaje de células que forman Gs, son comparables a los de las células sin tratamiento, es decir, ~20% (**Figura 18C y Figura 3**). Estos hallazgos sugieren que cuando el estrés se revierte y los Gs se desensamblan, R-CRT es liberada de dichos agregados y degradada por el proteosoma.

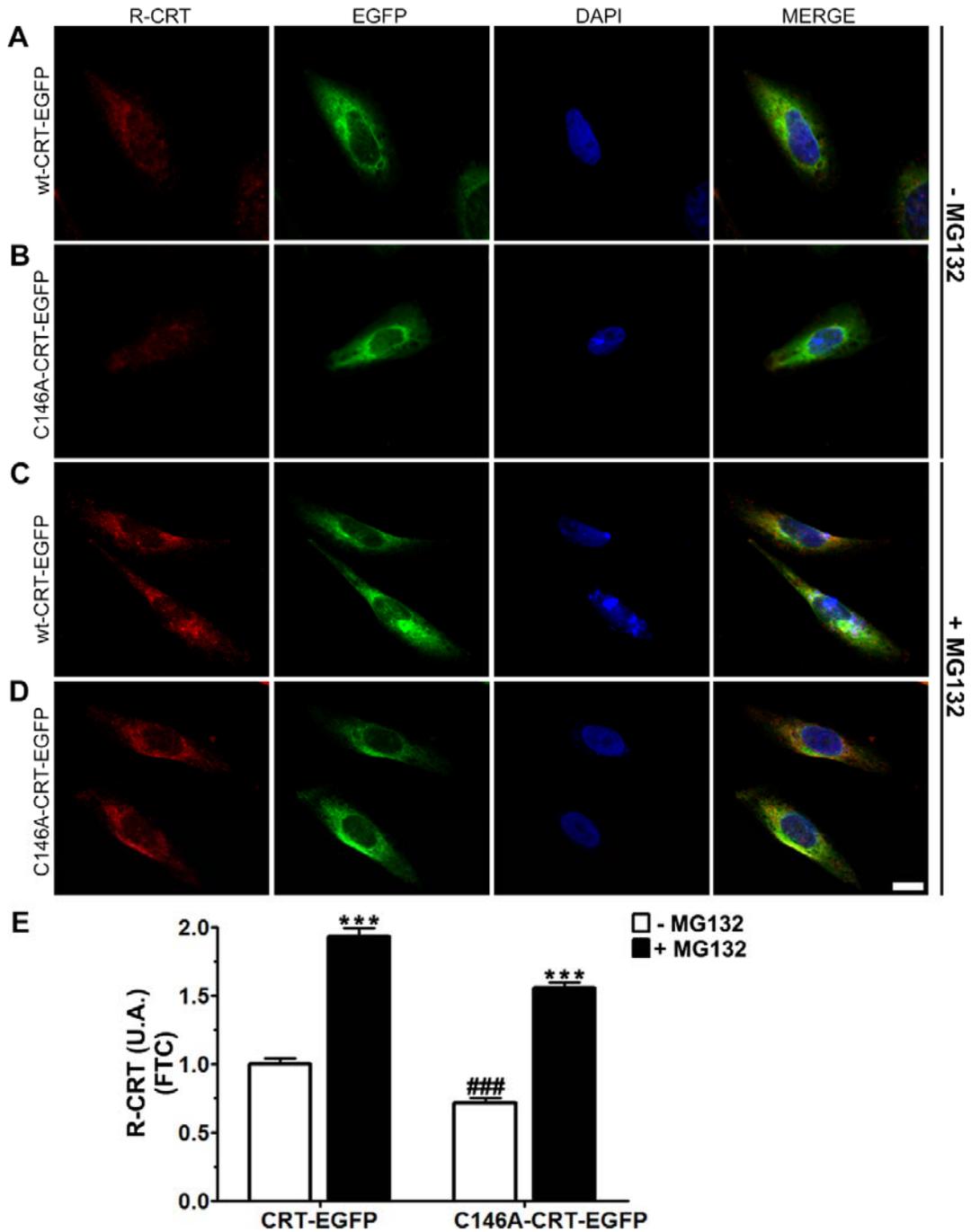
### ***La dimerización de R-CRT interfiere en su degradación proteosomal***

Ha sido demostrado que la dimerización de R-CRT a través de la Cys 146 es de mayor magnitud que la de CRT (Carpio, Decca et al. 2013). Más aun, los puentes disulfuro son esenciales para el andamiaje de gránulos de estrés de mayor tamaño bajo shock térmico (Carpio, Decca et al. 2013). Por otro lado, se describió que la

dimerización de C/EBP dificulta su degradación proteosomal (Hattori, Ohoka et al. 2003). Estos antecedentes y los resultados expuestos en la presente tesis nos llevaron a postular que la dimerización de R-CRT podría ser otra vía de escape a la degradación proteosomal.

Para evaluar esta posibilidad, se emplearon dos estrategias: (i) imposibilitar la dimerización de R-CRT por una mutación puntual del sitio de dimerización en CRT; (ii) emplear un agente reductor como el ditiotreitól (DTT) y examinar la acumulación de R-CRT en ausencia o presencia de MG132.

En la primer estrategia, se generó una mutante de CRT (C146A-CRT-EGFP) que no puede dimerizar porque los homodímeros de CRT se forman bajo condiciones no reductoras mediante la exposición de SH-Cys146 libre (Jorgensen, Ryder et al. 2003; Rizvi, Mancino et al. 2004; Carpio, Decca et al. 2013). Se transfectaron los fibroblastos knockout en CRT (CRT<sup>-/-</sup>) con C146A-CRT-EGFP o CRT wild type (wt-CRT-EGFP), las cuales poseen el péptido señal para su translocación al RE mientras son sintetizadas, por lo que sólo una pequeña fracción de las mismas alcanzará el citoplasma por retrotranslocación. Las células transfectadas se analizaron por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-R-CRT (**Figura 19**). Las células transfectadas con C146A-CRT e incubadas en ausencia de MG132 presentaron niveles de R-CRT 25% por debajo de los hallados en células transfectadas con wt-CRT-EGFP (**Figura 19A,B,E**). Los niveles de R-CRT en células tratadas con MG132 fueron 2 veces mayores a aquellos encontrados en células no tratadas con MG132 (**Figura 19E**), independientemente de la capacidad de dimerización de la proteína expresada. Este hallazgo es consistente con la idea de que si R-CRT permanece en forma monomérica, es susceptible a la degradación proteosomal.



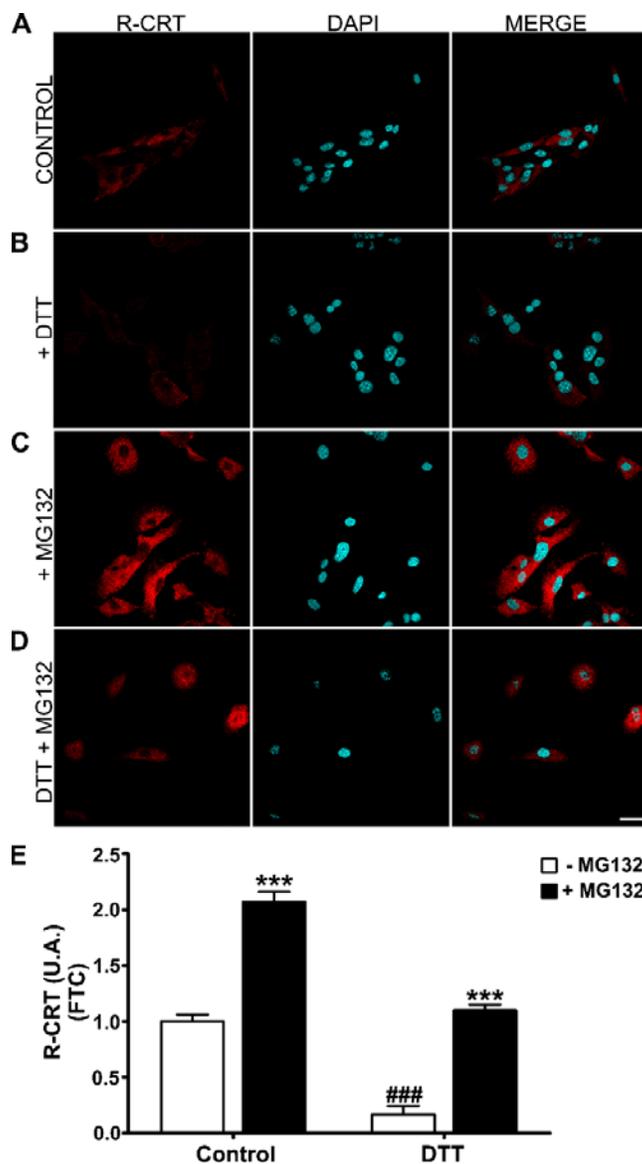
**Figura 19. R-CRT disminuye al mutar el sitio de dimerización sin alteración de la respuesta al inhibidor MG132.**

Las células *CRT*<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con (A,C) wt-CRT-EGFP o (B,D) C146A-CRT-EGFP e incubadas (A,B) en ausencia o (C,D) presencia de MG132 (10  $\mu$ M) durante 2 h. El análisis se llevó a cabo mediante detección de la emisión de fluorescencia de EGFP, inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT, tinción con DAPI, y microscopía confocal. La colocalización entre la marca de EGFP y el anticuerpo R-CRT fue monitoreada por microscopía confocal y está representada en amarillo en las imágenes fusionadas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitrarias (U.A.) relativas al control en ausencia

de MG132 (*wt-CRT-EGFP*). Se cuantificaron 150 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones intragrupo (columna blanca vs columna negra dentro de los grupos *wt-CRT-EGFP* o *C146A-CRT-EGFP*); ###,  $P < 0,001$  para las comparaciones intergrupo respecto al grupo *wt-CRT-EGFP* (columnas blancas o negras correspondientes al grupo *C146A-CRT-EGFP* vs. la correspondiente columna del grupo *wt-CRT-EGFP*).

En la segunda estrategia, se cultivaron células NIH-3T3 en presencia de DTT para inducir la ruptura de los puentes disulfuro y los niveles de R-CRT se determinaron en presencia o ausencia de MG132. El DTT es un fuerte agente reductor, que cuando se usa a concentraciones de hasta 2 mM, reduce notablemente la formación de puentes disulfuros en el citosol celular y no afecta las modificaciones postraduccion de proteínas, ni altera la vía secretoria normal (Lodish and Kong 1993). Las células se analizaron por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-R-CRT (**Figura 20**) y se obtuvieron resultados similares a los de la Figura 20. Esto indicaría que la dimerización de R-CRT dificulta su degradación proteosomal y también explica su tiempo de vida media más prolongado que el de CRT (**Figura 11**).

En resumen, la capacidad de dimerización de las diferentes isoformas de CRT se correlaciona con la susceptibilidad a la degradación proteosomal. En contraste con la regla de la N, la cual predice un mayor tiempo de vida media para CRT respecto a R-CRT, estos resultados indicarían que la arginilación de CRT es la responsable de prologar su vida media, por más que R-CRT sea un sustrato del UPS.



**Figura 20. DTT induce una disminución del contenido de R-CRT sin alteración de la respuesta al inhibidor MG132.**

Las células NIH 3T3 (A) sin tratamiento y tratadas con (B) DTT (2 mM), (C) MG132 (10  $\mu$ M) o (D) DTT y MG132 durante 1 h, se analizaron mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-R-CRT, tinción con DAPI y microscopía confocal. Barra de escala, 25  $\mu$ m. (E) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia total por célula (FTC) se expresó en unidades arbitrarias (U.A.) relativas al control sin tratamiento (Control). Se cuantificaron 150 células por cada condición. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE. \*\*\*,  $P < 0,001$  para las comparaciones intragrupo (columna blanca vs columna negra dentro de los grupos control o DTT); ###,  $P < 0,001$  para las comparaciones intergrupo respecto al grupo control (columna blanca correspondiente al grupo DTT vs. la correspondiente columna del grupo control).

### Exposición de R-CRT a la superficie celular

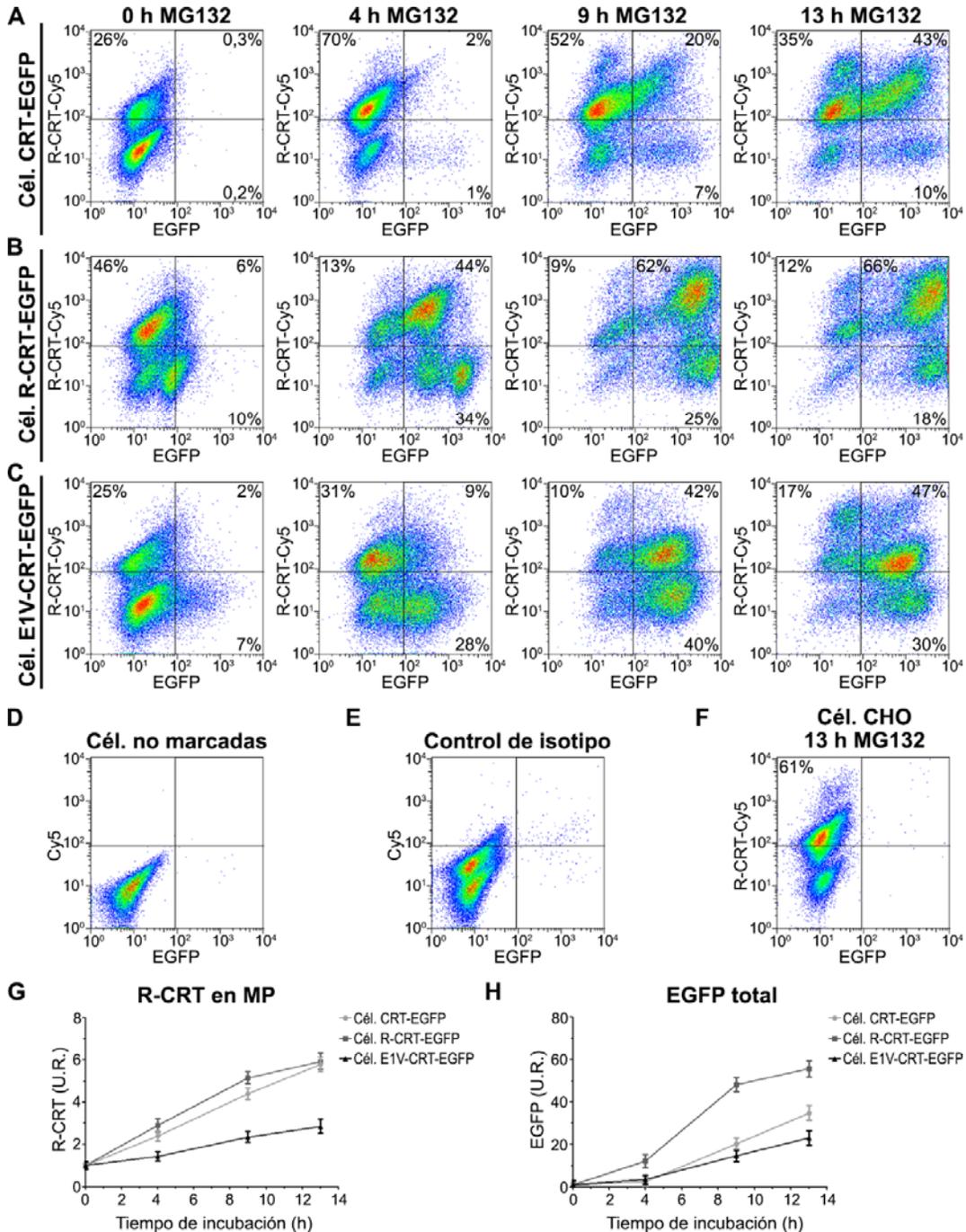
Estudios anteriores del laboratorio demuestran la presencia de R-CRT en la membrana plasmática (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). Mientras que a tiempos cortos de estrés oxidativo R-CRT se localiza mayoritariamente en los GSs, a tiempos prolongados que inducen apoptosis el contenido de R-CRT incrementa en la membrana plasmática (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). Por otra parte, las líneas estables que expresan R-CRT-EGFP en el citoplasma presentaron una leve inducción de apoptosis cuando fueron tratadas con MG132 durante 24 h, lo cual no se observó en las otras líneas estables (Figura 11). Considerando estos antecedentes, se examinó si

R-CRT también incrementa en la membrana plasmática cuando MG132 induce la acumulación de las diferentes isoformas de CRT en el citoplasma.

Para ello, las células estables que expresan las diferentes variantes de CRT (CRT-EGFP, R-CRT-EGFP y E1V-CRT-EGFP) en el citoplasma se incubaron en presencia de MG132 por diferentes períodos de tiempo. Las células sin permeabilizar se examinaron mediante citometría de flujo empleando el anticuerpo anti-R-CRT y detectando la emisión de EGFP para determinar los niveles de R-CRT en la superficie celular y monitorear el contenido total de EGFP (**Figura 21A-H**). De esta manera, la marca del anticuerpo anti-R-CRT muestra únicamente R-CRT presente en la superficie celular y la fluorescencia proveniente de la emisión de EGFP proporciona información del contenido de CRT fusionada a EGFP en toda la célula (interna y de superficie celular) e independientemente de su estado de arginilación. El análisis de la citometría de flujo muestra que en las tres líneas celulares el porcentaje de células que presentan marcación para R-CRT en la superficie celular aumentó en forma dependiente del tiempo de incubación en presencia de MG132 (**Figura 21A-C**). Además, se determinó que los niveles de R-CRT en la superficie celular también incrementaron con el tiempo de exposición al inhibidor proteosomal (**Figura 21G**). Si bien E1V-CRT-EGFP no puede ser arginilada por Ate1 (ver Figura 8C), las células que expresan esta proteína también presentan R-CRT endógena que puede ser detectada en la superficie celular mediante citometría de flujo. La detección de R-CRT endógena se confirmó en las células de las cuales derivan las líneas estables (células CHO parentales) tratadas con MG132 durante 13 h (**Figura 21F**). A 13 h de tratamiento con el inhibidor, el porcentaje de células CHO parentales que presentaron marcación para R-CRT en la superficie celular (61% [**Figura 21F**, cuadrante R-CRT]) fue similar al de las células que expresan E1V-CRT-EGFP (64% [**Figura 21C**, cuadrante R-CRT+ doble positivo]). Además, cuando se analizaron los niveles de R-CRT en la superficie de las células que expresan E1V-CRT-EGFP tratadas con MG132, se encontraron niveles de R-CRT más bajos que los de las células que expresan CRT-EGFP o R-CRT-EGFP (**Figura 21G**). Por otra parte, en las tres líneas celulares se pudo observar que tanto el porcentaje de células fluorescentes como las intensidades de fluorescencia de EGFP aumentaron con el tiempo de incubación en presencia de MG132 (**Figura 21A-C,H**), lo cual concuerda con lo encontrado previamente mediante microscopía confocal y WB (**Figuras 6 y 8**).

Estos resultados demuestran que la exposición de R-CRT a la superficie celular aumenta con el tiempo de exposición al inhibidor MG132, y que la expresión de R-CRT en el citoplasma está relacionada con el incremento de R-CRT en la membrana plasmática. Por lo tanto, estos hallazgos argumentan a favor de que R-CRT accede a la membrana plasmática desde un pool citoplasmático. Además, los resultados expuestos

en conjunto con los antecedentes previos (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010; Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012; Carpio, Decca et al. 2013) indican que la arginilación de CRT podría estar involucrada en la regulación de su localización subcelular y de varias funciones celulares, entre ellas la supervida.



**Figura 21.** La expresión de R-CRT en el citoplasma y la inhibición del proteosoma producen un incremento de R-CRT en la superficie celular.

Las células estables que expresan **(A)** R-CRT-EGFP, **(B)** CRT-EGFP, o **(C)** E1V-CRT-EGFP se trataron con MG132 (10  $\mu$ M) a diferentes tiempos (4, 9 y 14 h). El análisis se llevó a cabo en las células intactas por citometría de flujo detectando la emisión de fluorescencia de EGFP y empleando un anticuerpo anti-R-CRT seguido de marcación con Cy5 para su detección en la superficie celular. Los gráficos de puntos representan la fluorescencia de células positivas para R-CRT (cuadrante superior izquierdo), para EGFP (cuadrante inferior derecho) y para R-CRT y EGFP (cuadrante superior derecho [células doble positivas]). Los porcentajes de células positivas se muestran en los cuadrantes correspondientes. **(D)** Células no marcadas y **(E)** células incubadas sólo con el anticuerpo secundario (Cy5) (control de isotipo) se utilizaron para establecer los umbrales de señal positiva de fluorescencia. La señal positiva se determinó como la fluorescencia por encima de la observada con el anticuerpo secundario. El 100% de los valores corresponden a 50.000 células. **(F)** Control de R-CRT endógena en la superficie de células CHO parentales tratadas con MG132 durante 13 h. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del set de datos correspondientes a la marca de **(G)** anti-R-CRT o **(H)** EGFP. La media ponderada de la intensidad de fluorescencia de la señal positiva de R-CRT o EGFP se expresó en unidades relativas (U.R.) al control en ausencia de MG132 (0 h). Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a la media  $\pm$  EE.

# DISCUSSION

## DISCUSION

Estudios realizados *in vitro* indican la existencia de varias proteínas que pueden ser modificadas por la arginilación postraducción en una gran variedad de tejidos (Kaji, Novelli et al. 1963; Bohley, Kopitz et al. 1991; Hallak, Bongiovanni et al. 1991). Son relativamente pocas las proteínas identificadas cuya arginilación ha sido demostrada *in vivo*: ODC (Kopitz, Rist et al. 1990), RGS4 (activadora de la subunidad alfa de proteína G) (Lee, Tasaki et al. 2005), subunidad  $\gamma$ -2 de la proteína G (Hamilton, Cook et al. 2003),  $\beta$ -actina (Karakozova, Kozak et al. 2006), un fragmento de la proteína talina (Zhang, Saha et al. 2012), miosina (Lian, Suzuki et al. 2013) y CRT (Decca, Carpio et al. 2007).

En nuestro laboratorio, se había demostrado que CRT es sustrato de la incorporación de Arg tanto *in vitro* como en células en cultivo y que dicha arginilación es inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$ . En células NIH 3T3, se había encontrado una escasa inmunotinción citosólica de R-CRT con una distribución de pequeños agregados ocasionales (Decca, Carpio et al. 2007). R-CRT carece del típico aspecto reticular que muestra CRT y no muestra co-localización con CRT en el RE (Decca, Carpio et al. 2007). Además, se había descrito que la exposición de R-CRT a la membrana plasmática incrementa durante la inducción de apoptosis por estrés oxidativo a tiempos prolongados y que dicha translocación se correlaciona con la externalización de fosfatidilserina. Estos hallazgos implican que R-CRT actúa como una proteína pro-apoptótica desde la superficie celular bajo estrés oxidativo. A pesar de todos estos antecedentes, hasta el momento de realización de esta tesis no se había descrito ningún mecanismo de degradación de CRT más que el de la vía lisosomal para CRT de la membrana plasmática (Xiao, Chung et al. 1999).

A partir de estos antecedentes es que surgieron una serie de interrogantes relacionados a la arginilación postraducción de CRT en las células y el rol clásico de la arginilación en la regla de la N, la cual participa en la señalización para la degradación de proteínas por el sistema Ub-proteosoma. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis aportan evidencias concretas acerca de cómo afecta la arginilación de CRT a su degradación proteosomal, como así también aspectos bioquímicos del mecanismo de degradación proteosomal de ambas isoformas.

Si bien CRT es una proteína que clásicamente se ha descrito como residente del RE, actualmente se acepta que es una proteína multi-funcional y multi-compartamental (Michalak, Groenendyk et al. 2009). CRT ha sido involucrada en una gran variedad de procesos que ocurren fuera del RE, incluyendo el citoplasma (Singh, Atreya et al. 1994; Coppolino, Woodside et al. 1997; Timchenko, Iakova et al. 2002; Iakova, Wang et al.

2004), el núcleo (Holaska, Black et al. 2001; Holaska, Black et al. 2002; Olkku and Mahonen 2009), la membrana plasmática y el espacio extracelular (Gao, Adhikari et al. 2002; Goicoechea, Pallero et al. 2002; Orr, Pallero et al. 2002; Orr, Elzie et al. 2003; Orr, Pedraza et al. 2003; Gardai, McPhillips et al. 2005; Donnelly, Roake et al. 2006; Gold, Rahman et al. 2006; Decca, Carpio et al. 2007; Nanney, Woodrell et al. 2008; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010; Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). En este sentido realizamos aportes importantes en referencia a que R-CRT, además de CRT, participa en un número creciente de funciones celulares, las cuales pueden ser claramente explicadas con evidencias experimentales que demuestran su localización citoplasmática (Decca, Carpio et al. 2007). Así demostramos la participación que R-CRT tendría en la estabilidad metabólica de CRT, para lo cual esta modificación postraducción sería necesaria para estabilizar a la proteína y desempeñar sus funciones en el citoplasma y la membrana plasmática durante los eventos de estrés celular. Estos resultados extienden su implicancia a lo ya descrito en relación a la degradación proteosomal de CRT en el citoplasma (Labriola, Conte et al. 2010). Si bien Labriola y colaboradores le atribuyen un rol al proteosoma en la proteólisis de CRT, no explican cómo CRT podría desempeñar funciones en el citoplasma. En la presente tesis demostramos que la degradación proteosomal de CRT es independiente de arginilación y de ubiquitinación (Figuras 6, 8, 11, 13, y 14), aunque su arginilación es necesaria para su ubiquitinación (Figura 15). Además, demostramos que R-CRT es un sustrato del proteosoma (Figuras 3 y 11), y que la vía autofágica-lisosomal no está involucrada en la degradación de R-CRT citoplasmática (Figura 4). Esto fue logrado mediante diferentes enfoques experimentales basados en el reconocimiento de R-CRT endógena (ver capítulo 1) o en la expresión citoplasmática de diferentes isoformas de CRT (arginilable y arginilada) y una mutante no arginilable (ver capítulo 2).

En la primera estrategia, demostramos que R-CRT endógena se degrada por el proteosoma, ya que cuando tratamos células NIH 3T3 y COS-7 con MG132 o LACTA, R-CRT se acumula en el citoplasma de las células y presenta una distribución difusa en forma de pequeños puntos (Figuras 1 y 2). Esto se determinó mediante estudios de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico contra la isoforma arginilada de CRT y el posterior análisis con microscopía confocal. Además, evaluamos el contenido de R-CRT endógena durante el período de reversión del estrés generado con Tg, en presencia o ausencia de MG132 (Figura 3). Al revertirse el estrés en ausencia de MG132, los niveles de R-CRT retornan a los valores de las células sin tratamiento, mientras que en presencia del inhibidor de proteosoma MG132, R-CRT se mantiene incrementada (Figura 3). Nuestros resultados, muestran claramente que la acumulación

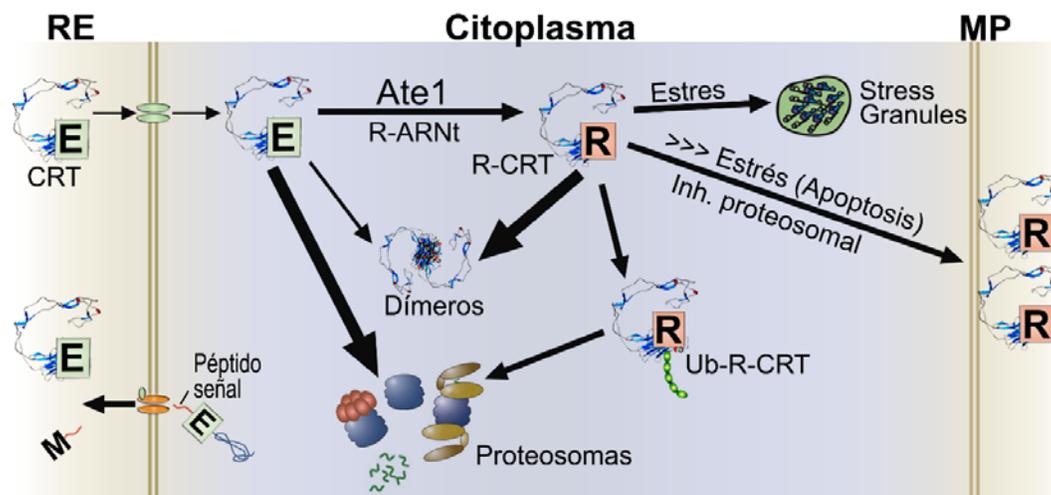
de R-CRT se debe al bloqueo de la actividad proteosomal más que a un incremento de la retrotranslocación o la síntesis de CRT (Figura 3).

La segunda estrategia, además de corroborar que R-CRT es un sustrato del proteosoma, nos permitió determinar su vida media en citoplasma y compararla con la vida media de la isoforma no arginilada. Para ello, obtuvimos líneas estables CHO que expresan en el citoplasma una de tres variantes de CRT (CRT-EGFP, R-CRT-EGFP o EV1-CRT-EGFP). Todas ellas pudieron ser detectadas únicamente en presencia de un inhibidor proteosomal, constituyendo el primer indicio de que son sustratos del proteosoma (Figura 5). Realizamos estudios de inmunofluorescencia y WB en las células tratadas con MG132 (Figuras 6 y 8) así como también ensayos de degradación en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas CHX (Figura 11). En los estudios de inmunofluorescencia, medimos la emisión de fluorescencia de EGFP de todas las variantes de CRT y además detectamos R-CRT empleando un anticuerpo anti-R-CRT. Para los análisis mediante WB, empleamos los anticuerpos anti-R-CRT, anti-GFP y anti- $\beta$ -Actina. Del análisis de los resultados, se concluye que todas las variantes de CRT expresadas en las células fueron degradadas vía proteosoma, pero se determinaron diferencias en sus vidas medias, siendo de ~1,2 h para CRT, ~3,2 h para R-CRT, y ~6,1 h para E1V-CRT (Figura 11). Además, determinamos que la arginilación de CRT es esencial para la ubiquitinación de CRT (Figura 14). Teniendo en cuenta estos hallazgos, se podría interpretar que R-CRT sigue la regla de la N, ya que la arginilación postraducción facilita el reconocimiento de los sustratos por las enzimas E3 ligasas seguido de su degradación vía proteosomal (Varshavsky 2011; Tasaki, Sriram et al. 2012). Sin embargo, en este caso la ubiquitinación no le confiere a R-CRT una vida media más corta tal como propone la regla de la N (Bachmair, Finley et al. 1986).

Estas evidencias son una clara demostración de que “*in vivo*” la arginilación de proteínas es importante para la regulación de la estabilidad metabólica de las mismas, ya que no solo puede disminuir la vida media de una proteína (Gonda, Bachmair et al. 1989; Varshavsky 1992; Varshavsky 1995) sino que también puede incrementarla (Figura 11). Además, la arginilación postraducción puede conferir a las proteínas diferentes funciones y localizaciones subcelulares (Hamilton, Cook et al. 2003; Karakozova, Kozak et al. 2006; Decca, Carpio et al. 2007). En algunos casos, como el de CRT, esta modificación postraducción regula su destino celular (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010; Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012) en diferentes condiciones incluyendo el estrés. En relación a ello, en el presente trabajo de tesis demostramos que células NIH 3T3 tratadas con MG132 forman GSs, los cuales contienen R-CRT acumulada por inhibición de su degradación (Figura 18). Más aún, en células CRT<sup>-/-</sup> transfectadas con una mutante de CRT que impide la formación del dímero de esta

proteína, la misma ve afectada su estabilidad metabólica pero no su respuesta al inhibidor proteosomal (Figura 19). Teniendo que R-CRT formando dímeros y/o asociada a los GSs podría evadir al proteosoma, las diferencias de vida media entre CRT y R-CRT pueden ser atribuidas tanto al incremento de formación de dímeros (Carpio, Decca et al. 2013) como a la asociación con los GSs de la isoforma arginilada (Decca, Carpio et al. 2007).

Por otra parte, descartamos experimentalmente que R-CRT recorra la vía autofágica-lisosomal (Figura 4). Tampoco el tratamiento con Tg usado para aumentar la retrotranslocación de CRT induce formación de autofagosomas (Figura 4). Aunque se ha descrito que Tg puede inducir la formación de autofagosomas, la misma se observa a tiempos más prolongados de tratamiento (entre las 24 y 72 h) (Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007).



**Esquema 7. Modelo de eventos de CRT y R-CRT en la célula.**

*CRT residente del RE se retrotransloca al citoplasma celular. Esta dislocación se ve incrementada por una disminución de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Una vez en el citoplasma CRT es arginilada por Ate1 y queda exceso de CRT sin arginilar este se degrada por el proteosoma de manera independiente de Ub. Una vez arginilada en el citoplasma y en ausencia de estrés celular, R-CRT es ubiquitinada y también es degradada por el proteosoma. Sin embargo, el proteosoma no podría procesar dímeros de proteínas y por experimentos in vitro sabemos que R-CRT tiene mayor capacidad de formar dímeros que CRT. En condiciones de estrés que impliquen una disminución del  $Ca^{2+}$  intracelular, R-CRT se asocia a los GSs. Si el estrés se revierte, R-CRT es liberada de los GSs y los monómeros de la misma se degradan por la vía Ub-proteosoma. En cambio, si el estrés persiste tal que la célula no puede reanudar sus funciones o en condiciones de inhibición proteosomal, R-CRT disloca hacia la cara externa de la membrana plasmática (MP), desde donde actúa como una señal de apoptosis temprana.*

En resumen, en este trabajo de tesis se demuestra que R-CRT es degradada por el proteosoma aunque presenta una vida media y un mecanismo de degradación

diferente al de CRT. Encontramos que CRT se degrada por una vía proteosomal independiente de arginilación y ubiquitinación, mientras que R-CRT es modificada con Ub y se degrada vía proteosomal. Nuestros resultados en conjunto con otros trabajos pueden ser plasmados en un modelo (**Esquema 7**), que explicaría el posible tráfico de CRT desde el RE al citoplasma, desde donde seguiría diferentes destinos según las condiciones fisiológicas.

### ***Mecanismos de degradación proteosomal de CRT y R-CRT***

Para que el proteosoma pueda degradar a CRT, la misma debe escapar del RE y transitar hacia el citoplasma. El mecanismo de retrotranslocación todavía sigue siendo tema de estudio, pero existen evidencias de que el dominio-N es inhibitorio, mientras que el dominio-C es necesario y suficiente para la retrotranslocación de CRT (Afshar, Black et al. 2005). Estudios de nuestro grupo de investigación demuestran que CRT retrotransloca del RE al citoplasma donde esta proteína experimenta arginilación postraducción y que este fenómeno se halla regulado por la disminución de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Estos datos demuestran la importancia del dominio-C, el cual es responsable de la función de almacenamiento y regulación del  $Ca^{2+}$ , y sugieren que el mismo puede contener una señal que es reconocida para su retrotranslocación desde el RE. En el presente trabajo, se demostró que la inhibición del proteosoma genera la acumulación de R-CRT en el citoplasma sin inducir un aumento de la retrotranslocación basal (Figura 3). Esto se condice con lo encontrado por otros autores que postulan que la retrotranslocación de CRT es independiente de la actividad proteosomal (Afshar, Black et al. 2005). Además, el estrés del RE no parece que pueda promover la acumulación de R-CRT evidenciada en nuestros resultados (Figuras 1, 2 y 3), ya que el tratamiento de células con Tg produce solo una leve acumulación de sustratos proteosomales reporteros en el citoplasma (Menendez-Benito, Verhoef et al. 2005).

Cuando se expresó CRT en el citoplasma con distintos grupos  $NH_2$  terminales evitando su paso por el RE, se encontró que la variante no arginilable (E1V-CRT) también es sustrato del proteosoma (Figuras 5, 6, 8 y 11), lo cual indica que la arginilación no es necesaria para la degradación proteosomal de CRT. Resultados similares se obtuvieron en células ATE1<sup>-/-</sup> transfectadas con Ub-CRT-EGFP, confirmando que CRT no arginilada es sustrato del proteosoma (Figura 13). Sin embargo, observamos que la arginilación postraduccional incrementa el tiempo de vida media de CRT en el citoplasma, lo cual es contrario a lo postulado en la regla de la N

en cuanto a la participación de la arginilación en la degradación de proteínas (Bachmair, Finley et al. 1986).

Diferentes clases de proteosomas podrían participar en la degradación de CRT y R-CRT. La vía proteosomal involucra a proteosomas de varios tipos coexistiendo, tales como el 20S, 26S, inmunoproteosoma, etc. (Tanahashi, Murakami et al. 2000). La degradación de proteínas a través del proteosoma 26S ocurre principalmente de manera dependiente de Ub, mientras que otras clases de proteosoma se postula que degradarían proteínas de manera independiente de Ub (DeMartino, Moomaw et al. 1994; Eroles and Coffino 2013). En el presente estudio, se ha demostrado que la arginilación de CRT es esencial para su ubiquitinación, lo cual estaría de acuerdo con que estas proteínas siguen distintos mecanismos de degradación proteosomal. Un interrogante que queda planteado es si la ubiquitinación de R-CRT participa en su degradación proteosomal, ya que esta modificación también está involucrada en otras funciones (Sun and Chen 2004). Sin embargo, el patrón de las bandas de los conjugados de R-CRT con Ub (Figura 14) sugiere que se trata de una poliubiquitinación, por lo que es probable que esta modificación participe en la degradación proteosomal de R-CRT. CRT sigue la regla de la N en el sentido de que la arginilación permite su ubiquitinación y posterior degradación (Elias and Ciechanover 1990) aunque, a diferencia de lo que predice la regla, en este caso este hecho no implica una disminución en el tiempo de vida media de la proteína. Otro interrogante es el sitio de ubiquitinación de R-CRT, más específicamente cuál o cuáles residuos Lys son blancos de esta modificación. En el presente trabajo de tesis, se utilizó un algoritmo informático para evaluar los sitios más probables entre las 57 Lys que posee la estructura primaria de CRT y se encontró que los residuos Lys207, 215, 221, 231, 232, 338 y 397 localizados en el dominio P y C de la proteína como sitios putativos de ubiquitinación (Figura 15). Este resultado servirá a futuro para diseñar variantes de R-CRT en los cuales se muten esos residuos Lys y determinar experimentalmente el sitio de ubiquitinación.

En resumen, E1V-CRT no puede ser arginilada en la célula, tiene una vida media ~6.1 h y algún sistema proteosomal la degrada de manera independiente de Ub; R-CRT se sintetiza arginilada en la célula, se ubiquitina, tiene una vida media ~3.2 h y probablemente el proteosoma 26S la degrada; CRT puede ser arginilada por la enzima Ate1 presente en las células, por lo que podría seguir más de un mecanismo de degradación proteosomal, uno dependiente y otro independiente de arginilación y ubiquitinación, y presenta un tiempo de vida media de ~1.2 h (Figura 11) . Si los proteosomas que degradan a R-CRT y E1V-CRT son de diferente clase, entonces cuando se expresa CRT en las células, la fracción de proteosomas que actúan sobre ella es mayor (esto es la fracción de proteosomas que degradan a R-CRT más la

fracción de proteosomas que degradan a E1V-CRT) lo que explicaría la disminución en su tiempo de vida media. En este sentido, ~40% del total de proteosomas en las células HeLa corresponde al proteosoma 20S, ~15% el proteosoma 26S y el resto a otras clases de proteosomas (Tanahashi, Murakami et al. 2000). Además, el hecho de que CRT en las células ATE1<sup>-/-</sup> no sigue un patrón de degradación semejante al de E1V-CRT en la línea estable, y además presenta menor tiempo de vida media que R-CRT, indica que la naturaleza del aminoácido en la posición NH<sub>2</sub> terminal de CRT afecta su degradación independiente de Ub, tal que la modificación del residuo Glu por Val vuelve a la proteína más estable (Figuras 11 y 13).

Futuros estudios serán necesarios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de degradación proteosomal de R-CRT y CRT. Un interrogante interesante será descifrar cuál es la señal de degradación de CRT no arginilada. Esta señal podría ser interna y estar codificada en su estructura primaria (Jariel-Encontre, Bossis et al. 2008; Takeuchi, Chen et al. 2008; Pena, Melo et al. 2009; Eroles and Coffino 2013), adquirida mediante una modificación postraducción (Leboucher, Tsai et al. 2012), mediante la unión de CRT a otra proteína (Kettern, Dreiseidler et al. 2010; Stolz and Wolf 2010), o por daño oxidativo de la proteína (Ravid and Hochstrasser 2008; Eroles and Coffino 2013).

En cuanto a la primera posibilidad, se examinaron la presencia de secuencias PEST e IDPs en la estructura primaria de CRT utilizando algoritmos específicos. Se encontró una secuencia PEST entre los aminoácidos 168 y 189 de CRT madura entre los dominios N y P (Figura 16), y al menos dos IDPs, una en el dominio P y otra en el dominio C (Figura 17). Estos resultados servirán a futuro para diseñar variantes de CRT en los cuales se delecionen esos sitios y determinar experimentalmente cómo afectan a la estabilidad de la proteína. Tanto el dominio C como el P de CRT se encuentran expuestos en la molécula y presentan una gran flexibilidad (Chouquet, Paidassi et al. 2011), tal que dificultan la cristalización de la proteína, por lo que es probable que participen en su señalización para la degradación proteosomal. Dado los resultados de la influencia del aminoácido en la posición NH<sub>2</sub> terminal de CRT en su tiempo de vida media (Figuras 11 y 13), no se debería descartar que los primeros residuos de CRT en el dominio N predichos como IDPs por sólo dos de los tres algoritmos (Figura 17), también participen en la señalización para la degradación proteosomal. Además, se predice que la última porción del dominio C estaría próximo a la región NH<sub>2</sub> terminal de la molécula por lo que ambas regiones podrían estar involucradas en señalar a CRT para la degradación proteosomal.

En cuanto a la segunda posibilidad, es decir la señalización de CRT para la degradación proteosomal mediante una modificación postraducción, la fosforilación de

CRT en el citoplasma es la más probable (Leboucher, Tsai et al. 2012). Se ha descrito que CRT es sustrato de la proteína quinasa C (Cristina Castaneda-Patlan, Razo-Paredes et al. 2010). No sólo será interesante estudiar si esta modificación está involucrada en señalar a CRT para su degradación proteosomal, sino también determinar si CRT puede ser fosforilada independientemente de su estado de arginilación o por el contrario, si existe un “cross-talk” entre estas modificaciones tanto a nivel molecular como a nivel de la función. Tampoco se debería descartar que otra clase de modificación postraduccion no descrita hasta el momento para CRT, pueda estar involucrada en este proceso. Ejemplo de esto podría ser la conjugación con una proteína “Ub-like”, de las cuales comprenden una amplia variedad con múltiples funciones (Schulman 2011). En cuanto a la tercera posibilidad, es decir la señalización de CRT para la degradación proteosomal mediante su unión a otra proteína, será necesario determinar proteínas con las cuales CRT y/o R-CRT se asocian en el citoplasma. Este tipo de degradación también se conoce como degradación proteosomal asistida por chaperonas (CAP) (Ketterer, Dreiseidler et al. 2010).

### ***Implicancias de la dimerización, el reclutamiento en los GSs y la exposición a la membrana plasmática de R-CRT en su degradación proteosomal***

En el presente trabajo de tesis ampliamos los conocimientos referidos a la asociación de R-CRT a los GSs y su implicancia en condiciones de estrés. Previamente había sido descrito que R-CRT se recluta a los GSs en diversas condiciones de estrés tales como shock térmico, tratamiento con arsenito, TG o TG-EGTA (Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). En este estudio demostramos que R-CRT se asocia a los GSs en respuesta a la inhibición del proteosoma (Figura 18). CRT debe estar previamente arginilada para adquirir su capacidad de asociación a los GSs bajo condiciones de estrés, ya que en las células ATE1<sup>-/-</sup> no se encontró CRT contenida en los GSs (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010). Este hecho, nos lleva a postular que la asociación de R-CRT a los GSs dificulta su degradación proteosomal siendo responsable, al menos en parte, del tiempo de vida media más largo de R-CRT respecto a CRT, lo cual constituiría una función nueva de los GSs.

La arginilación postraduccion podría también promover un re-arreglo molecular del pool de cyt-CRT, por ejemplo, facilitando la formación de homodímeros (Carpio, Decca et al. 2013), y en consecuencia dificultar su degradación proteosomal (Figuras 19 y 20). CRT posee la capacidad de formar homodímeros mediante la unión covalente de sus grupos SH libres de la Cys146 y de formar oligómeros a través de interacciones no covalentes en condiciones de alta temperatura, bajo pH (5-6) o bien otras que

favorezcan un desplegamiento parcial de la proteína (Jorgensen, Ryder et al. 2003). En este sentido existen evidencias de que proteínas tales como C/EBP son estabilizadas por la formación de homo y heterodímeros (Hattori, Ohoka et al. 2003). Por otra parte, la dimerización de R-CRT es importante en el andamiaje de los GSs, ya que células expuestas a calor forman GSs de un diámetro mayor de los que se originan en condiciones en las que además se impide la formación de puentes disulfuro (Carpio, Decca et al. 2013). Por lo tanto, la vida media más larga de R-CRT (Figura 11) podría estar causada por la interferencia de cualquiera de los mecanismos mencionados anteriormente (ubiquitinación, formación de dímeros, asociación con los GSs, etc) en su degradación proteosomal, probablemente de manera conjunta y relacionada.

Nuestros resultados también demuestran que la exposición de R-CRT a la superficie celular aumenta con el tiempo de exposición al inhibidor MG132 (Figura 21). Lopez Sambrooks y colaboradores, demuestran la presencia de R-CRT en la membrana plasmática y que a tiempos cortos de estrés oxidativo, R-CRT se localiza mayoritariamente en los GSs, mientras que a tiempos prolongados, los cuales inducen apoptosis, el contenido de R-CRT incrementa en la membrana plasmática (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012). Nuestros hallazgos indican que el aumento de R-CRT en la membrana plasmática está relacionada con el incremento de R-CRT en el citoplasma, ya que por la sola expresión de R-CRT directamente en el citoplasma, R-CRT incrementa en la superficie celular (Figura 21). Por lo tanto, estos hallazgos argumentan a favor de que R-CRT acceda a la membrana plasmática desde un "pool" citoplasmático.

En base a investigaciones previas del grupo de trabajo y teniendo en cuenta los resultados aquí presentados, postulamos que CRT, luego de su retrotranslocación de desde el RE, debería ser removido rápidamente del citoplasma ya que si se prolonga su presencia en este compartimento podría alterar la homeostasis del  $Ca^{2+}$  reduciendo la sobrevivencia de la célula (Lim, Chang et al. 2008). CRT está involucrada en una amplia variedad de procesos de injuria incluyendo el estrés celular, la apoptosis y la fagocitosis (Lopez Sambrooks, Carpio et al. 2012; Wu, Han et al. 2013). Para que CRT desempeñe sus funciones normalmente en estos procesos debería primero ser estabilizada en el citoplasma. La arginilación de CRT sería importante en esta estabilización así como también para la formación de GSs, su translocación a la cara externa de la membrana plasmática y el señalamiento pro-apoptótico. De manera que la regulación de los niveles de CRT en los distintos compartimentos subcelulares depende no solamente de su síntesis (Nguyen, Capra et al. 1996), sino también de su degradación. Es posible que el control transcripcional y traduccional de CRT sea el principal regulador de su contenido en el ER, ya que allí se concentra más del 80% del contenido celular de CRT. Sin

embargo, en aquellas localizaciones subcelulares donde se encuentra en escasa proporción es más probable que predomine la regulación por la vía de la degradación proteosomal de CRT, tal como lo demostramos para el citoplasma. Este sería el caso también para CRT en la membrana plasmática, ya que se ha demostrado que la inhibición de la vía lisosomal reduce el contenido de CRT en esta localización (Xiao, Chung et al. 1999). Por último, también podría existir una regulación de los niveles de CRT mediante degradación en el núcleo, donde se encuentran presentes proteosomas en especial aquellos formados por el complejo regulador PA200 (Khor, Bredemeyer et al. 2006).

El presente trabajo da cuenta de la interrelación entre diferentes eventos que puede acontecer a CRT: retrotranslocación, arginilación postraducción, ubiquitinación y formación de homodímeros. Estudios futuros deberán dilucidar cómo interactúan las diferentes modificaciones postraducción que modulan el destino y las funciones de CRT.

### ***Respuesta al estrés y su implicancia en la reparación al daño y reanudación de funciones.***

Las células eucariotas deben adaptarse continuamente a las condiciones externas, incluyendo parámetros físicos tales como la temperatura y la radiación UV, o químicos como cambios en el pH, en el potencial redox, en la concentración de metabolitos y en señales extracelulares de hormonas, citoquinas, y neurotransmisores, entre otras. Así, cuando las células son confrontadas a estrés químico o físico, pueden reaccionar en dos formas opuestas. Por un lado, pueden activar la maquinaria suicida conduciendo a la muerte por apoptosis, o bien por otro lado, pueden activar mecanismos de defensa especialmente diseñados para adaptarse a las condiciones estresantes, reparar el daño y reanudar las funciones celulares normales mediante la inducción del ensamblaje de los GSs (Anderson and Kedersha 2008; Buchan and Parker 2009; Thomas, Loschi et al. 2011). Es decir que ante una situación adversa, las células tienen que tomar decisiones cruciales, como, por ejemplo, dejar de producir las proteínas que normalmente sintetizan, reducir el gasto metabólico y utilizar la energía para fabricar las proteínas especializadas en la contención y en la reparación del daño físico o químico. En pocas palabras, la célula silencia todo lo que tiene que ver con la vida normal y activa lo que necesita para sobrevivir. Esto se consigue mediante un programa celular multifacético que implica la acción concertada de las diversas vías activadas en respuesta al estrés y que involucra el ensamble de los GSs. Si este estrés no puede ser revertido, se activa la maquinaria suicida de apoptosis. La elección entre estas dos opciones está determinada por la intensidad y tipo del estrés, así como también por parámetros

intrínsecos de las células como por ejemplo aquellos que establecen el umbral apoptótico.

En la presente tesis, se demostró que cuando se revierten las condiciones de estrés celular que inducen la acumulación de R-CRT en el citoplasma asociada a los GSs, R-CRT es degradada por el proteosoma y se restituyen sus niveles basales (Figura 18). Esta degradación de R-CRT podría ser importante tanto para evitar una desregulación en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  como para impedir su translocación a la cara externa de la membrana plasmática y la consecuente inducción de apoptosis. Así la degradación de R-CRT sería importante para que la célula reanude sus funciones normales cuando las condiciones de estrés han sido superadas.

En la clínica, la exposición a algunos regímenes quimioterapéuticos induce de muerte celular inmunogénica con la exposición temprana de CRT a la superficie celular de células cancerosas (Obeid, Tesniere et al. 2007; Yang, Li et al. 2012; Raghavan, Wijeyesakere et al. 2013; Wu, Han et al. 2013; Zamanian, Veerakumarasivam et al. 2013). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el inhibidor proteosomal MG132 induce un incremento en la exposición de R-CRT en la membrana plasmática (Figura 21), lo cual podría ser de utilidad en una terapia asociada a la respuesta inmune contra el cáncer. En relación a los aportes aquí realizados, un desafío importante consistirá en determinar si R-CRT al igual que CRT puede disparar una respuesta inmunogénica en presencia de agentes quimioterapéuticos.

El bortezomib, es el primer inhibidor proteosomal empleado como agente quimioterapéutico luego de demostrarse que induce la apoptosis en líneas celulares de mieloma y linfoma (Richardson, Mitsiades et al. 2008). Esta investigación, revela que la formación de los GSs puede constituir un mecanismo por el cual las células cancerosas resisten a la apoptosis inducida por tratamiento con bortezomib (Fournier, Gareau et al. 2010). La formación de GSs (Kwon, Zhang et al. 2007; Arimoto, Fukuda et al. 2008) conduce a la resistencia a apoptosis de células tumorales por un mecanismo que involucra el secuestro y la inactivación de proteínas proapoptóticas en los GSs (Gareau, Fournier et al. 2011). Un mecanismo clave por el cual se inhibe la apoptosis puede implicar la regulación del ARNm de p21 en los GSs a través de la proteína 1 de unión a CUG (CUGBP1) (Gareau, Fournier et al. 2011) o CRT (Iakova, Wang et al. 2004). Por lo tanto, R-CRT también podría actuar como una proteína de unión al ARNm para reclutar o estabilizar ciertos transcritos relacionados con la apoptosis en los GSs. Para evitar que células cancerosas sobrevivan al estrés causado por las terapias farmacológicas, por ejemplo, se podría interferir con su capacidad de defensa. En enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, o autoinmunes, como la

esclerosis múltiple, se podría mejorar la respuesta defensiva para mejorar la supervivencia de las neuronas.

En el futuro, el manejo de estos factores, mediante la regulación de R-CRT así como la formación de los GSS, permitiría controlar la vida o la muerte celular en diversas patologías y quizás la arginilación de CRT sea una pieza clave en el destino celular en algunas de estas condiciones. En consecuencia R-CRT está emergiendo como una nueva proteína cuya regulación está influenciada por su degradación proteosómica y su compartimentalización subcelular. Se puede prever que un papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos se describirá en el futuro próximo para R-CRT.

Por consiguiente, el análisis de las proteínas y sus modificaciones posteriores a la traducción es particularmente importante para el estudio de enfermedades cardíacas, cáncer, patologías neurodegenerativas y diabetes. La caracterización de las modificaciones postraduccionales, aunque desafiante, proporciona valiosa información sobre las funciones celulares.

# MATERIALES Y METODOS

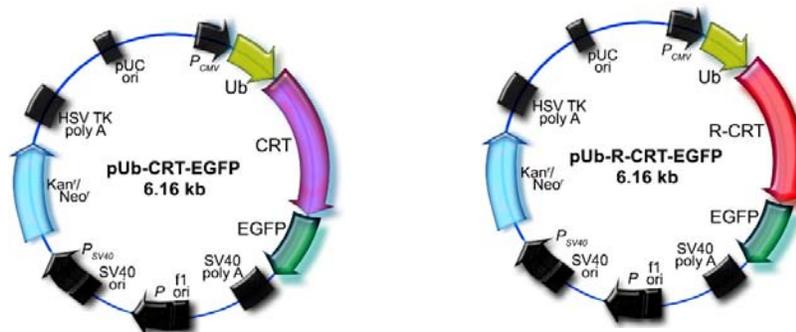
# MATERIALES Y METODOS

## *Cultivo de células*

Las diferentes líneas celulares empleadas fueron crecidas en placas de Petri de 100 mm de diámetro con DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco), que contiene 4,5 g/l de glucosa, 4 mM de L-glutamina y 25 mmol/l Hepes, y complementado con 1mM de piruvato de sodio, 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich), 200 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen) y 10% suero fetal bovino (Gibco). Medio de ayuno para la inducción de autofagia (pH 7,4): 0,0265% CaCl<sub>2</sub>, 0,0098% MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,04% KCl, 0,68% NaCl, 0,012% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Glucosa, 0,22% NaHCO<sub>3</sub>. Las líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón ATE1<sup>-/-</sup> y ATE1<sup>+/+</sup> fueron proporcionados por la Dra. A. Kashina (Departamento de Biología Animal / Bioquímica, Universidad de Pennsylvania, Filadelfia, EE.UU.). Las líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón CRT<sup>-/-</sup> y CRT<sup>+/+</sup> fueron cedidas por el del Dr. M. Michalak (Departamento de Bioquímica de la Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá). La línea estable CHO LC-3-GFP fue provista por la Dra. M. I. Colombo (Instituto de Histología y Embriología / Facultad de Ciencias Médicas U.N.Cuyo-CONICET, Mendoza, Argentina).

## *Vectores de expresión*

### *Clonado de la secuencia de Ub-CRT, Ub-R-CRT en pEGFP-N1*



Para llevar a cabo estudios de CRT en el citoplasma celular en relación con la degradación proteosomal hemos desarrollado vectores de expresión para obtener CRT, R-CRT y la mutante E1V-CRT fusionadas a EGFP. Dado que nuestro estudio se basa en una modificación postraducción que ocurre en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de las proteínas, es necesario que el aminoácido en dicha posición sea: Glu en el caso de CRT





a las recomendaciones del fabricante. Las células ATE1<sup>-/-</sup> y CRT<sup>-/-</sup> fueron transfectadas utilizando Lipofectamina LTX con el reactivo Plus (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### ***Tratamiento con inhibidores***

Los siguientes inhibidores (Sigma-Aldrich) fueron agregados al medio de cultivo cuando se indica (ver resultados): 10  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M lactacistina (LACTA), 50  $\mu$ g/ml cycloheximida (CHX), 2  $\mu$ M thapsigargina (Tg), 50  $\mu$ g/ml rapamicina (RAPA), 50  $\mu$ M cloroquina (CRQ), 2mM ditioneitol (DTT).

### ***Anticuerpo específico contra R-CRT***

Para efectuar estos estudios se contó con un anticuerpo anti-R-CRT policlonal contra el péptido (RDPAIYFK) que contiene una Arg seguida de los 7 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de CRT de rata. Por lo tanto, el anticuerpo es específico para la isoforma arginilada de CRT tanto en los ensayos de inmunofluorescencia como de WB (Decca, Carpio et al. 2007). Si bien el anticuerpo anti-R-CRT es 170 veces más sensible relativo a un anticuerpo comercial anti-CRT, se requieren grandes concentraciones de proteínas en los lisados celulares para la detección de R-CRT endógena por WB ya que se estima que el total de R-CRT en la células es solamente del 2,5% de la CRT citosólica (Decca, Carpio et al. 2007).

### ***Establecimiento de líneas celulares CHO estables***

Las células CHO fueron transfectadas con Ub-CRT-EGFP, Ub-R-CRT-EGFP, o Ub-E1V-CRT-EGFP. Las células transfectadas fueron seleccionadas en presencia de 0,5 mg ml<sup>-1</sup> G418 (Phytotechnology Laboratories). Las células resistentes a G418 fueron tratadas con MG132 durante 15 h y se analizó su fluorescencia mediante "cell sorting" (BD FACS AriaII). Se aislaron las poblaciones de células que expresaron uniformemente CRT-EGFP, R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP, recuperándolas en medio libre de MG132 para permitir la difusión del inhibidor. El procedimiento de cell sorting se repitió dos veces para cada línea celular.

### ***Inmunofluorescencia***

Los cultivos celulares fueron crecidos en vidrios "cover-slip" a 60% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído 3% (p/v) y al 4% p/v de sacarosa en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 0,1% v/v en PBS durante 10

minutos y después se bloqueó con albúmina sérica bovina 5% p/v durante 1 h previa a la adición de los anticuerpos. Las células fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios y durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios. Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS que contenía 1% p/v de albúmina sérica bovina. Los anticuerpos primarios que se utilizaron en los diferentes experimentos fueron: anti-R-CRT policlonal de conejo (1:100) (Eurogentec) para detectar R-CRT (Decca, Carpio et al. 2007; Carpio, Lopez Sambrooks et al. 2010), anti-TIA-1 (C20) policlonal de cabra (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) para TIA-1. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa Fluor 543-conjugado IgG anti-conejo generado en burro (1:1000) (Molecular Probes) y Alexa Fluor 488-conjugados IgG anti-cabra generado en burro (1:1000) (Molecular Probes). La señal de entrecruzamiento de fluorescencia de los anticuerpos fue insignificante. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

### ***Ensayo de vida media en células***

Células estables CHO expresando CRT-EGFP, R-CRT-EGFP o E1V-CRT-EGFP fueron tratadas 12 h con MG132 para acumular dichas proteínas en el citoplasma. Luego, las células fueron lavadas con PBS estéril cuatro veces y cultivadas durante 1 h con medio completo libre de MG132 para permitir la difusión del inhibidor. Después de un lavado adicional las células fueron cultivadas en presencia de CHX o MG132 y cosechadas a diferentes tiempos para la preparación de lisados celulares. Las proteínas contenidas en el lisado celular fueron separadas mediante SDS-PAGE y posteriormente analizadas por Western blot (WB) para la expresión de las proteínas de fusión conteniendo EGFP. Alternativamente, se emplearon células ATE1<sup>-/-</sup> transfectadas transientemente con Ub-CRT-EGFP o Ub-R-CRT-EGFP. Luego de 6 h post-transfección, las células fueron cultivadas en presencia de MG132 durante 18 h para acumular CRT-EGFP o R-CRT-EGFP.

### ***Ensayo de ubiquitinación in vivo***

Con la finalidad de aumentar el contenido celular de Ub y la sensibilidad de su detección, las células CHO se transfectaron con pcDNA3-HA-Ub. Las células CHO se co-transfectaron con HA-Ub y Ub-R-CRT-EGFP o HA-Ub y Ub-E1V-CRT-EGFP. Como control, las células se co-transfectaron con HA-Ub y EGFP o transfección simple con HA-Ub. Luego de 6 h post-transfección las células fueron cultivadas en presencia de MG132 durante 16-18 h. Se prepararon lisados celulares empleando buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% deoxicolato de sodio) suplementado con 5 mM iodoacetamida, 5 mM N-ethylmaleimida, 10 µM MG132 y un

cóctel de inhibidores de proteasas dilución 1:100 (Calbiochem) para inhibir enzimas deubiquitininas, proteosomas, y proteasas respectivamente. Las muestras fueron sonicadas brevemente mantenidas en hielo. El siguiente procedimiento fue realizado a 4°C. Los lisados celulares fueron centrifugados a 13000xg durante 10 min y los sobrenadantes fueron sometidos a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-GFP monoclonal de ratón (IP, 1:400; WB, 1:2500) (Roche Applied Science). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y posteriormente analizadas por WB con los anticuerpos anti-GFP y anti-HA monoclonal de conejo (1:1500) (Cell Signalling) para la detección de las proteínas de fusión inmunoprecipitadas y ubiquitinadas respectivamente.

### ***Inmunoprecipitación***

Todos los pasos fueron realizados a 4°C. Con el propósito de reducir la unión inespecífica de las proteínas, los lisados celulares fueron incubados en un agitador giratorio con 50 µL de proteína G unida a perlas de sefarosa (GE Healthcare) durante 2 h. Las perlas de sefarosa fueron centrifugadas 23 s a 2300 rpm. Para inmunoprecipitar las proteínas de fusión a EGFP, los sobrenadantes fueron incubados con 2 µL de anticuerpo anti-GFP durante una hora. Luego se agregaron 50 µL de proteína G unida a perlas de sefarosa y se incubó 1 h en un agitador giratorio. Los complejos de proteínas-anticuerpo-proteína G unidos a las perlas fueron precipitados mediante centrifugación y lavados dos veces en el buffer de lisis y una vez en un buffer de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,05% deoxicolato de sodio). Luego, los complejos fueron resuspendidos en buffer de muestra Laemmli 2x. Las proteínas contenidas en las muestras de los lisados celulares totales, fracciones inmunoprecipitadas y no inmunoprecipitadas, se separaron mediante SDS-PAGE y posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para analizarse por inmunoblot.

### ***Electroforesis e inmunodetección de proteínas***

La concentración total de proteínas contenidas en los lisados celulares se determinó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE (Laemmli 1970) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Potran BA 83, Whatman) (Towbin, Staehelin et al. 1979). Las membranas fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente en PBS suplementados con 5% de leche descremada. Luego, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en un agitador giratorio con los anticuerpos primarios para detectar las proteínas fusionadas a EGFP (anti-GFP monoclonal de ratón, dilución 1:2500), R-CRT

(anti-R-CRT policlonal de conejo, dilución 1:100),  $\beta$ -Actin (anti- $\beta$ -Actina monoclonal de ratón, dilución, 1:20000, Sigma-Aldrich), HA-Ub (anti-HA monoclonal de conejo, 1:1500, Cell Signalling). Después, las membranas fueron lavadas e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: anticuerpo InfraRedDye-680 anti-ratón de cabra (1:25000, LI-COR Biosciences) y anticuerpo IRD-800 anti-conejo de cabra (1:15000, LI-COR Biosciences). Las proteínas inmunodetectadas fueron visualizadas empleando el sistema de imagen Odyssey IR (LI-COR Biosciences).

### ***Determinación de muerte celular***

Brevemente, luego del tratamiento correspondiente,  $1 \times 10^6$  células por condición fueron lavadas con buffer fosfato y posteriormente incubadas con buffer (10 mM de HEPES / NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) que contenía 1% de yoduro de propidio, para identificar las células muertas. Las muestras se mantuvieron en la oscuridad y se incubaron durante 15 min previos al análisis por citometría de flujo en un citómetro de FACSCantoll (BD Biosciences) utilizando software FlowJo versión 5.7.2 (Tree Star Inc.). Un tubo de muestra se mantuvo sin adición de enzimas como un control negativo. Como control positivo, un tubo de muestra fue incubado con DNAsal (300U/mL) por 10 min. Se recolectaron 50.000 células por condición.

### **Análisis de citometría de flujo de R-CRT en la superficie celular**

Mediante citometría de flujo se detectó la exposición de R-CRT a la superficie celular. Brevemente,  $4 \times 10^5$  células fueron plaqueadas en placas de 3,5 mm y al día siguiente las células fueron tratadas con MG132 (10  $\mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos. Las células fueron cosechadas con EDTA 2 mM, lavadas con PBS frío e incubadas durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo primario anti-R-CRT policlonal de conejo (1:100) en PBS frío, seguido por el lavado e incubación con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo generado en cabra conjugado con Cy5 (1:800) (Molecular Probes). Cada muestra se analizó luego por FACSCantoll citómetro de flujo (BD Biosciences) para identificar las poblaciones de células positivas para R-CRT en la superficie celular y EGFP total (interna y de superficie). Células marcadas sólo con anti-IgG se utilizaron como control de isotipo. Un total de 50.000 células fueron contadas para cada condición. Los datos se registraron en una escala logarítmica y se analizaron por BD software FlowJo versión 5.7.2 (Tree Star Inc.). Los resultados se muestran como gráficos de puntos de fluorescencia representativos de cada experimento, en los cuales se muestra el porcentaje de células positivas sólo para R-CRT, porcentaje de células positivas para EGFP y porcentaje de células doble positivas tanto para R-CRT como para EGFP

vinculante. Luego de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de cuatro experimentos independientes estos valores fueron representados en gráficos de líneas como unidades relativas al control.

### ***Adquisición y análisis de imágenes confocales***

Las imágenes confocales fueron capturadas con un microscopio láser confocal invertido (Olympus FluoView 1000), con objetivo 60x de inmersión en aceite, NA 1,42. Además se estableció una resolución axial nominal  $<0,6 \mu\text{m}$ . La excitación fue con un láser de argón de que emite a 488 nm o con láser de helio/neón que tiene emisión a 543 nm o con un láser que emite a 405 nm. Las emisiones fueron recolectadas a través de un filtro de paso de 505 a 530 nm para la emisión de EGFP o un filtro de paso de 560 a 615 nm para la emisión del Alexa 543 o un filtro de paso de banda 450/50 nm para la emisión de DAPI. En la detección de la señal de fluorescencia se empleó el modo “photoncounting”. Para garantizar la linealidad de las mediciones, las intensidades de los láseres y las ganancias de los detectores fueron configuradas de tal modo que los píxeles más brillantes no saturen. Esta configuración se mantuvo para la adquisición de todas las imágenes de un mismo experimento. Se incluyeron un mínimo de 200 células por condición experimental. El software Fiji fue usado para medir intensidad de fluorescencia y calcular la fluorescencia total por célula (FTC), con correcciones para el “background” de fluorescencia.

### ***Análisis estadístico***

Donde se indica, las diferencias significativas fueron probadas mediante los test estadísticos de ANOVA de una o dos vías según corresponda el caso, utilizado los programas de análisis estadísticos GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software) e InfoStat (para la aplicación de modelos lineales mixtos utilizando el motor de cálculo de R). Como test a posteriori en el análisis de ANOVA de una vía se utilizó el test de comparación múltiple de Newman-Keuls, mientras que para el análisis de ANOVA de dos vías se usó el test de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideró diferencia significativa  $P < 0,05$ . Las vidas medias de las proteínas fueron calculadas empleando un modelo de regresión no-lineal: análisis de decaimiento de una fase.

# REFERENCIAS

## REFERENCIAS

- Afshar, N., B. E. Black and B. M. Paschal (2005). "Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol." Mol Cell Biol **25**(20): 8844-8853.
- Alvarez-Castelao, B., I. Martin-Guerrero, A. Garcia-Orad and J. G. Castano (2009). "Cytomegalovirus promoter up-regulation is the major cause of increased protein levels of unstable reporter proteins after treatment of living cells with proteasome inhibitors." J Biol Chem **284**(41): 28253-28262.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Stressful initiations." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3227-3234.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." J Cell Biol **172**(6): 803-808.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." Trends Biochem Sci **33**(3): 141-150.
- Andrin, C., E. F. Corbett, S. Johnson, M. Dabrowska, I. D. Campbell, P. Eggleton, M. Opas and M. Michalak (2000). "Expression and purification of mammalian calreticulin in *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif **20**(2): 207-215.
- Arimoto, K., H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, H. Saito and M. Takekawa (2008). "Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways." Nat Cell Biol **10**(11): 1324-1332.
- Arnaudeau, S., M. Frieden, K. Nakamura, C. Castelbou, M. Michalak and N. Demareux (2002). "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria." J Biol Chem **277**(48): 46696-46705.
- Asher, G., Z. Bercovich, P. Tsvetkov, Y. Shaul and C. Kahana (2005). "20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1." Mol Cell **17**(5): 645-655.
- Bachmair, A., D. Finley and A. Varshavsky (1986). "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue." Science **234**(4773): 179-186.
- Baez, M. V. and G. L. Boccaccio (2005). "Mammalian Smaug is a translational repressor that forms cytoplasmic foci similar to stress granules." J Biol Chem **280**(52): 43131-43140.
- Baksh, S. and M. Michalak (1991). "Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca<sup>2+</sup> binding domains." J Biol Chem **266**(32): 21458-21465.
- Baksh, S., C. Spamer, C. Heilmann and M. Michalak (1995). "Identification of the Zn<sup>2+</sup> binding region in calreticulin." FEBS Lett **376**(1-2): 53-57.
- Balog, E. M., E. L. Lockamy, D. D. Thomas and D. A. Ferrington (2009). "Site-specific methionine oxidation initiates calmodulin degradation by the 20S proteasome." Biochemistry **48**(13): 3005-3016.
- Balzi, E., M. Choder, W. N. Chen, A. Varshavsky and A. Goffeau (1990). "Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **265**(13): 7464-7471.
- Bardos, J. I. and M. Ashcroft (2005). "Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network." Biochim Biophys Acta **1755**(2): 107-120.
- Barra, H. S., C. A. Arce, J. A. Rodriguez and R. Caputto (1973). "Uncorporation of phenylalanine as a single unit into rat brain protein: reciprocal inhibition by phenylalanine and tyrosine of their respective incorporations." J Neurochem **21**(5): 1241-1251.
- Barra, H. S., J. A. Rodriguez, C. A. Arce and R. Caputto (1973). "A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins ( 14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and ( 14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system." J Neurochem **20**(1): 97-108.
- Bartel, B., I. Wunning and A. Varshavsky (1990). "The recognition component of the N-end rule pathway." EMBO J **9**(10): 3179-3189.
- Basbous, J., D. Chalbos, R. Hipskind, I. Jariel-Encontre and M. Piechaczyk (2007). "Ubiquitin-independent proteasomal degradation of Fra-1 is antagonized by Erk1/2

pathway-mediated phosphorylation of a unique C-terminal destabilizer." Mol Cell Biol **27**(11): 3936-3950.

Baugh, J. M., E. G. Viktorova and E. V. Pilipenko (2009). "Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination." J Mol Biol **386**(3): 814-827.

Bischoff, G., R. Bischoff, E. Birch-Hirschfeld, U. Gromann, S. Lindau, W. V. Meister, A. B. S. de, C. Bohley and S. Hoffmann (1998). "DNA-drug interaction measurements using surface plasmon resonance." J Biomol Struct Dyn **16**(2): 187-203.

Bogyo, M. and E. W. Wang (2002). "Proteasome inhibitors: complex tools for a complex enzyme." Curr Top Microbiol Immunol **268**: 185-208.

Bohley, P., J. Kopitz and G. Adam (1988). "Arginylation, surface hydrophobicity and degradation of cytosol proteins from rat hepatocytes." Adv Exp Med Biol **240**: 159-169.

Bohley, P., J. Kopitz and G. Adam (1988). "Surface hydrophobicity, arginylation and degradation of cytosol proteins from rat hepatocytes." Biol Chem Hoppe Seyler **369 Suppl**: 307-310.

Bohley, P., J. Kopitz, G. Adam, B. Rist, F. von Appen and S. Urban (1991). "Post-translational arginylation and intracellular proteolysis." Biomed Biochim Acta **50**(4-6): 343-346.

Bongiovanni, G., G. D. Fidelio, H. S. Barra and M. E. Hallak (1995). "The post-translational incorporation of arginine into a beta-amyloid peptide increases the probability of alpha-helix formation." Neuroreport **7**(1): 326-328.

Bongiovanni, G., S. Fissolo, H. S. Barra and M. E. Hallak (1999). "Posttranslational arginylation of soluble rat brain proteins after whole body hyperthermia." J Neurosci Res **56**(1): 85-92.

Bossis, G., P. Ferrara, C. Acquaviva, I. Jariel-Encontre and M. Piechaczyk (2003). "c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitylation in vivo." Mol Cell Biol **23**(20): 7425-7436.

Brockmeier, A., U. Brockmeier and D. B. Williams (2009). "Distinct contributions of the lectin and arm domains of calnexin to its molecular chaperone function." J Biol Chem **284**(6): 3433-3444.

Brower, C. S., K. I. Piatkov and A. Varshavsky (2013). "Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway." Mol Cell **50**(2): 161-171.

Brower, C. S. and A. Varshavsky (2009). "Ablation of arginylation in the mouse N-end rule pathway: loss of fat, higher metabolic rate, damaged spermatogenesis, and neurological perturbations." PLoS One **4**(11): e7757.

Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Mol Cell **36**(6): 932-941.

Burns, K., B. Duggan, E. A. Atkinson, K. S. Famulski, M. Nemer, R. C. Bleackley and M. Michalak (1994). "Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor." Nature **367**(6462): 476-480.

Bush, K. T., A. L. Goldberg and S. K. Nigam (1997). "Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance." J Biol Chem **272**(14): 9086-9092.

Caramelo, J. J. and A. J. Parodi (2008). "Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles." J Biol Chem **283**(16): 10221-10225.

Carpio, M. A., M. B. Decca, C. Lopez Sambrooks, E. S. Durand, G. G. Montich and M. E. Hallak (2013). "Calreticulin-dimerization induced by post-translational arginylation is critical for stress granules scaffolding." Int J Biochem Cell Biol **45**(7): 1223-1235.

Carpio, M. A., C. Lopez Sambrooks, E. S. Durand and M. E. Hallak (2010). "The arginylation-dependent association of calreticulin with stress granules is regulated by calcium." Biochem J **429**(1): 63-72.

Ceman, S., W. T. O'Donnell, M. Reed, S. Patton, J. Pohl and S. T. Warren (2003). "Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes." Hum Mol Genet **12**(24): 3295-3305.

Ciechanover, A., S. Ferber, D. Ganoth, S. Elias, A. Hershko and S. Arfin (1988). "Purification and characterization of arginyl-tRNA-protein transferase from rabbit reticulocytes. Its involvement in post-translational modification and degradation of acidic NH<sub>2</sub> termini substrates of the ubiquitin pathway." *J Biol Chem* **263**(23): 11155-11167.

Ciechanover, A., H. Gonen, S. Elias and A. Mayer (1990). "Degradation of proteins by the ubiquitin-mediated proteolytic pathway." *New Biol* **2**(3): 227-234.

Clark, R. A., S. L. Li, D. W. Pearson, K. G. Leidal, J. R. Clark, G. M. Denning, R. Reddick, K. H. Krause and A. J. Valente (2002). "Regulation of calreticulin expression during induction of differentiation in human myeloid cells. Evidence for remodeling of the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **277**(35): 32369-32378.

Coppolino, M. G., M. J. Woodside, N. Demaurex, S. Grinstein, R. St-Arnaud and S. Dedhar (1997). "Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion." *Nature* **386**(6627): 843-847.

Cristina Castaneda-Patlan, M., R. Razo-Paredes, R. Carrisoza-Gaytan, L. Gonzalez-Mariscal and M. Robles-Flores (2010). "Protein kinase C is involved in the regulation of several calreticulin posttranslational modifications." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(1): 120-131.

Chouquet, A., H. Paidassi, W. L. Ling, P. Frachet, G. Houen, G. J. Arlaud and C. Gaboriaud (2011). "X-ray structure of the human calreticulin globular domain reveals a peptide-binding area and suggests a multi-molecular mechanism." *PLoS One* **6**(3): e17886.

Dancourt, J. and C. Barlowe (2010). "Protein sorting receptors in the early secretory pathway." *Annu Rev Biochem* **79**: 777-802.

Dantuma, N. P., K. Lindsten, R. Glas, M. Jellne and M. G. Masucci (2000). "Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells." *Nat Biotechnol* **18**(5): 538-543.

Davies, K. J. (2001). "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." *Biochimie* **83**(3-4): 301-310.

Davydov, I. V. and A. Varshavsky (2000). "RGS4 is arginylated and degraded by the N-end rule pathway in vitro." *J Biol Chem* **275**(30): 22931-22941.

de Bie, P. and A. Ciechanover (2011). "Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms." *Cell Death Differ* **18**(9): 1393-1402.

Decca, M. B., C. Bosc, S. Luche, S. Brugiere, D. Job, T. Rabilloud, J. Garin and M. E. Hallak (2006). "Protein arginylation in rat brain cytosol: a proteomic analysis." *Neurochem Res* **31**(3): 401-409.

Decca, M. B., M. A. Carpio, C. Bosc, M. R. Galiano, D. Job, A. Andrieux and M. E. Hallak (2007). "Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules." *J Biol Chem* **282**(11): 8237-8245.

Dedhar, S., P. S. Rennie, M. Shago, C. Y. Hagesteijn, H. Yang, J. Filmus, R. G. Hawley, N. Bruchovsky, H. Cheng, R. J. Matusik and et al. (1994). "Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin." *Nature* **367**(6462): 480-483.

DeMartino, G. N., C. R. Moomaw, O. P. Zagnitko, R. J. Proske, M. Chu-Ping, S. J. Afendis, J. C. Swaffield and C. A. Slaughter (1994). "PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family." *J Biol Chem* **269**(33): 20878-20884.

Denning, G. M., K. G. Leidal, V. A. Holst, S. S. Iyer, D. W. Pearson, J. R. Clark, W. M. Nauseef and R. A. Clark (1997). "Calreticulin biosynthesis and processing in human myeloid cells: demonstration of signal peptide cleavage and N-glycosylation." *Blood* **90**(1): 372-381.

Deveraux, Q., C. Jensen and M. Rechsteiner (1995). "Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats." *J Biol Chem* **270**(40): 23726-23729.

Ding, W. X. and X. M. Yin (2008). "Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome." Autophagy **4**(2): 141-150.

Donnelly, S., W. Roake, S. Brown, P. Young, H. Naik, P. Wordsworth, D. A. Isenberg, K. B. Reid and P. Eggleton (2006). "Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(5): 1543-1556.

Dunker, A. K., C. J. Brown, J. D. Lawson, L. M. Iakoucheva and Z. Obradovic (2002). "Intrinsic disorder and protein function." Biochemistry **41**(21): 6573-6582.

Dunker, A. K., J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner and Z. Obradovic (2001). "Intrinsically disordered protein." J Mol Graph Model **19**(1): 26-59.

Elias, S. and A. Ciechanover (1990). "Post-translational addition of an arginine moiety to acidic NH<sub>2</sub> termini of proteins is required for their recognition by ubiquitin-protein ligase." J Biol Chem **265**(26): 15511-15517.

Ellgaard, L., R. Riek, T. Herrmann, P. Guntert, D. Braun, A. Helenius and K. Wuthrich (2001). "NMR structure of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3133-3138.

Erales, J. and P. Coffino (2013). "Ubiquitin-independent proteasomal degradation." Biochim Biophys Acta.

Eriste, E., A. Norberg, D. Nepomuceno, C. Kuei, F. Kamme, D. T. Tran, K. Strupat, H. Jornvall, C. Liu, T. W. Lovenberg and R. Sillard (2005). "A novel form of neurotensin post-translationally modified by arginylation." J Biol Chem **280**(42): 35089-35097.

Finley, D. (2009). "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annu Rev Biochem **78**: 477-513.

Fissolo, S., G. Bongiovanni, M. B. Decca and M. E. Hallak (2000). "Post-translational arginylation of proteins in cultured cells." Neurochem Res **25**(1): 71-76.

Fournier, M. J., C. Gareau and R. Mazroui (2010). "The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules." Cancer Cell Int **10**: 12.

Freitas Junior, J. O., S. L. Berti, J. G. Bonfa, M. S. Speranza, P. P. Gandolphi and H. L. Bongiovani (1999). "Cutting balloon angioplasty for intrastent restenosis treatment." Arq Bras Cardiol **72**(5): 615-620.

Frickel, E. M., R. Riek, I. Jelesarov, A. Helenius, K. Wuthrich and L. Ellgaard (2002). "TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1954-1959.

Gao, B., R. Adhikari, M. Howarth, K. Nakamura, M. C. Gold, A. B. Hill, R. Knee, M. Michalak and T. Elliott (2002). "Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin." Immunity **16**(1): 99-109.

Gao, Z., N. Gammoh, P. M. Wong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and X. Jiang (2010). "Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome." Autophagy **6**(1): 126-137.

Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak and P. M. Henson (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-334.

Gareau, C., M. J. Fournier, C. Fillion, L. Coudert, D. Martel, Y. Labelle and R. Mazroui (2011). "p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis." PLoS One **6**(5): e20254.

Ghebrehiwet, B., J. Jesty and E. I. Peerschke (2002). "gC1q-R/p33: structure-function predictions from the crystal structure." Immunobiology **205**(4-5): 421-432.

Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L. M. Dember and P. Anderson (2004). "Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1." Mol Biol Cell **15**(12): 5383-5398.

Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* **82**(2): 373-428.

Glickman, M. H., D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried and D. Finley (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* **94**(5): 615-623.

Goicoechea, S., M. A. Pallero, P. Eggleton, M. Michalak and J. E. Murphy-Ullrich (2002). "The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin." *J Biol Chem* **277**(40): 37219-37228.

Gold, L. I., P. Eggleton, M. T. Sweetwyne, L. B. Van Duyn, M. R. Greives, S. M. Naylor, M. Michalak and J. E. Murphy-Ullrich (2010). "Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease." *FASEB J* **24**(3): 665-683.

Gold, L. I., M. Rahman, K. M. Blechman, M. R. Greives, S. Churgin, J. Michaels, M. J. Callaghan, N. L. Cardwell, A. C. Pollins, M. Michalak, J. W. Siebert, J. P. Levine, G. C. Gurtner, L. B. Nannay, R. D. Galiano and C. L. Cadacio (2006). "Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects." *J Investig Dermatol Symp Proc* **11**(1): 57-65.

Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong (2003). "The calpain system." *Physiol Rev* **83**(3): 731-801.

Gonda, D. K., A. Bachmair, I. Wunning, J. W. Tobias, W. S. Lane and A. Varshavsky (1989). "Universality and structure of the N-end rule." *J Biol Chem* **264**(28): 16700-16712.

Graciet, E., R. G. Hu, K. Piatkov, J. H. Rhee, E. M. Schwarz and A. Varshavsky (2006). "Aminoacyl-transferases and the N-end rule pathway of prokaryotic/eukaryotic specificity in a human pathogen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3078-3083.

Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman and D. Finley (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-1067.

Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik and R. Huber (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." *Nature* **386**(6624): 463-471.

Groll, M. and R. Huber (2004). "Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach." *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 33-44.

Guo, L., K. Nakamura, J. Lynch, M. Opas, E. N. Olson, L. B. Agellon and M. Michalak (2002). "Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse." *J Biol Chem* **277**(52): 50776-50779.

Guo, N. and Z. Peng (2013). "MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells." *Asia Pac J Clin Oncol* **9**(1): 6-11.

Hallak, M. E., H. S. Barra and R. Caputto (1985). "Posttranslational incorporation of [<sup>14</sup>C]arginine into rat brain proteins. Acceptor changes during development." *J Neurochem* **44**(3): 665-669.

Hallak, M. E., G. Bongiovanni and H. S. Barra (1991). "The posttranslational arginylation of proteins in different regions of the rat brain." *J Neurochem* **57**(5): 1735-1739.

Hallak, M. E., J. A. Rodriguez, H. S. Barra and R. Caputto (1977). "Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin." *FEBS Lett* **73**(2): 147-150.

Hamilton, M. H., L. A. Cook, T. R. McRackan, K. L. Schey and J. D. Hildebrandt (2003). "Gamma 2 subunit of G protein heterotrimer is an N-end rule ubiquitylation substrate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5081-5086.

Hampton, R. Y. and T. Sommer (2012). "Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation." *Curr Opin Cell Biol* **24**(4): 460-466.

Harvey, D. J. (2005). "Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry." *Expert Rev Proteomics* **2**(1): 87-101.

Hattori, T., N. Ohoka, Y. Inoue, H. Hayashi and K. Onozaki (2003). "C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer." Oncogene **22**(9): 1273-1280.

Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." Physiol Rev **87**(4): 1377-1408.

Helliwell, S. B., S. Losko and C. A. Kaiser (2001). "Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease." J Cell Biol **153**(4): 649-662.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1986). "The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **33**: 19-56, 301.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas and I. A. Rose (1980). "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 1783-1786.

Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." Trends Cell Biol **9**(3): 107-112.

Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-172.

Higuchi, R., B. Krummel and R. K. Saiki (1988). "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions." Nucleic Acids Res **16**(15): 7351-7367.

Hitchcock, A. L., K. Auld, S. P. Gygi and P. A. Silver (2003). "A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12735-12740.

Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-59.

Hojrup, P., P. Roepstorff and G. Høuen (2001). "Human placental calreticulin characterization of domain structure and post-translational modifications." Eur J Biochem **268**(9): 2558-2565.

Holaska, J. M., B. E. Black, D. C. Love, J. A. Hanover, J. Leszyk and B. M. Paschal (2001). "Calreticulin is a receptor for nuclear export." J Cell Biol **152**(1): 127-140.

Holaska, J. M., B. E. Black, F. Rastinejad and B. M. Paschal (2002). "Ca<sup>2+</sup>-dependent nuclear export mediated by calreticulin." Mol Cell Biol **22**(17): 6286-6297.

Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, P. Szyniarowski, M. Campanella, G. Szabadkai, T. Farkas, K. Bianchi, N. Fehrenbacher, F. Elling, R. Rizzuto, I. S. Mathiasen and M. Jaattela (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." Mol Cell **25**(2): 193-205.

Hu, R. G., C. S. Brower, H. Wang, I. V. Davydov, J. Sheng, J. Zhou, Y. T. Kwon and A. Varshavsky (2006). "Arginyltransferase, its specificity, putative substrates, bidirectional promoter, and splicing-derived isoforms." J Biol Chem **281**(43): 32559-32573.

Huang, S. H., L. X. Zhao, C. Hong, C. C. Duo, B. N. Guo, L. J. Zhang, Z. Gong, S. D. Xiong, F. Y. Gong and X. M. Gao (2013). "Self-oligomerization is essential for enhanced immunological activities of soluble recombinant calreticulin." PLoS One **8**(6): e64951.

Iakova, P., G. L. Wang, L. Timchenko, M. Michalak, O. M. Pereira-Smith, J. R. Smith and N. A. Timchenko (2004). "Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate." EMBO J **23**(2): 406-417.

Ihara, Y., M. F. Cohen-Doyle, Y. Saito and D. B. Williams (1999). "Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro." Mol Cell **4**(3): 331-341.

Jariel-Encontre, I., G. Bossis and M. Piechaczyk (2008). "Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome." Biochim Biophys Acta **1786**(2): 153-177.

Jentsch, S., W. Seufert and H. P. Hauser (1991). "Genetic analysis of the ubiquitin system." Biochim Biophys Acta **1089**(2): 127-139.

Jin, J., X. Li, S. P. Gygi and J. W. Harper (2007). "Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging." *Nature* **447**(7148): 1135-1138.

Joazeiro, C. A. and T. Hunter (2000). "Biochemistry. Ubiquitination--more than two to tango." *Science* **289**(5487): 2061-2062.

Jorgensen, C. S., L. R. Ryder, A. Steino, P. Hojrup, J. Hansen, N. H. Beyer, N. H. Heegaard and G. Houen (2003). "Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin." *Eur J Biochem* **270**(20): 4140-4148.

Ju, D. and Y. Xie (2004). "Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent." *J Biol Chem* **279**(23): 23851-23854.

Jung, T., B. Catalgol and T. Grune (2009). "The proteasomal system." *Mol Aspects Med* **30**(4): 191-296.

Jung, T. and T. Grune (2008). "The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins." *IUBMB Life* **60**(11): 743-752.

Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing." *EMBO J* **19**(21): 5720-5728.

Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." *Biopolymers* **22**(12): 2577-2637.

Kaji, A., H. Kaji and G. D. Novelli (1963). "A soluble amino acid incorporating system." *Biochem Biophys Res Commun* **10**: 406-409.

Kaji, H. (1976). "Amino-terminal arginylation of chromosomal proteins by arginyl-tRNA." *Biochemistry* **15**(23): 5121-5125.

Kaji, H., H. Hara and K. D. Lamon (1980). "Fixation of cellular aging processes by SV40 virus transformation." *Mech Ageing Dev* **12**(2): 197-209.

Kaji, H., G. D. Novelli and A. Kaji (1963). "A Soluble Amino Acid-Incorporating System from Rat Liver." *Biochim Biophys Acta* **76**: 474-477.

Kalejta, R. F., J. T. Bechtel and T. Shenk (2003). "Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors." *Mol Cell Biol* **23**(6): 1885-1895.

Kapoor, M., L. Ellgaard, J. Gopalakrishnapai, C. Schirra, E. Gemma, S. Oscarson, A. Helenius and A. Surolia (2004). "Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition." *Biochemistry* **43**(1): 97-106.

Karakozova, M., M. Kozak, C. C. Wong, A. O. Bailey, J. R. Yates, 3rd, A. Mogilner, H. Zebroski and A. Kashina (2006). "Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility." *Science* **313**(5784): 192-196.

Kawai, T., J. Fan, K. Mazan-Mamczarz and M. Gorospe (2004). "Global mRNA stabilization preferentially linked to translational repression during the endoplasmic reticulum stress response." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6773-6787.

Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I. J. Miller, J. Stahl and P. Anderson (2002). "Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules." *Mol Biol Cell* **13**(1): 195-210.

Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D. E. Golan and P. Anderson (2000). "Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules." *J Cell Biol* **151**(6): 1257-1268.

Kedersha, N., P. Ivanov and P. Anderson (2013). "Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase?" *Trends Biochem Sci* **38**(10): 494-506.

Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan and P. Anderson (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." *J Cell Biol* **169**(6): 871-884.

Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller and P. Anderson (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." *J Cell Biol* **147**(7): 1431-1442.

Kettern, N., M. Dreiseidler, R. Tawo and J. Hohfeld (2010). "Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction." *Biol Chem* **391**(5): 481-489.

Khor, B., A. L. Bredemeyer, C. Y. Huang, I. R. Turnbull, R. Evans, L. B. Maggi, Jr., J. M. White, L. M. Walker, K. Carnes, R. A. Hess and B. P. Sleckman (2006). "Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis." *Mol Cell Biol* **26**(8): 2999-3007.

Kim, K. M., P. K. Kim, Y. G. Kwon, S. K. Bai, W. D. Nam and Y. M. Kim (2002). "Regulation of apoptosis by nitrosative stress." *J Biochem Mol Biol* **35**(1): 127-133.

Kobayashi, S., S. Uchiyama, T. Sone, M. Noda, L. Lin, H. Mizuno, S. Matsunaga and K. Fukui (2006). "Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes." *Cytogenet Genome Res* **115**(1): 10-15.

Kohler, A., P. Cascio, D. S. Leggett, K. M. Woo, A. L. Goldberg and D. Finley (2001). "The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release." *Mol Cell* **7**(6): 1143-1152.

Kong, X., Z. Lin, D. Liang, D. Fath, N. Sang and J. Caro (2006). "Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2019-2028.

Kopitz, J., B. Rist and P. Bohley (1990). "Post-translational arginylation of ornithine decarboxylase from rat hepatocytes." *Biochem J* **267**(2): 343-348.

Kozlov, G., S. Bastos-Aristizabal, P. Maattanen, A. Rosenauer, F. Zheng, A. Killikelly, J. F. Trempe, D. Y. Thomas and K. Gehring (2010). "Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain." *J Biol Chem* **285**(46): 35551-35557.

Kozlov, G., C. L. Pocanschi, A. Rosenauer, S. Bastos-Aristizabal, A. Gorelik, D. B. Williams and K. Gehring (2010). "Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin." *J Biol Chem* **285**(49): 38612-38620.

Kurosaka, S., N. A. Leu, F. Zhang, R. Bunte, S. Saha, J. Wang, C. Guo, W. He and A. Kashina (2010). "Arginylation-dependent neural crest cell migration is essential for mouse development." *PLoS Genet* **6**(3): e1000878.

Kwon, M. S., C. S. Park, K. Choi, J. Ahnn, J. I. Kim, S. H. Eom, S. J. Kaufman and W. K. Song (2000). "Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling." *Mol Biol Cell* **11**(4): 1433-1443.

Kwon, S., Y. Zhang and P. Matthias (2007). "The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response." *Genes Dev* **21**(24): 3381-3394.

Kwon, Y. T., A. S. Kashina, I. V. Davydov, R. G. Hu, J. Y. An, J. W. Seo, F. Du and A. Varshavsky (2002). "An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development." *Science* **297**(5578): 96-99.

Kwon, Y. T., A. S. Kashina and A. Varshavsky (1999). "Alternative splicing results in differential expression, activity, and localization of the two forms of arginyl-tRNA-protein transferase, a component of the N-end rule pathway." *Mol Cell Biol* **19**(1): 182-193.

Labriola, C. A., I. L. Conte, M. Lopez Medus, A. J. Parodi and J. J. Caramelo (2010). "Endoplasmic reticulum calcium regulates the retrotranslocation of Trypanosoma cruzi calreticulin to the cytosol." *PLoS One* **5**(10).

Labriola, C. A., A. M. Giraldo, A. J. Parodi and J. J. Caramelo (2011). "Functional cooperation between BiP and calreticulin in the folding maturation of a glycoprotein in Trypanosoma cruzi." *Mol Biochem Parasitol* **175**(2): 112-117.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lamon, K. D. and H. Kaji (1980). "Arginyl-tRNA transferase activity as a marker of cellular aging in peripheral rat tissues." *Exp Gerontol* **15**(1): 53-64.

Lamon, K. D., W. H. Vogel and H. Kaji (1980). "Stress-induced increases in rat brain arginyl-tRNA transferase activity." *Brain Res* **190**(1): 285-287.

Leach, M. R., M. F. Cohen-Doyle, D. Y. Thomas and D. B. Williams (2002). "Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin." J Biol Chem **277**(33): 29686-29697.

Leboucher, G. P., Y. C. Tsai, M. Yang, K. C. Shaw, M. Zhou, T. D. Veenstra, M. H. Glickman and A. M. Weissman (2012). "Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis." Mol Cell **47**(4): 547-557.

Lee, M. J., T. Tasaki, K. Moroi, J. Y. An, S. Kimura, I. V. Davydov and Y. T. Kwon (2005). "RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15030-15035.

Leu, N. A., S. Kurosaka and A. Kashina (2009). "Conditional Tek promoter-driven deletion of arginyltransferase in the germ line causes defects in gametogenesis and early embryonic lethality in mice." PLoS One **4**(11): e7734.

Leung, A. K., J. M. Calabrese and P. A. Sharp (2006). "Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18125-18130.

Levy, F., N. Johnsson, T. Rumenapf and A. Varshavsky (1996). "Using ubiquitin to follow the metabolic fate of a protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4907-4912.

Li, X. and P. Coffino (1994). "Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase." Mol Cell Biol **14**(1): 87-92.

Li, X., Z. Obradovic, C. J. Brown, E. C. Garner and A. K. Dunker (2000). "Comparing predictors of disordered protein." Genome Inform Ser Workshop Genome Inform **11**: 172-184.

Li, Z., W. F. Stafford and M. Bouvier (2001). "The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability." Biochemistry **40**(37): 11193-11201.

Lian, L., A. Suzuki, V. Hayes, S. Saha, X. Han, T. Xu, J. R. Yates, M. Poncz, A. Kashina and C. S. Abrams (2013). "Loss of ATE1-mediated arginylation leads to impaired platelet myosin phosphorylation, clot retraction, and in vivo thrombosis formation." Haematologica.

Lim, S., W. Chang, B. K. Lee, H. Song, J. H. Hong, S. Lee, B. W. Song, H. J. Kim, M. J. Cha, Y. Jang, N. Chung, S. Y. Choi and K. C. Hwang (2008). "Enhanced calreticulin expression promotes calcium-dependent apoptosis in postnatal cardiomyocytes." Mol Cells **25**(3): 390-396.

Linding, R., L. J. Jensen, F. Diella, P. Bork, T. J. Gibson and R. B. Russell (2003). "Protein disorder prediction: implications for structural proteomics." Structure **11**(11): 1453-1459.

Liu, C. W., X. Li, D. Thompson, K. Wooding, T. L. Chang, Z. Tang, H. Yu, P. J. Thomas and G. N. DeMartino (2006). "ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome." Mol Cell **24**(1): 39-50.

Liu, C. W., L. Millen, T. B. Roman, H. Xiong, H. F. Gilbert, R. Noiva, G. N. DeMartino and P. J. Thomas (2002). "Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome." J Biol Chem **277**(30): 26815-26820.

Lodish, H. F. and N. Kong (1993). "The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **268**(27): 20598-20605.

Lopez Sambrooks, C., M. A. Carpio and M. E. Hallak (2012). "Arginylated calreticulin at plasma membrane increases susceptibility of cells to apoptosis." J Biol Chem **287**(26): 22043-22054.

Lowe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister and R. Huber (1995). "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution." Science **268**(5210): 533-539.

Manahan, C. O. and A. A. App (1973). "An arginyl-transfer ribonucleic Acid protein transferase from cereal embryos." Plant Physiol **52**(1): 13-16.

McIlhinney, R. A. (1990). "The fats of life: the importance and function of protein acylation." Trends Biochem Sci **15**(10): 387-391.

Melo, S. P., A. Yoshida and F. G. Berger (2010). "Functional dissection of the N-terminal degron of human thymidylate synthase." Biochem J **432**(1): 217-226.

Menendez-Benito, V., L. G. Verhoef, M. G. Masucci and N. P. Dantuma (2005). "Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system." Hum Mol Genet **14**(19): 2787-2799.

Mesaeli, N., K. Nakamura, E. Zvaritch, P. Dickie, E. Dziak, K. H. Krause, M. Opas, D. H. MacLennan and M. Michalak (1999). "Calreticulin is essential for cardiac development." J Cell Biol **144**(5): 857-868.

Michalak, M., J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold and M. Opas (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem J **417**(3): 651-666.

Miller, C. L. and D. J. Pintel (2001). "The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation." Virology **285**(2): 346-355.

Mokas, S., J. R. Mills, C. Garreau, M. J. Fournier, F. Robert, P. Arya, R. J. Kaufman, J. Pelletier and R. Mazroui (2009). "Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition." Mol Biol Cell **20**(11): 2673-2683.

Morandell, S., T. Stasyk, K. Grosstessner-Hain, E. Roitinger, K. Mechtler, G. K. Bonn and L. A. Huber (2006). "Phosphoproteomics strategies for the functional analysis of signal transduction." Proteomics **6**(14): 4047-4056.

Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka and A. Ichihara (1992). "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination." Nature **360**(6404): 597-599.

Nakamura, K., A. Zuppini, S. Arnaudeau, J. Lynch, I. Ahsan, R. Krause, S. Papp, H. De Smedt, J. B. Parys, W. Muller-Esterl, D. P. Lew, K. H. Krause, N. Demaurex, M. Opas and M. Michalak (2001). "Functional specialization of calreticulin domains." J Cell Biol **154**(5): 961-972.

Nanney, L. B., C. D. Woodrell, M. R. Greives, N. L. Cardwell, A. C. Pollins, T. A. Bancroft, A. Chesser, M. Michalak, M. Rahman, J. W. Siebert and L. I. Gold (2008). "Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects." Am J Pathol **173**(3): 610-630.

Nelson, J. E., A. Loukissa, C. Altschuller-Felberg, J. J. Monaco, J. T. Fallon and C. Cardozo (2000). "Up-regulation of the proteasome subunit LMP7 in tissues of endotoxemic rats." J Lab Clin Med **135**(4): 324-331.

Nemoto, T. K., T. Ono and K. Tanaka (2001). "Substrate-binding characteristics of proteins in the 90 kDa heat shock protein family." Biochem J **354**(Pt 3): 663-670.

Neutzner, M. and A. Neutzner (2012). "Enzymes of ubiquitination and deubiquitination." Essays Biochem **52**: 37-50.

Nguyen, T. O., J. D. Capra and R. D. Sontheimer (1996). "Calreticulin is transcriptionally upregulated by heat shock, calcium and heavy metals." Mol Immunol **33**(4-5): 379-386.

Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med **13**(1): 54-61.

Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok and P. M. Henson (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." J Exp Med **194**(6): 781-795.

Ohn, T. and P. Anderson (2010). "The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(3): 486-493.

Ohn, T., N. Kedersha, T. Hickman, S. Tisdale and P. Anderson (2008). "A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly." Nat Cell Biol **10**(10): 1224-1231.

Olkku, A. and A. Mahonen (2009). "Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells." Bone **44**(4): 555-565.

Orlowski, M. and S. Wilk (2003). "Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome." Arch Biochem Biophys **415**(1): 1-5.

Orr, A. W., C. A. Elzie, D. F. Kucik and J. E. Murphy-Ullrich (2003). "Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2917-2927.

Orr, A. W., M. A. Pallero and J. E. Murphy-Ullrich (2002). "Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation." J Biol Chem **277**(23): 20453-20460.

Orr, A. W., C. E. Pedraza, M. A. Pallero, C. A. Elzie, S. Goicoechea, D. K. Strickland and J. E. Murphy-Ullrich (2003). "Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly." J Cell Biol **161**(6): 1179-1189.

Ostwald, T. J. and D. H. MacLennan (1974). "Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **249**(3): 974-979.

Ou, W. J., J. J. Bergeron, Y. Li, C. Y. Kang and D. Y. Thomas (1995). "Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca<sup>2+</sup>." J Biol Chem **270**(30): 18051-18059.

Park, E. C., D. Finley and J. W. Szostak (1992). "A strategy for the generation of conditional mutations by protein destabilization." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1249-1252.

Pena, M. M., S. P. Melo, Y. Y. Xing, K. White, K. W. Barbour and F. G. Berger (2009). "The intrinsically disordered N-terminal domain of thymidylate synthase targets the enzyme to the ubiquitin-independent proteasomal degradation pathway." J Biol Chem **284**(46): 31597-31607.

Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley and S. P. Gygi (2003). "A proteomics approach to understanding protein ubiquitination." Nat Biotechnol **21**(8): 921-926.

Perrone, L., G. Tell and R. Di Lauro (1999). "Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor-1 by binding to its homeodomain." J Biol Chem **274**(8): 4640-4645.

Petris, G., L. Vecchi, M. Bestagno and O. R. Burrone (2011). "Efficient detection of proteins retro-translocated from the ER to the cytosol by in vivo biotinylation." PLoS One **6**(8): e23712.

Piatkov, K. I., C. S. Brower and A. Varshavsky (2012). "The N-end rule pathway counteracts cell death by destroying proapoptotic protein fragments." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(27): E1839-1847.

Piatkov, K. I., L. Colnaghi, M. Bekes, A. Varshavsky and T. T. Huang (2012). "The auto-generated fragment of the Usp1 deubiquitylase is a physiological substrate of the N-end rule pathway." Mol Cell **48**(6): 926-933.

Piccinini, M., M. Mostert, S. Croce, S. Baldovino, M. Papotti and M. T. Rinaudo (2003). "Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome." J Neuroimmunol **135**(1-2): 135-140.

Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.

Pocanschi, C. L., G. Kozlov, U. Brockmeier, A. Brockmeier, D. B. Williams and K. Gehring (2011). "Structural and functional relationships between the lectin and arm domains of calreticulin." J Biol Chem **286**(31): 27266-27277.

Polevoda, B. and F. Sherman (2002). "The diversity of acetylated proteins." Genome Biol **3**(5): reviews0006.

Pratt, W. B., Y. Morishima, H. M. Peng and Y. Osawa (2010). "Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage." Exp Biol Med (Maywood) **235**(3): 278-289.

Qiu, Y. and M. Michalak (2009). "Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(3): 531-538.

Raasi, S. and D. H. Wolf (2007). "Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome." *Semin Cell Dev Biol* **18**(6): 780-791.

Radhakrishnan, I., G. C. Perez-Alvarado, D. Parker, H. J. Dyson, M. R. Montminy and P. E. Wright (1997). "Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions." *Cell* **91**(6): 741-752.

Radivojac, P., V. Vacic, C. Haynes, R. R. Cocklin, A. Mohan, J. W. Heyen, M. G. Goebel and L. M. Iakoucheva (2010). "Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites." *Proteins* **78**(2): 365-380.

Raghavan, M., S. J. Wijeyesakere, L. R. Peters and N. Del Cid (2013). "Calreticulin in the immune system: ins and outs." *Trends Immunol* **34**(1): 13-21.

Rai, R. and A. Kashina (2005). "Identification of mammalian arginyltransferases that modify a specific subset of protein substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(29): 10123-10128.

Rai, R., C. C. Wong, T. Xu, N. A. Leu, D. W. Dong, C. Guo, K. J. McLaughlin, J. R. Yates, 3rd and A. Kashina (2008). "Arginyltransferase regulates alpha cardiac actin function, myofibril formation and contractility during heart development." *Development* **135**(23): 3881-3889.

Rao, P. and H. Kaji (1977). "Effect of temperature on arginine incorporation by ribosomeless extracts of cells transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus." *Biochim Biophys Acta* **477**(4): 394-403.

Ravid, T. and M. Hochstrasser (2008). "Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 679-690.

Richardson, P. G., C. Mitsiades, R. Schlossman, I. Ghobrial, T. Hideshima, N. Munshi and K. C. Anderson (2008). "Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma." *Expert Rev Anticancer Ther* **8**(7): 1053-1072.

Rizvi, S. M., L. Mancino, V. Thammavongsa, R. L. Cantley and M. Raghavan (2004). "A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region." *Mol Cell* **15**(6): 913-923.

Roderick, H. L., A. K. Campbell and D. H. Llewellyn (1997). "Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors." *FEBS Lett* **405**(2): 181-185.

Rogers, S., R. Wells and M. Rechsteiner (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* **234**(4774): 364-368.

Rojiani, M. V., B. B. Finlay, V. Gray and S. Dedhar (1991). "In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits." *Biochemistry* **30**(41): 9859-9866.

Saha, S. and A. Kashina (2011). "Posttranslational arginylation as a global biological regulator." *Dev Biol* **358**(1): 1-8.

Saha, S., M. M. Mundia, F. Zhang, R. W. Demers, F. Korobova, T. Svitkina, A. A. Perieteanu, J. F. Dawson and A. Kashina (2010). "Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins." *Mol Biol Cell* **21**(8): 1350-1361.

Sarkar, S., B. Ravikumar, R. A. Floto and D. C. Rubinsztein (2009). "Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies." *Cell Death Differ* **16**(1): 46-56.

Sasaki, T., H. Kojima, R. Kishimoto, A. Ikeda, H. Kunimoto and K. Nakajima (2006). "Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role." *Mol Cell* **24**(1): 63-75.

Schulman, B. A. (2011). "Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades." *Protein Sci* **20**(12): 1941-1954.

Shyne-Athwal, S., R. V. Riccio, G. Chakraborty and N. A. Ingoglia (1986). "Protein modification by amino acid addition is increased in crushed sciatic but not optic nerves." Science **231**(4738): 603-605.

Singh, N. K., C. D. Atreya and H. L. Nakhasi (1994). "Identification of calreticulin as a rubella virus RNA binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12770-12774.

Smith, D. K., P. Radivojac, Z. Obradovic, A. K. Dunker and G. Zhu (2003). "Improved amino acid flexibility parameters." Protein Sci **12**(5): 1060-1072.

Soffer, R. L. (1971). "Enzymatic modification of proteins. 4. Arginylation of bovine thyroglobulin." J Biol Chem **246**(5): 1481-1484.

Soffer, R. L. (1971). "Enzymatic modification of proteins. V. Protein acceptor specificity in the arginine-transfer reaction." J Biol Chem **246**(6): 1602-1606.

Soffer, R. L. (1975). "Enzymatic arginylation of beta-melanocyte-stimulating hormone and of angiotensin II." J Biol Chem **250**(7): 2626-2629.

Somogyi, E., U. Petersson, K. Hultenby and M. Wendel (2003). "Calreticulin--an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix." Matrix Biol **22**(2): 179-191.

Sriram, S. M., B. Y. Kim and Y. T. Kwon (2011). "The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(11): 735-747.

Stock, D., L. Ditzel, W. Baumeister, R. Huber and J. Lowe (1995). "Catalytic mechanism of the 20S proteasome of *Thermoplasma acidophilum* revealed by X-ray crystallography." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **60**: 525-532.

Stolz, A. and D. H. Wolf (2010). "Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 694-705.

Stratford, F. L., N. Chondrogianni, I. P. Trougakos, E. S. Gonos and A. J. Rivett (2006). "Proteasome response to interferon-gamma is altered in senescent human fibroblasts." FEBS Lett **580**(16): 3989-3994.

Sun, L. and Z. J. Chen (2004). "The novel functions of ubiquitination in signaling." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 119-126.

Takeuchi, J., H. Chen, M. A. Hoyt and P. Coffino (2008). "Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase." Biochem J **410**(2): 401-407.

Tanahashi, N., Y. Murakami, Y. Minami, N. Shimbara, K. B. Hendil and K. Tanaka (2000). "Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis." J Biol Chem **275**(19): 14336-14345.

Tanaka, K., L. Waxman and A. L. Goldberg (1983). "ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin." J Cell Biol **96**(6): 1580-1585.

Tanaka, Y. and H. Kaji (1974). "Incorporation of arginine by soluble extracts of ascites tumor cells and regenerating rat liver." Cancer Res **34**(9): 2204-2208.

Tanida, I. (2011). "Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy." Antioxid Redox Signal **14**(11): 2201-2214.

Tarcsa, E., G. Szymanska, S. Lecker, C. M. O'Connor and A. L. Goldberg (2000). "Ca<sup>2+</sup>-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination." J Biol Chem **275**(27): 20295-20301.

Tasaki, T., L. C. Mulder, A. Iwamatsu, M. J. Lee, I. V. Davydov, A. Varshavsky, M. Muesing and Y. T. Kwon (2005). "A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons." Mol Cell Biol **25**(16): 7120-7136.

Tasaki, T., S. M. Sriram, K. S. Park and Y. T. Kwon (2012). "The N-end rule pathway." Annu Rev Biochem **81**: 261-289.

Tasaki, T., A. Zakrzewska, D. D. Dudgeon, Y. Jiang, J. S. Lazo and Y. T. Kwon (2009). "The substrate recognition domains of the N-end rule pathway." J Biol Chem **284**(3): 1884-1895.

Thomas, M. G., M. Loschi, M. A. Desbats and G. L. Boccaccio (2011). "RNA granules: the good, the bad and the ugly." Cell Signal **23**(2): 324-334.

Timchenko, L. T., P. Iakova, A. L. Welm, Z. J. Cai and N. A. Timchenko (2002). "Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins." Mol Cell Biol **22**(20): 7242-7257.

Tofaris, G. K., R. Layfield and M. G. Spillantini (2001). "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome." FEBS Lett **509**(1): 22-26.

Tompa, P. (2002). "Intrinsically unstructured proteins." Trends Biochem Sci **27**(10): 527-533.

Tompa, P., C. Szasz and L. Buday (2005). "Structural disorder throws new light on moonlighting." Trends Biochem Sci **30**(9): 484-489.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Unno, M., T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka and T. Tsukihara (2002). "The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution." Structure **10**(5): 609-618.

Ustrell, V., L. Hoffman, G. Pratt and M. Rechsteiner (2002). "PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair." EMBO J **21**(13): 3516-3525.

Uversky, V. N. (2002). "Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics." Protein Sci **11**(4): 739-756.

Varshavsky, A. (1992). "The N-end rule." Cell **69**(5): 725-735.

Varshavsky, A. (1995). "The N-end rule." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **60**: 461-478.

Varshavsky, A. (1996). "The N-end rule: functions, mysteries, uses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12142-12149.

Varshavsky, A. (2005). "Regulated protein degradation." Trends Biochem Sci **30**(6): 283-286.

Varshavsky, A. (2011). "The N-end rule pathway and regulation by proteolysis." Protein Sci.

Varshavsky, A., A. Bachmair and D. Finley (1987). "The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications." Biochem Soc Trans **15**(5): 815-816.

Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin and R. J. Deshaies (2002). "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." Science **298**(5593): 611-615.

Vicencio, J. M., S. Lavandro and G. Szabadkai (2010). "Ca<sup>2+</sup>, autophagy and protein degradation: thrown off balance in neurodegenerative disease." Cell Calcium **47**(2): 112-121.

Wang, Y. and E. Mandelkow (2012). "Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways." Biochem Soc Trans **40**(4): 644-652.

Wearsch, P. A. and C. V. Nicchitta (1996). "Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain." Biochemistry **35**(51): 16760-16769.

Wenzel, T. and W. Baumeister (1995). "Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome." Nat Struct Biol **2**(3): 199-204.

Wijeyesakere, S. J., A. A. Gafni and M. Raghavan (2011). "Calreticulin is a thermostable protein with distinct structural responses to different divalent cation environments." J Biol Chem **286**(11): 8771-8785.

Williams, B. R. (2001). "Signal integration via PKR." Sci STKE **2001**(89): re2.

Wong, C. C., T. Xu, R. Rai, A. O. Bailey, J. R. Yates, 3rd, Y. I. Wolf, H. Zebroski and A. Kashina (2007). "Global analysis of posttranslational protein arginylation." PLoS Biol **5**(10): e258.

Wu, H., Y. Han, Y. Qin, C. Cao, Y. Xia, C. Liu and Y. Wang (2013). "Whole-cell vaccine coated with recombinant calreticulin enhances activation of dendritic cells and induces tumour-specific immune responses." Oncol Rep **29**(2): 529-534.

Xia, Z., A. Webster, F. Du, K. Piatkov, M. Ghislain and A. Varshavsky (2008). "Substrate-binding sites of UBR1, the ubiquitin ligase of the N-end rule pathway." J Biol Chem **283**(35): 24011-24028.

Xiao, G., T. F. Chung, R. E. Fine and R. J. Johnson (1999). "Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment." J Neurosci Res **58**(5): 652-662.

Xu, J., Y. Wu, P. Song, M. Zhang, S. Wang and M. H. Zou (2007). "Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus." Circulation **116**(8): 944-953.

Xue, Y., A. Li, L. Wang, H. Feng and X. Yao (2006). "PPSP: prediction of PK-specific phosphorylation site with Bayesian decision theory." BMC Bioinformatics **7**: 163.

Yang, Y., X. J. Li, Z. Chen, X. X. Zhu, J. Wang, L. B. Zhang, L. Qiang, Y. J. Ma, Z. Y. Li, Q. L. Guo and Q. D. You (2012). "Wogonin induced calreticulin/annexin A1 exposure dictates the immunogenicity of cancer cells in a PERK/AKT dependent manner." PLoS One **7**(12): e50811.

Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." Nature **419**(6905): 403-407.

Yonehara, M., Y. Minami, Y. Kawata, J. Nagai and I. Yahara (1996). "Heat-induced chaperone activity of HSP90." J Biol Chem **271**(5): 2641-2645.

Yoon, G. S., H. Lee, Y. Jung, E. Yu, H. B. Moon, K. Song and I. Lee (2000). "Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **60**(4): 1117-1120.

Yu, H., G. Kaung, S. Kobayashi and R. R. Kopito (1997). "Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome." J Biol Chem **272**(33): 20800-20804.

Zamanian, M., A. Veerakumarasivam, S. Abdullah and R. Rosli (2013). "Calreticulin and cancer." Pathol Oncol Res **19**(2): 149-154.

Zapun, A., N. J. Darby, D. C. Tessier, M. Michalak, J. J. Bergeron and D. Y. Thomas (1998). "Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57." J Biol Chem **273**(11): 6009-6012.

Zhang, F., S. Saha and A. Kashina (2012). "Arginylation-dependent regulation of a proteolytic product of talin is essential for cell-cell adhesion." J Cell Biol **197**(6): 819-836.

Zhang, F., S. Saha, S. A. Shabalina and A. Kashina (2010). "Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation." Science **329**(5998): 1534-1537.

Zhang, Q. and R. D. Salter (1998). "Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation." J Immunol **160**(2): 831-837.

Zhang, X., E. Szabo, M. Michalak and M. Opas (2007). "Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse." Int J Dev Neurosci **25**(7): 455-463.