



C I Q U I B I C

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL
DE LA ENZIMA ARGINILTRANSFERASA 1 (ATE1)
EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA**

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas

Licenciada en Química Laura Vanesa Bonnet



Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba CIQUIBIC-CONICET

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

2022

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Marta Elena Hallak

Investigadora Principal de CONICET

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dr. José Luis Bocco

Investigador Superior de CONICET

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)

Dra. Mariana Maccioni

Investigadora Principal de CONICET

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)

Dr. Javier Valdez Taubas

Investigador Independiente de CONICET

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Mario Rossi

Investigador Independiente de CONICET

Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT)

A mes très chers parents.

*A ma famille et amies qui m'ont accompagné et soutenu
tout au long de mon parcours.*

Merci.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
LA AUTOFAGIA	11
Definición y mecanismos de la autofagia.	11
Macroautofagia	11
Función y regulación de la autofagia	14
Autofagia selectiva y p62.....	16
Sistema ubiquitina-proteasoma	18
Interrelación entre el UPS y la autofagia	19
ARGINILACIÓN POSTRADUCCIONAL DE PROTEÍNAS	21
Modificación postraducción de proteínas	21
Incorporación postraduccional de aminoácidos	21
Arginilación postraducción de proteínas.....	22
ARGINIL-ARNt TRANSFERASA (Ate1)	23
Biosíntesis	23
Estructura	24
Actividad y localización.....	25
Función	27
Procesos fisiológicos regulados por Ate1.....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 1	34
RESULTADOS	35
i. Localización subcelular de Ate1	35
ii. Compartimentación de Ate1 y del adaptador autofágico p62	41
iii. Estabilidad metabólica de Ate1	45
DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO 2	51
RESULTADOS	52
i. Flujo de autofagia	52
ii. Degradación de vacuolas y sustratos autofágicos	55
iii. Rutas metabólicas involucradas en la respuesta autofágica	60
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIÓN	74
PERSPECTIVAS	76
ANEXO	79
Figuras Suplementarias	80
Tablas Suplementarias	86
MATERIALES Y MÉTODOS	88
REFERENCIAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPs	Proteínas de unión a actina (<i>Actin-Binding Proteins</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPk	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenina (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
Arg	Aminoácido arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
Asp	Aminoácido ácido aspártico
Atg	Genes relacionados a la autofagia (<i>Autophagy-related genes</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine TriPhosphate</i>)
BT	Bortezomib
Cav1	Caveolina 1
CHO-K1	Células epiteliales de ovario de hámster chino (<i>Chinese Hamster Ovary-K1 Cells</i>)
CHX	Cicloheximida
cKO	Inactivación génica condicional (<i>condicional KnockOut</i>)
CMA	Autofagia mediada por chaperonas (<i>Chaperone-Mediated Autophagy</i>)
CoA	Acetil-coenzima A
CQ	Cloroquina
CRT	Calreticulina
Cys	Aminoácido cisteína
DMEM	Medio de cultivo <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i> (<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>)
Gapdh	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Glu	Aminoácido ácido glutámico
GNAT	Dominio estructural de las enzimas NAT
HOG	Células derivadas de oligodendrogloma humano (<i>Human Oligodendrocytes cells</i>)
KO	Inactivación génica (<i>KnockOut</i>)
LC3-I	Proteína LC3B sin péptido señal
LC3-II	Proteína LC3B asociada a fosfatidiletanolamina
Leu	Aminoácido leucina
LIR	Dominio de interacción con LC3 (<i>LC3-Interacting Region</i>)
Lys	Aminoácido lisina (<i>Lysine</i>)
MEFs	Células embrionarias derivadas de fibroblastos de ratón (<i>Mouse Embryonic Fibroblasts cells</i>)
Met	Aminoácido metionina
mTOC	Centro organizador de microtúbulos (<i>microTubule Organizing Center</i>)
mTOR	Complejo receptor de rapamicina (<i>Mechanistic/Mammalian Target Of Rapamycin</i>)
NAT	N-acetiltransferasa
NF-κB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
PBS	Solución salina de fosfatos (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)

PE	Fosfatidiletanolamina (<i>PhosphatidylEthanolamine</i>)
Phe	Aminoácido fenilalanina (<i>Phenylalanine</i>)
PI3P	Fosfatidilinositol trifosfato (<i>PhosphatidylInositol 3-Phosphate</i>)
Poli-Ub	Proteínas poliubiquitinadas
RE	Retículo endoplásmico
RGS	Proteína reguladora de la señalización por proteína G (<i>Regulator of G protein Signaling</i>)
Ser	Aminoácido serina
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TBS	Solución salina con Tris (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
Thr	Aminoácido treonina (<i>Threonine</i>)
TX114	Tritón X-114
Tyr	Aminoácido tirosina (<i>Tyrosine</i>)
Ub	Ubiquitina
UBA	Dominio de asociación a ubiquitina (<i>UBiquitin-Associated domain</i>)
UPS	Sistema ubiquitina proteasoma (<i>Ubiquitin Proteasome System</i>)
β-mer	β-mercaptoetanol

RESUMEN

La enzima arginil-ARNt transferasa (Ate1) cataliza la transferencia de arginina desde un ARN de transferencia a una proteína aceptora. Este proceso conocido como arginilación postraducciona está involucrado en el catabolismo de proteínas, particularmente en la señalización de sustratos del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (UPS). En situaciones donde el UPS está comprometido, la célula activa el mecanismo proteolítico de autofagia para evitar la acumulación de especies tóxicas y mantener el *fitness* celular. No obstante, se desconoce si la arginilación es necesaria para el reconocimiento y la degradación de proteínas por la vía autofágica. Por este motivo, en este trabajo de tesis se propuso investigar la implicancia funcional de Ate1 en la autofagia. Se analizaron aspectos moleculares y celulares de las distintas variantes alternativas de la enzima durante la respuesta autofágica inducida por la inhibición del proteasoma. Utilizando diferentes metodologías, se demostró que las isoformas de Ate1 se localizan en el citosol y núcleo de la célula, mientras que una fracción de las mismas se une a membranas biológicas y proteínas del citoesqueleto. Esta distribución se correlaciona con la formación de estructuras de alto peso molecular, que se localizan en las proximidades del núcleo junto a la proteína adaptadora autofágica p62 y otros sustratos de degradación. Dada la importancia de p62 en el reconocimiento de sustratos, la compartimentación de Ate1 junto a esta proteína sugiere que podría ser necesaria durante la respuesta autofágica. Además, para comprender la implicancia biológica de la enzima en este proceso degradativo, se analizó la actividad autofágica en ausencia de Ate1, y frente a la expresión endógena y ectópica de la enzima en células. Con esta finalidad, se realizaron ensayos bioquímicos y de microscopía confocal que permitieron descubrir aspectos funcionales de la enzima. Se demostró que en ausencia de Ate1, el complejo mTORC1 está hiperactivado, lo cual disminuye el flujo de autofagia y provoca la acumulación de vacuolas y sustratos autofágicos en la célula. Además, se observaron defectos en la inducción de autofagia en condiciones de déficit nutricional. La expresión ectópica de una única isoforma de Ate1 permitió recuperar parcialmente el fenotipo salvaje. Este estudio sugiere que Ate1 podría contribuir al proceso de reconocimiento de los sustratos junto a p62 y permite establecer la importancia de la arginilación en la regulación del proceso de degradación autofágico.

ABSTRACT

The arginyl-tRNA transferase (Ate1) enzyme catalyzes the transfer of arginine from a transfer RNA to an acceptor protein. This process known as post-translational arginylation is involved in protein catabolism, notably during substrates recognition by the ubiquitin-proteasome degradation system (UPS). When the UPS is compromised, cells activate autophagy, a proteolytic mechanism that prevents the accumulation of toxic species and maintains cellular homeostasis. To further investigate whether protein arginylation is required in this process, this work was focused on the functional implication of Ate1 in the autophagic pathway. Molecular and cellular aspects of Ate1 isoforms were analyzed during the autophagic response induced by proteasome inhibition using different experimental approaches. Ate1 isoforms were found in the cytosol and nucleus of the cell, whereas a fraction was associated with biological membranes and cytoskeleton proteins. This subcellular distribution correlates with the formation of high molecular weight structures, which are localized in the perinuclear region of the cell together with the autophagic adaptor protein, p62 and other degradation substrates. Given the importance of p62 in substrate recognition, the compartmentalization of Ate1 with this protein suggests that it may be required during autophagic response. To understand the biological implication of Ate1 in this degradative process, we assessed autophagic activity in the absence of the enzyme, and under endogenous or ectopic expression of Ate1 in cultured cells. Ate1 deletion causes mTORC1 complex hyperactivation, a decrease of autophagic flux and leads to an accumulation of autophagosomes and their substrates. Moreover, autophagic induction is impaired under fasting conditions. The observed phenotype can be partially rescued by reintroduction of stably expressed Ate1-specific isoform. Finally, this study suggests that Ate1 may contribute to the substrate recognition process together with p62 and highlights the importance of post-translational arginylation in the regulation of the autophagic degradation process.

INTRODUCCIÓN

LA AUTOFAGIA

Definición y mecanismos de la autofagia.

La autofagia¹ es un proceso catabólico, evolutivamente conservado en eucariotas, que permite degradar material citoplasmático mediante la acción de los lisosomas en mamíferos, y la vacuola en plantas y levaduras. Este mecanismo preserva a las células de la acumulación de toxinas, moléculas y organelas dañadas o disfuncionales. Se distinguen tres vías de degradación autofágica basadas en cómo los componentes celulares alcanzan el lisosoma: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas [1-4].

La macroautofagia es la vía principal para la degradación masiva de componentes citoplasmáticos. Este proceso se caracteriza por la formación de una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma que dirige el contenido citoplasmático al lisosoma (**Figura 1a**). En la microautofagia, el material citosólico es incorporado en el lisosoma a través de pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma (**Figura 1b**). Por último, la autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés *Chaperone Mediated Autophagy*), permite la degradación selectiva de proteínas que poseen una secuencia de aminoácidos determinada (motivo KFERQ). Las proteínas con este motivo son reconocidas y transportadas hasta el interior del lisosoma (**Figura 1c**) [1, 5]. Los lisosomas contienen más de 60 hidrolasas ácidas que son capaces de romper y digerir la mayor parte del material biológico [6]. La degradación mediante estas enzimas (nucleasas, proteasas, lipasas y glicosidasas), genera productos que son devueltos al citoplasma mediante transportadores y permeasas insertas en la membrana lisosomal [7].

Macroautofagia

La macroautofagia, más conocida como autofagia, es un proceso altamente dinámico en el que participan un conjunto de proteínas denominadas Atg (del inglés, *Autophagy-related*). Estas proteínas, evolutivamente conservadas, se organizan en complejos funcionales que regulan los distintos pasos de la vía. La autofagia ocurre en tres etapas: (1) iniciación: formación del fagoforo; (2) elongación: formación del autofagosoma; (3) fusión con el lisosoma y degradación de la carga [8, 9]. La fase de **iniciación** comienza con el reclutamiento de una cisterna membranosa denominada membrana de aislamiento. Aunque su origen es incierto, podría formarse a partir de la

¹ La palabra autofagia fue inventada por C. De Duve en 1963 y significa comer (fagia) propio (auto).

fusión de membranas del retículo endoplásmico (RE) y otros compartimentos, como la membrana mitocondrial externa, membrana plasmática, endosomas, aparato de Golgi e incluso por la síntesis *de novo* de lípidos [10-16]. En esta etapa intervienen dos complejos proteicos principales: el complejo ULK1 (ULK1-Atg13-FIP200-Atg101) y el complejo PI3k de clase III (VPS34-Beclin1-Atg14L-VPS15). El complejo ULK1 transloca al sitio de reclutamiento de la membrana de aislamiento, donde induce la formación del complejo PI3k III. Este último posee actividad fosfatidil inositol quinasa que produce fosfatidil inositol trifosfato (PI3P, del inglés *Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate*), un lípido esencial para la biogénesis del autofagosoma (**Figura 2a**. Iniciación). En la fase de **elongación**, la membrana del fagoforo se extiende rodeando el material a degradar hasta unir sus extremos formando el autofagosoma (**Figura 2a**. Elongación). Durante este proceso, la proteína Atg14L del complejo PI3k III recluta dos sistemas de conjugación que operan de manera coordinada: los complejos Atg12-Atg5-Atg16 y LC3-I/LC3-II (**Figura 2b**). La proteína LC3 es también conocida como Atg8 o MAP1-LC3

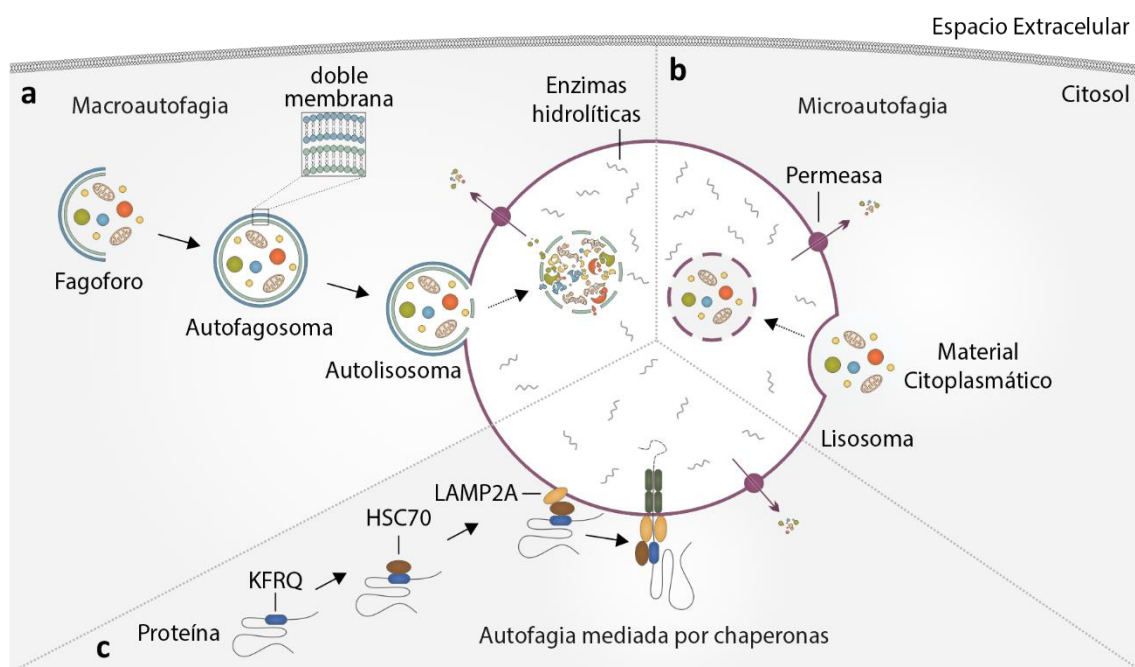


Figura 1. Mecanismos de degradación autofágica. (a) En la macroautofagia una estructura llamada fagoforo crece alrededor del material citoplasmático a degradar hasta formar una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. Esta vesícula es transportada hasta el lisosoma para su fusión, formándose el autolisosoma que es el responsable de degradar la carga. (b) En la microautofagia, los componentes citoplasmáticos son secuestrados directamente por el lisosoma a través de invaginaciones de la membrana. (c) En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas que poseen la secuencia consenso KFRQ son reconocidas selectivamente por chaperonas, como la proteína de choque térmico de 70 kD (HSC70, del inglés *Heat Shock Cognate 70*), que facilita su translocación al interior del lisosoma al ser reconocidas por la proteína de membrana asociada al lisosoma Lamp-2. En el interior del lisosoma, el material es degradado por enzimas hidrolíticas. Los metabolitos generados tras la proteólisis son bombeados al citosol por enzimas permeasas para su reutilización en la célula. Adaptado de Boya y col. 2013.

(del inglés, *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*). En la primera reacción de conjugación, Atg7 y Atg10 catalizan la unión covalente entre Atg12 y Atg5, este conjugado se une al dímero de Atg16. Este complejo se asocia a la membrana del fagoforo en crecimiento facilitando el reclutamiento y la modificación lipídica de LC3. En el sistema de conjugación de LC3, la proteasa Atg4 escinde a LC3 sintetizado como proforma (Pro-LC3) dando lugar a la forma citosólica conocida como LC3-I, la cual es reconocida y procesada por Atg7 y Atg3, para finalmente añadir fosfatidiletanolamina (PE, del inglés *PhosphatidylEthanolamine*). Facilitado por el complejo Atg12-Atg5-Atg16, la forma lipídica de LC3, conocida como LC3-II, se ancla en ambos lados de la doble membrana del fagoforo en expansión. Así, LC3-II se localiza en la cara

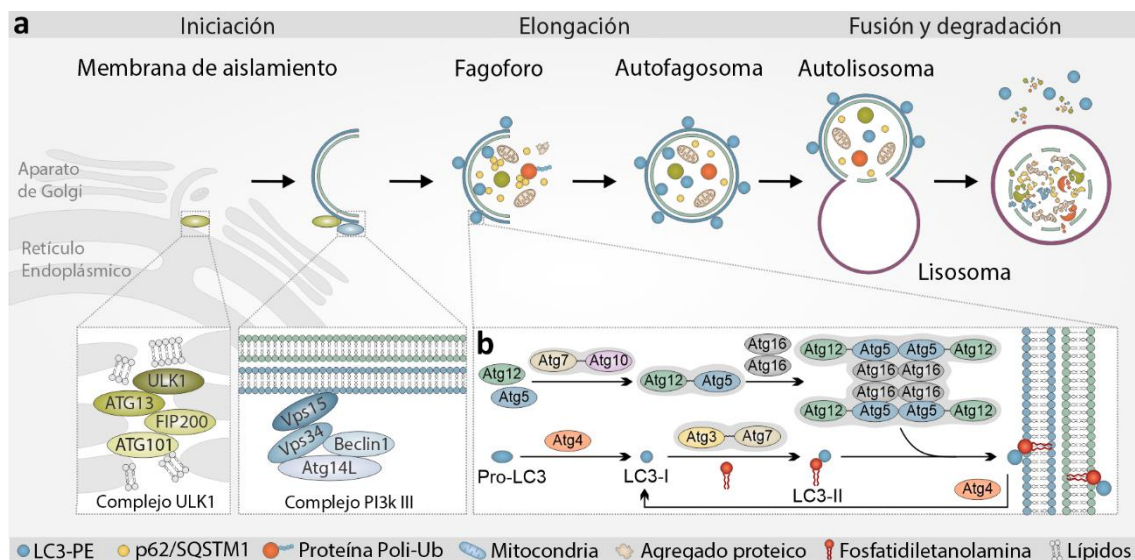


Figura 2. Fases del proceso de formación del autofagosoma. (a) Iniciación. El proceso de autofagia comienza por el reclutamiento de la membrana de aislamiento a partir de membranas celulares o de la síntesis *de novo* de lípidos. En este proceso interviene el complejo ULK1, cuya actividad quinasa desencadena la formación y activación del complejo PI3k III, y promueve la síntesis de PIP3 en ciertas áreas de las distintas membranas. Esto atrae a diversas proteínas que provocan la evaginación y desprendimientos de esas porciones de la membrana formando una estructura denominada membrana de aislamiento. **Elongación.** El complejo PI3k III recluta los sistemas de conjugación Atg12-Atg5-Atg16 y LC3-II/LC3-I (descrito en **b**) que promueven la elongación de la membrana de aislamiento, a partir de la cual emerge el fagoforo. El complejo PI3k III junto con los complejos de conjugación promueven la extensión del fagoforo, que rodea las moléculas u organelas a degradar, hasta unir sus extremos formando un compartimento cerrado denominado autofagosoma. **Fusión y degradación.** El autofagosoma se fusiona al lisosoma formando el autolisosoma, donde se produce la degradación de su contenido. **(b) Sistemas de conjugación de Atg12-Atg5-Atg16 y LC3B.** En la conjugación de Atg5 con Atg12, las enzimas Atg7 y Atg10 catalizan la formación de un enlace covalente entre Atg12 y Atg5. Este complejo se une de manera no covalente a un dímero de Atg16, formando un complejo tetramérico que se asocia a la membrana del fagoforo en elongación. Por su parte, la proteína LC3B sintetizada como pro-LC3 es procesada por Atg4 obteniéndose la variante citosólica denominada LC3-I. LC3-I se conjuga a fosfatidiletanolamina (PE) mediante la acción de Atg7 y Atg3. Esta forma lipídica, se conoce como LC3-II, y por medio de Atg12-Atg5-Atg16 puede asociarse a la membrana del autofagosoma. El ensamblaje continuo de estos complejos proteína-proteína, proteína-lípido y el reclutamiento y/o producción de lípidos permite la elongación del fagoforo. Adaptado de Klionsky y col. 2021.

interna y externa del autofagosoma e interviene tanto en la elongación como en el cierre del fagoforo para formar el autofagosoma.

En la etapa de **fusión y degradación**, el autofagosoma maduro se fusiona con el lisosoma, formando el autolisosoma, en el que por acción de las enzimas hidrolíticas lisosomales se degradan los componentes citoplasmáticos. Los productos resultantes son moléculas pequeñas, particularmente aminoácidos, que se transportan de nuevo al citosol para la síntesis *de novo* de proteínas (**Figura 2a**. Fusión y degradación). A diferencia del complejo Atg12-Atg5-Atg16, LC3-II se mantiene unido a la membrana del fagoforo y del autofagosoma hasta la fusión con el lisosoma. Allí, la fracción de LC3-II que se encuentra en el interior del autolisosoma es degradada, mientras que la fracción que se halla en la superficie de la membrana externa es deslipidada por Atg4 y liberada al citosol para su reciclaje (**Figura 2b**).

Función y regulación de la autofagia

La función y actividad autofágica varían según el estado nutricional y energético de la célula. Existe un nivel basal de autofagia que actúa como mecanismo de control de calidad en la célula, eliminando aquello que resulte defectuoso o potencialmente dañino. Sin embargo, en situaciones de ayuno nutricional o ante la necesidad de un aporte energético adicional, la autofagia puede activarse como un mecanismo de obtención de nutrientes. El resultado de este proceso es la captura y degradación de porciones de citoplasma; cuyos productos contribuyen al suministro de sustratos para procesos de biosíntesis y al restablecimiento de los niveles energéticos intracelulares. Este mecanismo de ajuste al metabolismo celular está estrechamente regulado a través de mTOR (del inglés, *Mechanistic/Mammalian Target Of Rapamycin*) y AMPk (del inglés, *5'-AMP-activated protein kinase*), las principales vías de señalización responsables de censar el estado nutricional y energético de la célula.

mTOR está formado por los subcomplejos mTORC1 y mTORC2, que pueden censar nutrientes a nivel local, como aminoácidos y glucosa o en organismos multicelulares pueden detectar señales extracelulares, como hormonas o factores de crecimiento. La detección de estas señales a través de este sensor estimula la producción de proteínas, lípidos y lisosomas, a la vez que suprime vías catabólicas como la autofagia (**Figura 3**) [17]. De este modo, la vía mTOR constituye un nodo central en la regulación de los procesos celulares anabólicos y catabólicos esenciales para el crecimiento, la proliferación, y la supervivencia celular [18]. Aunque el mecanismo de activación de mTORC1 puede variar de acuerdo con el estímulo inductor; en general,

está mediado por la fosforilación de mTOR en Serina (Ser) 2448 por intermedio de la quinasa Akt. mTOR fosforilado transloca desde el citosol hacia la membrana del lisosoma, donde a través de los efectores de la vía desencadena la respuesta celular (**Tabla 1**) [17, 19]. AMPk actúa como un sensor de la carga energética de la célula y su actividad enzimática depende de la fosforilación en Treonina (Thr) 172, mientras que la defosforilación de este residuo inhibe la actividad de la proteína (**Tabla 1**) [20, 21]. Es importante resaltar que el rol de AMPk en la autofagia es complejo y depende del tipo celular y de las condiciones metabólicas. Asimismo, el estado de fosforilación de AMPk es un parámetro de su actividad en la vía autofágica.

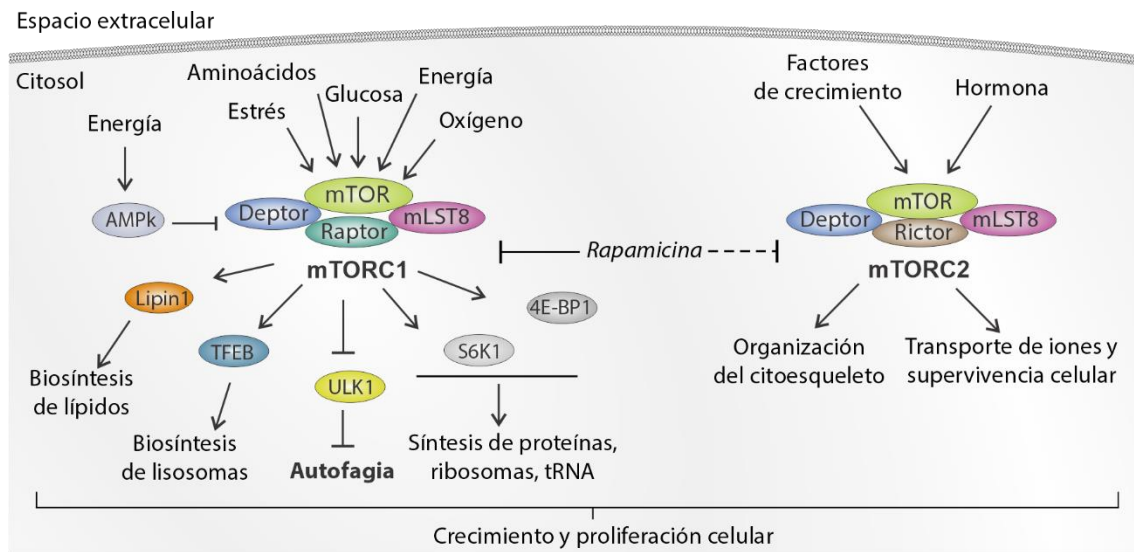


Figura 3. Vía de señalización de mTOR. mTOR está formado por dos subcomplejos, mTORC1 y mTORC2. El subcomplejo mTORC1 está compuesto por un centro catalítico mTOR, una serina/treonina quinasa, y las subunidades: Raptor, mLST8, PRAS40 y Deptor. mTORC2 está formado por mTOR, Rictor, mLS8 y Deptor. En presencia de nutrientes, el complejo mTORC1 se activa por fosforilación en Ser2448, promoviendo la síntesis proteica, al fosforilar p70S6k y 4E-BP1, así como la síntesis de lípidos y lisosomas vía Lipin1 y TFEB, e inhibiendo la autofagia por fosforilación de ULK1. mTORC2 regula la dinámica del citoesqueleto y la migración celular; el metabolismo de glucosa de la vía insulina/PI3k, el transporte de iones y la supervivencia celular. La célula puede activar la autofagia en respuesta a otros tipos de estrés como, por ejemplo, el estrés oxidativo provocado por una acumulación de especies reactivas de oxígeno (estrés), estrés metabólico en respuesta a bajos niveles de adenosín trifosfato (ATP) (energía), la alteración del flujo de calcio en el RE, estrés de RE (estrés) y la deprivación de la glucosa (glucosa). Otros tipos de estrés como la hipoxia (oxígeno) y la presencia de patógenos también están relacionados con la inducción de autofagia en células de mamíferos. La rapamicina es un inhibidor farmacológico del complejo mTORC1, aunque no afecta esencialmente a mTORC2, los tratamientos prolongados pueden impedir su cascada de señalización. Adaptado de Sabatini y col. 2017.

El déficit nutricional es una de las principales señales que estimula la autofagia en la célula. Este mecanismo está regulado por la fosforilación coordinada de ULK1 en la que intervienen las quinastas mTORC1 y AMPk. En condiciones de deprivación de nutrientes, AMPk promueve la autofagia activando directamente a ULK1 por fosforilación, aunque el/los sitio(s) exacto(s) de fosforilación de ULK1 continúa siendo

objeto de discusión (**Tabla 1**). En condiciones de abundancia de nutrientes, el aumento de la actividad de mTORC1 impide la activación de ULK1 fosforilando residuos alternativos de ULK1 e interrumpiendo la interacción entre ULK1 y AMPk (**Figura 4**) [22, 23]. Si bien la actividad relativa de mTORC1 y AMPk en diferentes contextos celulares determina el grado de activación de la autofagia; en general, cuando el complejo mTORC1 se encuentra activo predominan las reacciones anabólicas, mientras que la autofagia se mantiene en niveles basales para el mantenimiento de la homeostasis y supervivencia de la célula. Por el contrario, la inhibición de mTORC1 por escasez de nutrientes, estimula la autofagia, para restaurar los niveles de aminoácidos y energía de la célula [17].

Tabla 1. Sitios de fosforilación de ULK1, mTORC1 y AMPk que regulan la autofagia.

Proteína	Sitio de fosforilación	Quinasa	Función	Referencia
ULK1	S317, S555, S574, S673	AMPk	Necesaria para la mitofagia, la homeostasis mitocondrial y la supervivencia celular.	[24]
	S467, S777 (ratón)	AMPk	Aumenta la actividad quinasa de ULK1 y promueve la autofagia.	[22, 24]
	S757/S758 (ratón/humano)	mTORC1	Facilita la interacción de ULK1 con AMPk.	[25]
	S757	mTORC1	Impide la interacción de ULK1 con AMPk.	[22]
	S637	mTORC1, AMPk	Facilita la interacción de ULK1 con AMPk	[25]
	(sitio incierto entre 278 y 351)	Autofosforilación	Impide su interacción con Atg13	[26, 27]
mTORC1	S2448	Akt	Se correlaciona con la actividad de mTORC1	[28]
AMPk	T172	CAMKK2/CaMKK β , STK11/LKB1 o MAP3K7/TAK1.	Se correlaciona con la actividad de AMPk	[29]

Autofagia selectiva y p62

La autofagia puede clasificarse de acuerdo al mecanismo de secuestro del material a degradar. Se conoce como autofagia no selectiva o en masa, al proceso en el que el contenido citosólico es captado aleatoriamente por el fagoforo en crecimiento. Sin embargo, existen mecanismos de autofagia que permiten reconocer y procesar sustratos específicos, como patógenos intracelulares, macromoléculas, agregados u organelas. Este proceso, conocido como autofagia selectiva, ocurre a través de un

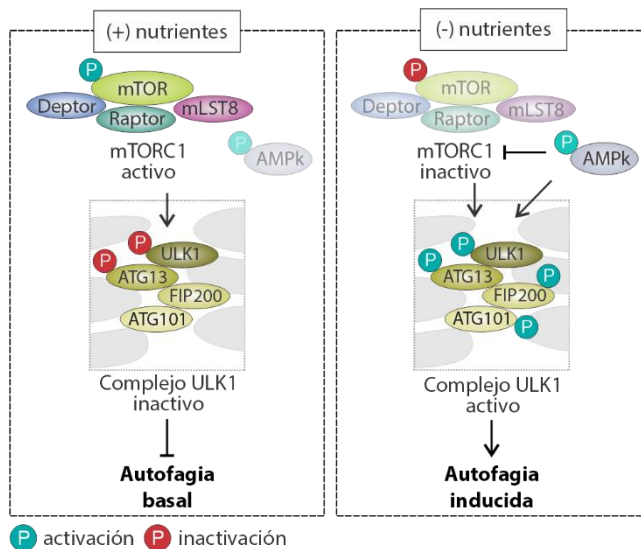


Figura 4. Regulación de la activación de la autofagia. En presencia de nutrientes, el complejo mTORC1 se activa por fosforilación en Ser2448. Este a su vez fosforila a quinasa ULK1 y Atg13 e inhibe el complejo de iniciación ULK1 y el proceso de autofagia. En condiciones de ayuno nutricional, AMPk inhibe a mTORC1, fosforila y activa a ULK1, lo que desencadena una cascada de fosforilación de distintos componentes del complejo de iniciación ULK1 que promueve la inducción de la autofagia en la célula.

motivo denominado región de interacción con LC3 (LIR, del inglés *LC3-Interacting Region*) presente en el sustrato que le permite asociarse al autofagosoma. En otros casos, los sustratos reclutan receptores autofágicos, tal como la proteína p62/Secuestrosoma-1, que actúa como un adaptador entre el sustrato carga y el autofagosoma [30]. De acuerdo con la naturaleza de la carga, el proceso se puede denominar, por ejemplo: mitofagia (degradación de mitocondrias), reticulofagia (degradación del RE), agregofagia (degradación de agregados), entre otros.

El adaptador autofágico p62 no posee actividad enzimática intrínseca, en cambio actúa como una plataforma multidominio que interactúa selectivamente con diferentes proteínas de señalización. De esta forma, regula múltiples funciones celulares, incluyendo la inflamación, la apoptosis y la autofagia [31, 32]. Estructuralmente, p62 contiene seis motivos funcionales, incluyendo el dominio Phox y Bem1p (PB1), un dominio de dedo de zinc tipo ZZ (ZZ), un sitio de unión a TRAF6 (TB), una región de interacción con LC3 (LIR), una región de unión a Keap1 (KIR) y un dominio C-terminal de interacción con ubiquitina (UBA, del inglés *UBiquitin-Associated domain*) (**Figura 5**). Los dominios PB1, ZZ y TB actúan como eje de andamiaje en varias vías de señalización celular, como en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), en la señalización del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*) y en la activación de caspasas [30, 33-37]. A través del dominio UBA y LIR, p62 media la asociación de la maquinaria autofágica con sus sustratos [38].

En células, p62 se puede hallar como monómero, o formando oligómeros conocidos como cuerpos de inclusión de p62 o secuestrosomas. Los secuestrosomas son condensados proteicos del tipo gotas líquido-gel (del inglés *low liquidity gel droplets*)

que se forman por homo-oligomerización del receptor a través del dominio PB1 [39-41]. Estas estructuras presentan un patrón de expresión punteado y esféricamente simétrico en células, sin embargo, cuando se acumulan pueden adoptar una morfología irregular. En general, debido a la dimensión que poseen los sustratos autofágicos, muchos receptores oligomerizan para obtener una mejor exposición de sus dominios y así aumentar su afinidad por la carga [42]. El estado oligomérico de p62 actúa como un gran andamio molecular, cuya estructura le permite interactuar con la membrana del fagoforo a través de múltiples motivos LIR, y receptor estructuras biológicas tan grandes como agregados u organelas, de hasta un tamaño micrométrico [30]. De este modo, la oligomerización de la proteína adaptadora p62 facilita la asociación y secuestro de la carga, estabiliza la interacción con LC3 y favorece su entrega a los autofagosomas [43-47].

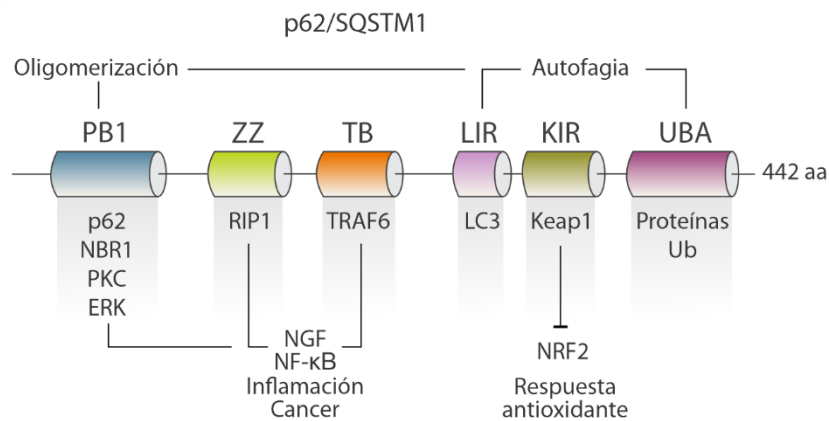


Figura 5. Estructura multidominio de p62. La proteína p62 contiene seis dominios funcionales principales necesarios para la auto-oligomerización e interacción con otras proteínas de señalización en las vías autofágicas e inflamatorias. El dominio N-terminal Phox y Bem1p (PB1) media la auto-oligomerización de p62, así como la unión con otras proteínas que contienen PB1, como NBR1, PKC y ERK. El dominio de unión de dedo de zinc (ZZ) y el sitio de unión de TRAF6 (TB) regulan la señalización inflamatoria a través de NF-κB. A través de la región de interacción con KEAP1 (KIR), Keap1 se estabiliza y el factor de transcripción Nrf2 es capaz de translocar al núcleo celular y promover la transcripción de genes antioxidantes críticos en la defensa contra el estrés oxidativo. La región de interacción con LC3 (LIR) media la asociación de p62 con la familia de proteínas LC3, facilitando la degradación de sus cargas. El dominio C-terminal UBA es necesario para la asociación de p62 con proteínas y organelas marcadas con ubiquitina y degradación por la maquinaria autofágica. aa: aminoácidos.

Sistema ubiquitina-proteasoma

En células eucariotas, el principal sistema de degradación de proteínas regulatorias, estructuralmente dañadas o de vida media corta es el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés *Ubiquitin-Proteasome System*). La maquinaria proteolítica de este sistema, el complejo proteasoma 26S, es la encargada de procesar entre el 80 y 90 % de las proteínas aberrantes en la célula. La degradación de proteínas por la vía UPS consta de dos etapas; en primer lugar, se produce la conjugación de una

o varias moléculas de ubiquitina (Ub) con el sustrato, un proceso conocido como ubiquitinación postraducciona. En una segunda etapa, se produce la proteólisis del sustrato por el complejo proteolítico 26S y la subsecuente liberación de las moléculas de Ub [48].

La Ub es una proteína de 76 aminoácidos y 8,6 kD, altamente conservada en eucariotas, que constituye la principal señal de degradación del proteasoma [49]. En el proceso de ubiquitinación, la Ub se une covalentemente a las proteínas sustrato a través de un enlace isopeptídico formado entre la glicina C-terminal (G76) de la Ub y el grupo ϵ -amino de una lisina (Lys) dentro de la molécula blanco o de la propia Ub. Este proceso es orquestado por una cascada enzimática que involucra una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una o varias enzimas conjugadoras de la ubiquitina (E2) y una o varias ubiquitinas ligasas (E3). La cascada de reacción inicia cuando la enzima E1 cataliza la activación de la Ub libre. A continuación, la enzima E2 se une transitoriamente a la Ub activada y finalmente, la enzima E3 cataliza la transferencia de la Ub desde la E2 a un residuo de Lys en la proteína blanco [50]. Dado que la molécula de Ub contiene siete Lys conservadas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), se pueden formar cadenas de Ub (poliubiquitina) que pueden adoptar diferentes topologías dependiendo de la unión de la glicina a cualquiera de las siete Lys. El destino final de la proteína blanco dependerá de la conformación de la cadena de Ub. Por ejemplo, cadenas de poliubiquitina conectadas a través de Lys 48 marcan proteínas que serán degradadas en el proteasoma 26S y las marcadas por Lys 63 son dirigidas a procesos de endocitosis o se emplearán en la señalización intracelular y la reparación del ADN [51-53]. Luego del reconocimiento del sustrato, la cadena de poliubiquitina es desensamblada por enzimas deubiquitinasas para obtener los monómeros de Ub que serán reutilizados en nuevos ciclos de ubiquitinación. En células de mamíferos, existen muchos reguladores e inhibidores del proteasoma, algunos actúan de manera reversible como el péptido sintético MG132, y otros de manera irreversible como el agente quimioterapéutico, Bortezomib [54, 55].

Interrelación entre el UPS y la autofagia

La proteólisis en las células eucariotas está mediada principalmente por el sistema UPS y la autofagia. Si bien cada una de estas vías cuenta con una maquinaria con la cual operan de manera independiente, éstas comparten componentes claves que les permiten cooperar en el mantenimiento de la proteostasis. En la vía UPS, la Ub actúa como una señal de degradación que puede ser reconocida por los adaptadores del complejo proteasomal 26S. Sin embargo, cuando los sustratos ubiquitinados son

resistentes a la degradación proteasomal, por ejemplo, debido a su naturaleza propensa a formar agregados, o cuando se acumulan más allá de la capacidad celular, pueden ser reconocidos por el adaptador autofágico p62 [39, 56]. En este mecanismo, los sustratos ubiquitinados interactúan de forma no covalente con p62 a través de su dominio UBA [57, 58]. No obstante, si los sustratos poliubiquitinados no son rápidamente procesados, tienden a formar pequeños agregados citoplasmáticos, que por intermedio de la histona deacetilasa 6 y chaperonas moleculares, son transportados hacia el centro organizador de microtúbulos (mTOC, del inglés, *MicroTubule-Organizing Center*) donde se almacenan temporalmente. Estos agregados ubiquitinados se acumulan en la región perinuclear de la célula formando inclusiones citoplasmáticas conocidas como agresomas [59-61]. Los agresomas son reconocidos y secuestrados por los secuestrosomas para su procesamiento en el autofagosoma. De este modo, la Ub no sólo actúa como un determinante molecular en la degradación proteica mediante el sistema del proteasoma, sino también en la autofagia selectiva mediada por p62 [39, 58, 62]. Este mecanismo de cooperación interproteolítico prevalece en condiciones de saturación o inhibición proteasomal, y particularmente en los procesos de agregación proteica que conducen a la neurodegeneración y enfermedades hepáticas y musculares.

ARGINILACIÓN POSTRADUCCIONAL DE PROTEÍNAS

Modificación postraduccion de proteínas

Durante la vida de las células, desde organismos unicelulares o pluricelulares, las condiciones ambientales cambian, a veces con gran rapidez, y las células necesitan adaptarse a esos cambios. Un nuevo ambiente puede requerir un aumento o disminución de la actividad de determinadas proteínas, un cambio en la localización, la separación o unión de unas proteínas con otras, la síntesis o proteólisis de algunas proteínas, para la supervivencia de la célula. Esta información puede incorporarse a las proteínas mediante la adición o sustracción de grupos químicos que se unen a aminoácidos específicos en posiciones definidas de la cadena polipeptídica mediante un mecanismo de modificación covalente conocido como *Modificación Postraduccion de Proteínas*. Las proteínas pueden sufrir una gran variedad de modificaciones postraduccionales, tales como, la unión covalente de pequeñas moléculas como ácidos grasos (por ejemplo, la adición de un ácido palmítico, o palmitoilación), la unión de carbohidratos o glicosilación, la unión de proteínas (por ejemplo, la adición de Ub, o ubiquitinación), la fosforilación, la acetilación, la metilación, e incluso la incorporación de aminoácidos postraduccionales o aminoacilación de proteínas [63, 64]. Dotar a las proteínas de ese nuevo contenido informativo que determina la intensidad, la localización, el momento, la situación, los acompañantes, entre otros, de su actividad, representa la función esencial de las modificaciones postraduccionales.

Incorporación postraduccionales de aminoácidos

En 1963, Kaji y colaboradores observaron que determinados aminoácidos marcados radioactivamente eran incorporados a proteínas independientemente de los componentes de la maquinaria de traducción convencional y por mecanismos dependientes de ARN de transferencia (ARNt). Este fenómeno, observado tanto en procariontes [63, 65-67], como en eucariotes [64, 68-71] fue sorprendente, ya que se suponía que la incorporación de aminoácidos dependientes de ARNt en las proteínas debía estar acoplado a la síntesis *de novo* de proteínas. Finalmente, se demostró que este nuevo fenómeno constituía una modificación postraduccionales previamente desconocida que dependía de enzimas aminoacil-ARNt transferasas, capaces de modificar proteínas mediante la adición de residuos Arginina (Arg) en células eucariotas y Leucina (Leu) y/o Fenilalanina (Phe) en bacterias [63-68, 72, 73]. A diferencia de la maquinaria de traducción, este proceso no requiere de ribosomas, ácidos nucleicos como molde, guanil trifosfato, y no es afectado por inhibidores de la síntesis proteica.

Cabe destacar que existen antecedentes donde las aminoacil-ARNt transferasas actúan en procesos no relacionados a la síntesis de proteínas, por ejemplo: glicil-ARNt y treonil-ARNt transferasas que participan de la biosíntesis de la pared celular bacteriana y en la formación de derivados de fosfatidilglicerol, respectivamente [73]. En células eucariotas, el proceso de adición de Arg, actualmente denominado **Arginilación postraduccional**, no es la única modificación por adición de aminoácidos, dado que también existen enzimas que median la glicilación postraduccional (adición de glicina; [74]), glutamilación (adición de Glu; [75]) y la tirosinación (adición de Tyr; [76-80]); sin embargo, estas modificaciones fueron descritas principalmente para la proteína tubulina y no requieren de aminoacil-ARNt.

Arginilación postraducción de proteínas

La arginilación postraduccional de proteínas es una modificación en la que se transfiere selectivamente un residuo Arg a una proteína aceptora por intermedio de un ARNt. La enzima que cataliza esta transferencia se conoce como **Arginil-ARNt transferasa (Ate1**, del inglés *Arginine Transfer Enzyme*) [63-66, 68, 81]. Esta reacción se desarrolla en dos etapas, inicialmente, un residuo Arg se conjuga con un ARNt específico de Arg (ARNt^{ARG}) para formar el arginil-ARNt^{ARG}. Esta reacción es catalizada por la enzima arginil-ARNt-sintetasa y requiere de ATP, magnesio y potasio como co-factores (**Figura 6a**). En una segunda etapa, la enzima Ate1 cataliza la incorporación de Arg desde el arginil-ARNt^{ARG} al carbono N-terminal de residuos ácidos glutámico (Glu), aspártico (Asp) o cisteína (Cys), una reacción que se conoce como arginilación N-terminal (**Figura 6b**). Además, Ate1 es capaz de mediar la adición de Arg presumiblemente a través del grupo γ -carboxilo de la cadena lateral de los residuos Asp ó δ -carboxilo de Glu y el grupo α -amino de la Arg, una reacción denominada arginilación de cadena lateral (**Figura 6b, c**) [82, 83]. En la reacción de arginilación N-terminal, los sustratos son previamente procesados por enzimas caspasas, separasas, metaloproteasas o calpaínas, para exponer un residuo Glu, Asp o Cys, los cuales podrán ser modificados postraduccionalmente. Por el contrario, en la arginilación en cadena lateral, los residuos no requieren procesamiento previo para ser modificados. Si bien no existe una secuencia consenso que permita identificar a los posibles sustratos de esta modificación, se ha reportado que la arginilación ocurre en entornos ligeramente positivos y/o ricos en residuos polares [84].

En mamíferos, el ARNt^{ARG} está representado por 24-28 genes que codifican 5 iso-aceptores de Arg. Recientemente, se demostró que todos los iso-aceptores ARNt^{ARG} pueden ser utilizados como donantes de Arg tanto para Ate1 como para los ribosomas,

poniendo a la reacción de arginilación en una competencia directa con la maquinaria de síntesis de proteínas [85].

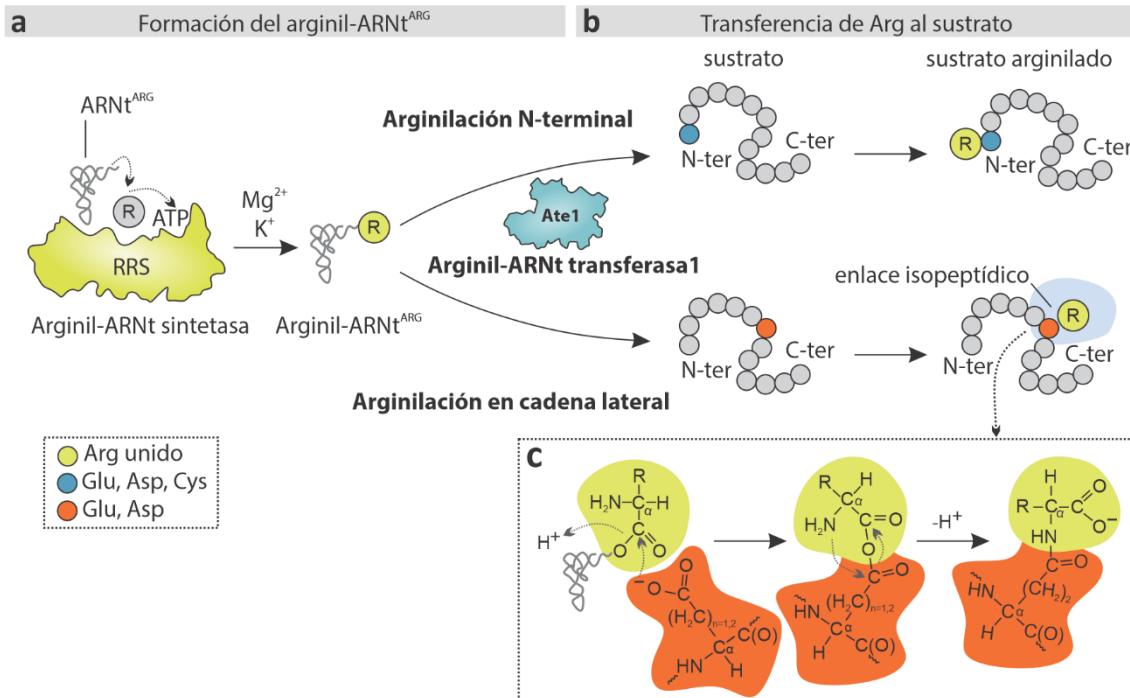


Figura 6. Reacción de arginilación posttraducción de proteínas. (a) Un residuo de Arg libre es conjugado a un ARNt^{ARG} por acción de la enzima arginil-ARNt sintetasa en presencia de ATP y cofactores (magnesio y potasio). (b) La enzima arginil-ARNt transferasa (Ate1) cataliza la transferencia de Arg desde el arginil-ARNt^{ARG} al extremo N-terminal de residuos Glu, Asp o Cys (Arginilación N-terminal). En mamíferos, la adición de Arg ocurre en los grupos α-amino terminal de ácido aspártico (Asp), glutámico (Glu) ó cisteína (Cys) a través de una unión peptídica. La cisteína no es directamente modificada, sino que primero es oxidada a ácido sulfónico Cys [CysO₃(H)] u ácido sulfinico [CysO₂(H)], cuyas estructuras son similares a Asp. Existe otros mecanismo en el que Arg se incorpora en la cadena lateral de residuos Glu y Asp internos de un sustrato (Arginilación de cadena lateral). (c) La reacción de arginilación en cadena lateral implica la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo α-amino de Arg y el carbono γ de Asp ó δ de Glu.

ARGINIL-ARNt TRANSFERASA (Ate1)

Biosíntesis

Ate1 es una proteína evolutivamente conservada en todas las especies eucariotas, tanto en animales, como plantas, levaduras y hongos [70, 86-91]. En ratón, esta enzima está codificada por un único gen, *ate1*, que posee un total de 12 exones (**Figura 7a**). Este gen combina selectivamente los exones 1 y 7 para dar origen a cuatro variantes proteicas alternativas, mientras que los exones 2-6 y 8-12 están presentes en el ARN mensajero (ARNm) que codifica para todas las isoformas de Ate1 (**Figura 7b**). Así, las variantes se diferencian por la elección mutuamente excluyente de dos exones homólogos y adyacentes (7A o 7B) y por la elección alternativa del exón inicial (1A o 1B) [89, 90, 92]. Reflejando estas diferencias, las cuatro isoformas se han designado

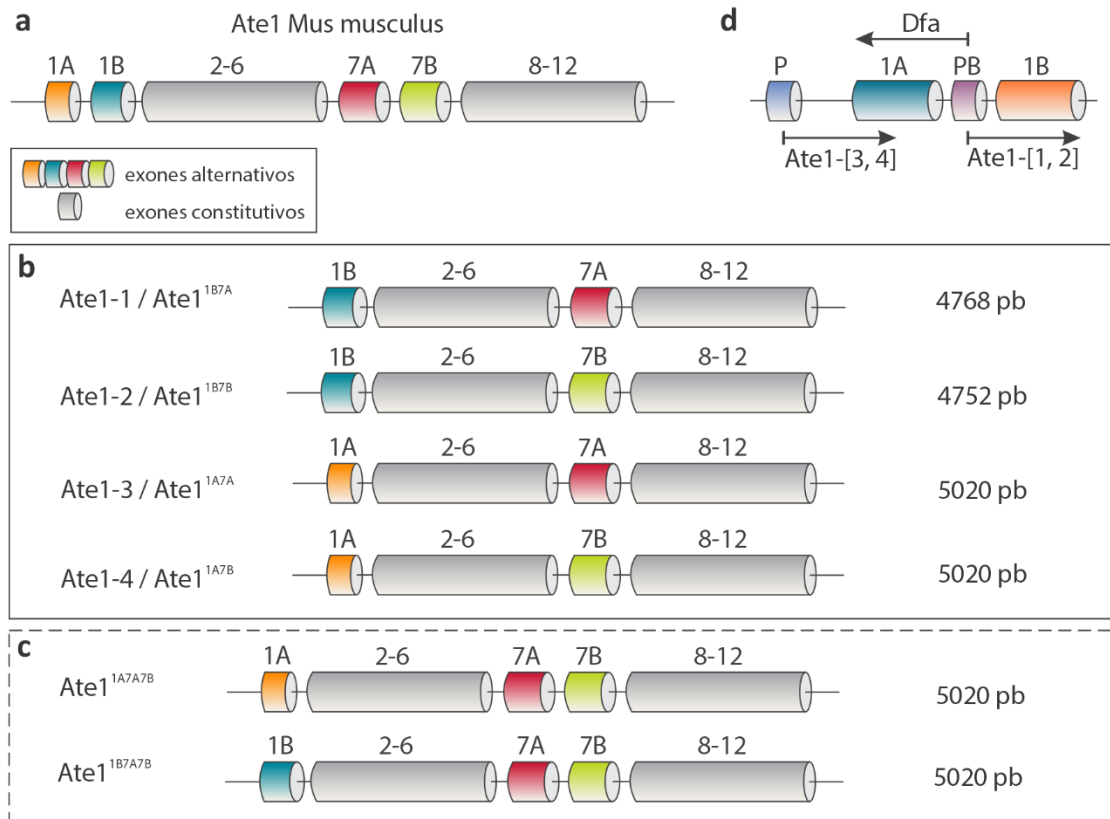


Figura 7. Isoformas de Ate1 en *Mus musculus*. (a) Exones alternativos (1 y 7) y constitutivos (2-6 y 8-12) del gen *ate1* de ratón. (b) Isoformas alternativas identificadas a nivel proteico: Ate1-1, Ate1-2, Ate1-3 y Ate1-4. (c) Isoformas identificadas como ARNm: Ate1-1A7A7B y Ate1-1B7A7B (d) Posición del promotor (P) y del promotor bidireccional (PB) y expresión de las variantes de Ate1 y Dfa (del inglés, *Divergent From Ate1*) pb: pares de bases.

como Ate1-1 (Ate1^{1B7A}), Ate1-2 (Ate1^{1B7B}), Ate1-3 (Ate1^{1A7A}) y Ate1-4 (Ate1^{1A7B}). Se ha identificado el ARNm de dos nuevas isoformas que conservan ambos exones 7, designadas Ate1^{1A7A7B} y Ate1^{1B7A7B}, sin embargo, el producto proteico de las mismas aún no ha sido verificado (**Figura 7c**). Además, cuando estas variantes se expresan como proteínas recombinantes, su actividad es menor comparada con las isoformas que poseen una sola copia del exón 7 [92]. De este modo, la síntesis y el procesamiento *in vivo* del ARNm inmaduro de *ate1* produce al menos cuatro isoformas activas en ratón: Ate1-1, Ate1-2, Ate1-3 y Ate1-4.

Estructura

Ate1 pertenece a la superfamilia de aminoaciltransferasas que junto a las enzimas bacterianas Leu/Phe-ARNt transferasa (L/F transferasa) de *Escherichia coli*, FemA/FemB de *Staphylococcus aureus* y FemX de *Weissella viridescens*, se caracterizan por mediar la transferencia de aminoácidos a través de un ARNt [93-96]. Aunque actualmente no está disponible la estructura cristalográfica de Ate1, se presume que tiene homología estructural con estas aminoaciltransferasas procariontas,

funcionalmente similares [94, 95, 97]. Particularmente, las transferasas procariotas poseen en su conformación tridimensional un dominio estructural similar al de las enzimas N-acetiltransferasas (NAT), denominado GNAT (del inglés, *General Control Nonrepressed 5 related N-acetylTransferase*). Las NATs acetilan una variedad de sustratos utilizando acetil-coenzima A (CoA) como cofactor [98]. Aunque numerosas familias de transferasas poseen un dominio GNAT, muchas de estas enzimas actúan con otro cofactor, como las aminoaciltransferasas procariotas que han evolucionado para utilizar un ARNt aminoacilado en lugar de acetil-CoA [99]. La transferasa eucariota Ate1 consta de dos dominios, altamente conservados entre sus homólogos, denominados Ate1-C y Ate1-N (**Figura 8a**). Por métodos de comparación de secuencias, se demostró que estos dominios son estructuralmente similares al dominio GNAT presente en las transferasas procariotas de la familia Fem, y coinciden con la predicción de la estructura terciaria de Ate1 (**Figura 8b**) [90]. De acuerdo con la disposición y conservación de estos dominios en la molécula de Ate1, se presume que el dominio C-terminal actúa como sitio de unión al ARNt aminoacilado, mientras que el N-terminal estaría involucrado en el reconocimiento e interacción con los sustratos. Esta distribución es compatible con un modelo evolutivo en el que ha surgido una enzima por división del antiguo dominio GNAT (dupli-GNAT) y se adaptó para usar ARNt en lugar de acetil-CoA como donante de un grupo acilo [100, 101].

Actividad y localización

En ratones, el nivel de ARNm de las distintas isoformas de Ate1 varía según el tipo de tejido. Si bien las variantes Ate1-1 y Ate1-2 se expresan en todos los tejidos y etapas de desarrollo; la proporción de ARNm Ate1-1/2 es diferente (0,1 en el músculo esquelético; 0,25 en el bazo; 3,3 en el hígado y el cerebro y 10 en los testículos) [89]. Por su parte, las isoformas Ate1-3 y Ate1-4 están más enriquecidas en ciertos tejidos. Ate1-3 se expresa principalmente en animales adultos y es más abundante en testículos, riñón, hígado y cerebro. Ate1-4 se expresa en embriones y crías, y en varios tejidos del animal adulto; incluidos, el cerebro, el corazón, el hígado, el bazo, los testículos y, en menor medida, en la médula espinal [89, 90]. Las diferencias entre Ate1-1/Ate1-2 y Ate1-3/Ate1-4 se correlacionan con el mecanismo de acción de las mismas. La actividad de Ate1 se ha evaluado en función de su capacidad para modificar sustratos *in vivo* e *in vitro*. Este análisis demostró que aquellas que comparten el exón 1B, es decir Ate1-1 y Ate1-2, modifican preferentemente los residuos Asp y Glu en la posición N-terminal. Por su parte, Ate1-3 y Ate1-4, que comparten el exón 1A, actúan a nivel del grupo R de estos mismos residuos. De este modo, Ate1-1 y Ate1-2 catalizan

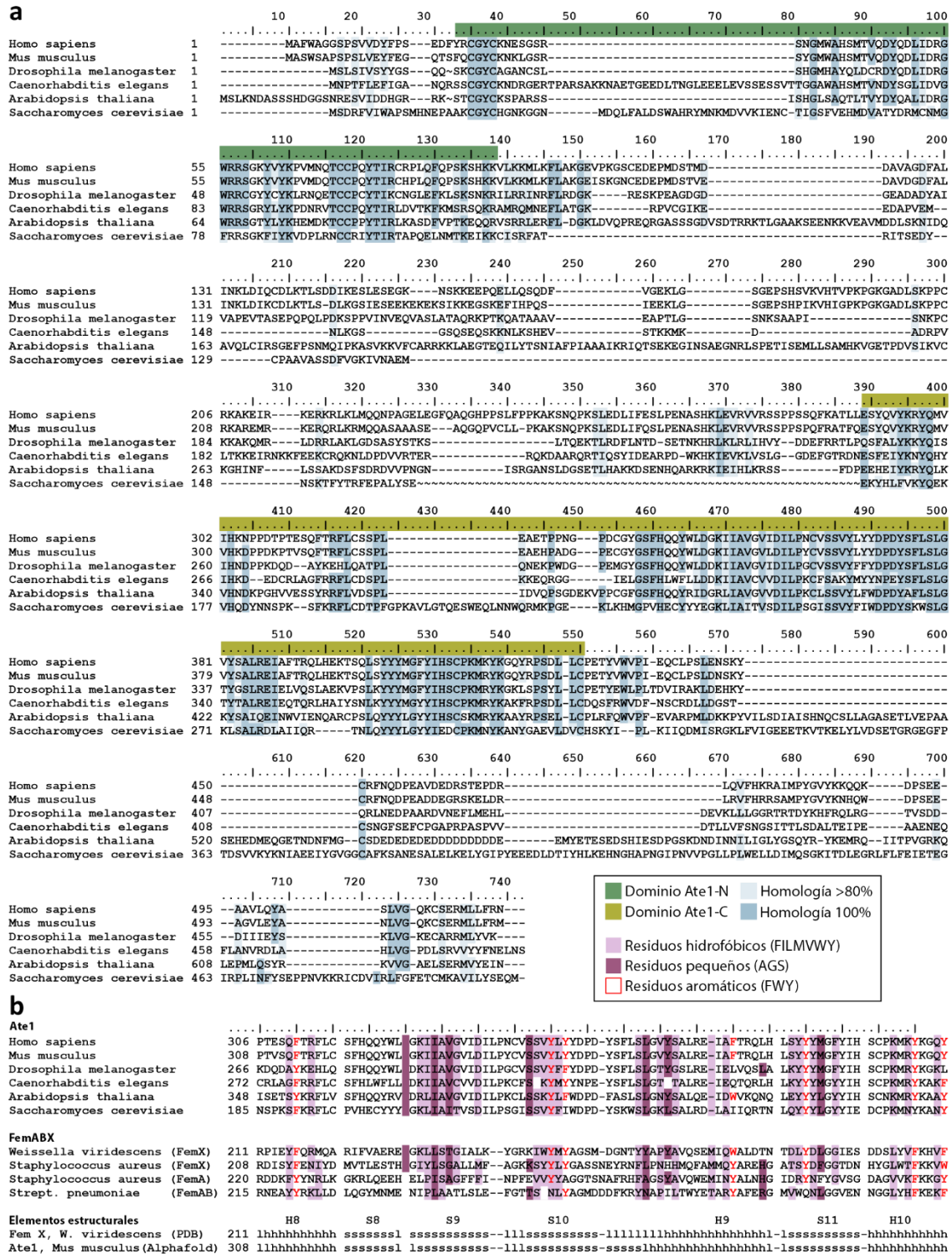


Figura 8. Secuencia proteica de homólogos de Ate1. (a) Alineamiento de las secuencias de Ate1 *Homo sapiens* (NP_001001976.1), *Mus musculus* (NP_038827.2), *Drosophila melanogaster* (NP_477394.3), *Caenorhabditis elegans* (NP_492549.2), *Arabidopsis thaliana* (At5g05700) y *Saccharomyces cerevisiae* (AJS07672.1). **(b)** Alineamiento del dominio C-terminal (pfam04377) de Ate1 con el dominio estructural GNAT presente en distintas transferasas de la familia Fem. Los elementos estructurales presentes en el dominio GNAT de la transferasa FemX de *W. viridescens* se compararon con la predicción de la estructura terciaria del dominio C-terminal de Ate1 de ratón (*Mus musculus*). La predicción se obtuvo mediante el programa de inteligencia artificial AlphaFold desarrollado por DeepMind de Alphabets/Google [102].

preferentemente la arginilación N-terminal; mientras que, Ate1-3 y Ate1-4 facilitan la arginilación en cadena lateral [83]. Dado que el exón 1 está ubicado en el dominio N-terminal de la proteína, esta región podría estar relacionada con la especificidad y actividad de la enzima.

En células, la localización de las isoformas de expresión endógena no ha sido confirmada. Sin embargo, cuando se expresan como proteínas recombinantes, la distribución de cada variante muestra ciertas diferencias. La variante Ate1-1 se distribuye en el citosol y en el núcleo de la célula, mientras que, Ate1-2 es de localización exclusivamente citosólica. Ate1-3, que posee mayor identidad con Ate1-1, está presente en el citosol y en el núcleo; mientras que Ate1-4, que presenta una mayor identidad con Ate1-2, se localiza en el citoplasma de la célula [89, 90]. Estas diferencias de expresión y distribución de las variantes de Ate1 señala que esta modificación podría estar involucrada en diversos procesos biológicos.

Función

Originalmente, la arginilación postraducciona l fue propuesta como un mecanismo que regula la estabilidad metabólica de proteínas. La adición de Arg en la posición N-terminal actúa como una señal de reconocimiento que facilita la ubiquitinación de residuos internos de Lys y la degradación de sustratos por la vía UPS en eucariotas [103, 104], y por la proteasa ClpAP tipo proteasoma en bacterias [105]. La Arg N-terminal junto al residuo interno de Lys actúan como un determinante molecular, denominado N-degron [106]. Las proteínas que poseen un N-degron son dirigidas y procesadas por el complejo proteasomal 26S; en consecuencia, tienen una menor vida media que sus variantes no arginiladas. Este sistema proteolítico se conoce actualmente como vía del N-degron, anteriormente conocido como Regla de la N [103, 104, 107]. Se han identificado numerosos sustratos de esta vía, por ejemplo, la α -lactalbúmina, la ornitina decarboxilasa, la chaperona BIP, proteínas reguladoras de la señalización por proteína G (RGS, del inglés *Regulated G Signaling*) tales como, RGS4, RGS5, RGS16, RGS7, entre otras [108-112].

Contrariamente a lo que la vía del N-degron predice, se identificaron distintas proteínas arginiladas metabólicamente estables; entre ellas, proteínas asociadas al citoesqueleto, como β -actina, tubulina, miosina, talina y proteínas de unión a actina (ABPs, del inglés *Actin Binding Proteins*) como Arp3 [113, 114]. La arginilación de β -actina es esencial para su polimerización y formación de los filamentos de actina [115]. En células derivadas de fibroblastos de ratón deficientes en Ate1, β -actina se encuentra

agregada, lo que resulta en filamentos más cortos [116, 117]. A nivel celular, esto provoca una desorganización de los lamelipodios y defectos en la migración, un efecto que también se le atribuye a una falla en la interacción de actina con las ABPs. Recientemente, demostramos que Ate1 está involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina en oligodendrocitos, promoviendo la remodelación de la membrana plasmática, y facilitando el proceso de diferenciación y mielinización axonal [118]. En neuronas, Ate1 se localiza en los conos de crecimiento junto con β -actina arginilada donde impulsa la migración y el crecimiento de neuritas. La ausencia de Ate1 en estas células, resulta en una reducción en el crecimiento de neuritas y en la migración de la neurona, enfatizando la importancia de la arginilación para la correcta función del citoesqueleto de actina [119].

Algunos sustratos de arginilación son proteínas residentes del RE, como la chaperona Calreticulina (CRT) [120]. Tras su retrotranslocación al citoplasma, CRT es arginilada (R-CRT) por intermedio de Ate1, esto induce la dimerización y estabilización de la proteína, condiciones esenciales para su asociación a los gránulos de estrés [121, 122]. Contrariamente a lo esperado, R-CRT tiene una mayor vida media que CRT [123]. Estos antecedentes demuestran que la función de la arginilación no solo está relacionada con la regulación proteolítica de proteínas, sino también, con procesos como la adhesión y migración celular, reorganización del citoesqueleto y diferenciación celular. 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*.

Procesos fisiológicos regulados por Ate1

Modelos murinos de delección de Ate1

Múltiples líneas de investigación se han enfocado en la implicancia de Ate1 en la regulación de procesos fisiológicos. Se desarrollaron distintos modelos murinos de delección de Ate1, específica de tejidos (Ate1 cKO, del inglés *conditional knockout*) o constitutiva (Ate1 KO). Una de las primeras evidencias de la importancia de Ate1 *in vivo* reveló que los ratones Ate1 KO homocigotas no son viables y mueren durante la gestación; principalmente, debido a defectos en el desarrollo cardiovascular, en la contractilidad del músculo cardíaco y a nivel del sistema nervioso central (SNC) por alteraciones en el desarrollo del tubo neural [124-126]. Por su parte, la delección

postnatal de Ate1 (constitutiva e inducible con tamoxifeno) afecta múltiples procesos fisiológicos que conducen a la pérdida de peso, retraso mental e infertilidad, y que ocasionalmente culminan en la muerte temprana del animal [127]. La delección de Ate1 específica en tejidos y órganos de ratones causa una variedad de anomalías morfológicas y funcionales en el animal. La supresión de Ate1 en el músculo cardíaco impulsada por el promotor de la cadena pesada de la α -miosina, produce una cardiomiopatía dilatada progresiva que conduce a una elevada tasa de letalidad después de los 6 meses de edad [128]. En el músculo esquelético, la delección de Ate1 impulsada por el promotor de creatina quinasa produce una reducción significativa de las fuerzas contráctiles de las fibras musculares, mientras que la expresión de la enzima ejerce un efecto directo sobre la fuerza muscular a través de la arginilación de la miosina [129]. En ratones que carecen específicamente de Ate1 en las plaquetas y en megacariocitos, la ausencia de arginilación en miosina afecta a la retracción del coágulo y aumenta la formación de trombos *in vivo* [130]. Por otro lado, la ausencia de la enzima en pre-adipocitos inhibe su diferenciación a adipocitos maduros, debido a la disminución de la expresión de dos factores de transcripción adipogénicos: PPAR γ y C/EBP α , los cuales son claves en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adiposo [131]. Además, se ha demostrado que la delección condicional de Ate1 impulsada por el promotor Tek causa anomalías en la gametogénesis [132]. En el sistema nervioso, la delección de Ate1 en células de la cresta neural produce defectos en la morfogénesis craneofacial durante el desarrollo [133].

Implicancias fisiopatológicas de Ate1

En el SNC, la arginilación N-terminal de fragmentos peptídicos naturales como Tau, TDP43, β -amiloide y α -sinucleína, facilita su degradación y previene la acumulación de agregados asociados con enfermedades neurodegenerativas [134, 135]; mientras que en el sistema nervioso periférico (SNP), estudios previos sugieren que Ate1 está involucrada en la regeneración axonal después de una injuria [136-140].

La arginilación está involucrada en la respuesta fisiológica a muchos factores estresantes que se asocian comúnmente con el riesgo de cáncer. La pérdida o reducción de Ate1 aumenta la resistencia de células cancerígenas a una variedad de factores como el estrés oxidativo, térmico, osmótico y a metales pesados, toxinas y radiaciones [141-143]. No solo conduce a una mayor tolerancia al estrés, sino también a un aumento de la frecuencia de mutaciones, ambos factores de riesgo de metástasis [144, 145]. En células de fibroblastos derivados de ratones Ate1 KO, la ausencia de Ate1 produce un aumento de la tasa de proliferación de la célula y una pérdida de la inhibición

por contacto, lo que conduce a la formación de agrupaciones o *clusters* con múltiples capas de células apiladas [131, 144]. La expresión de E-cadherina está alterada, lo que afecta el contacto célula-célula y la migración de la célula [114, 116]. Además, la expresión de Ate1 está regulada negativamente en varios tipos de cáncer humano y su transcripción se correlaciona inversamente con la progresión metastásica y la supervivencia del paciente. Esto indicaría que Ate1 es esencial para la supresión tumoral y estaría implicada en los procesos metastásicos [144, 145]. En conjunto, estos estudios muestran que Ate1 está involucrada en numerosos procesos celulares que reflejan la importancia de la arginilación postraducciona l en el desarrollo y metabolismo de los seres vivos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La modificación postraduccional de proteínas implica un mecanismo fundamental de regulación de la gran diversidad de funciones biológicas que en conjunto ejecutan. En nuestro grupo, estamos interesados en estudiar el proceso de arginilación postraduccional, tanto desde el punto de vista de su importancia fisiológica, como de su rol en la regulación de mecanismos biológicos. La arginilación ha sido ampliamente estudiada por su implicancia en la degradación de proteínas a través de la regla del N-degron. De acuerdo con esta vía, los sustratos N-terminal arginilados son marcados con Ub y procesados por el complejo proteasomal 26S [146-148]. Al igual que el proteasoma, la maquinaria autofágica cuenta con proteínas adaptadoras capaces de reconocer a las proteínas ubiquitinadas. Además, se ha demostrado que la autofagia puede ser inducida en condiciones de saturación o inhibición del proteasoma [39, 56, 57, 62]. Recientemente, se describió que proteínas N-terminal arginiladas pueden actuar como ligandos activadores del adaptador autofágico p62 durante el proceso de recambio del RE [39, 149]. Conforme con lo planteado anteriormente, la hipótesis de este trabajo de tesis propone que *la arginilación mediada por Ate1 contribuye al reconocimiento de sustratos y facilita el proceso de degradación autofágica*. De este modo, la autofagia podría ser una vía alternativa para la degradación de sustratos marcados con Arg.

En la búsqueda de una mayor comprensión del rol de Ate1 en la regulación de los procesos proteolíticos, este trabajo de tesis presenta los siguientes objetivos:

Objetivo General

Caracterizar aspectos moleculares y funcionales de Ate1 en el proceso de autofagia.

Objetivos Específicos

- 1** | Analizar la distribución subcelular de Ate1 durante la respuesta autofágica inducida por inhibición proteasomal y su estabilidad metabólica.
 - i.** Establecer la localización subcelular de las isoformas de Ate1.
 - ii.** Analizar la compartimentación de Ate1 con relación al adaptador autofágico p62 y las proteínas sustrato poliubiquitinadas.
 - iii.** Determinar la vida media de Ate1 en células que expresan establemente cada isoforma.

- 2** | Estudiar el efecto producido por cambios en la expresión de Ate1 en el mecanismo de la autofagia en cultivo celular.
 - i.** Evaluar el flujo de autofagia en condiciones basales y de inducción de la vía.
 - ii.** Monitorear la degradación de vacuolas y sustratos autofágicos.
 - iii.** Analizar la activación de rutas metabólicas involucradas en la inducción de la autofagia.

CAPÍTULO 1

Distribución subcelular y estabilidad de Ate1

Resultados

En el marco del estudio de Ate1 y su participación en el proceso de autofagia, este capítulo aborda aspectos moleculares y celulares de la enzima y su comportamiento durante la respuesta autofágica impulsada por la inhibición del proteasoma. Mediante métodos bioquímicos y de microscopía confocal se investigó: i) la localización subcelular, ii) la compartimentación y iii) la estabilidad metabólica de Ate1.

i. Localización subcelular de Ate1

Con el propósito de determinar la localización intracelular de Ate1, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Para identificar las distintas isoformas de Ate1, se transfectaron células CHO-K1 con plásmidos conteniendo la secuencia de cada isoforma pGFP-Ate1-1, pGFP-Ate1-2, pGFP-Ate1-3, pGFP-Ate1-4 o con el plásmido control pEGFP-N2. Las células transfectadas se incubaron con MG132 durante 12 h. La inmunotinción de Ate1 se realizó utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo GFP. Como control de la eficacia del tratamiento, se evaluó la acumulación de sustratos de degradación utilizando un anticuerpo contra proteínas poliubiquitinadas (poli-Ub). En las imágenes de microscopía confocal, cada isoforma se expresó como un particulado en el citosol, en el núcleo de la célula, y en algunas regiones cercanas a la membrana plasmática. Por su parte, la señal de proteínas poli-Ub fue prácticamente indetectable, dado que las mismas están siendo degradadas (**Figura 9a-d**, control). Acorde con esto, la inhibición del proteasoma provocó la acumulación de las proteínas poli-Ub, principalmente en la región perinuclear de la célula (**Figura 9a-d**, f. MG132). De manera similar, en esa misma región se observó un enriquecimiento de las isoformas de Ate1. El aumento de los niveles proteicos de cada variante se confirmó en estas células mediante Western blot (**Figura 9g**). En las imágenes de superposición de Ate1 y proteínas poli-Ub, en las que ambos fluoróforos fueron pseudocoloreados (verde y rojo), la resultante colorimétrica (amarillo) indica que ambas señales comparten localización espacial. La cuantificación de esta colocalización se expresó como el coeficiente de correlación de Pearson (r), y junto a los perfiles de intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos, reflejan el grado de acompañamiento de ambas señales (**Figura 9a'-d'**). Por su parte, la proteína control GFP no experimentó mayores cambios (**Figura 9e**, f). Estos resultados muestran que las isoformas de Ate1 se expresan en el núcleo y citosol de la célula y su distribución sugiere que podrían estar asociadas a membranas. Además, la inhibición del proteasoma promueve su redistribución junto a proteínas poli-Ub en la región perinuclear de la célula.

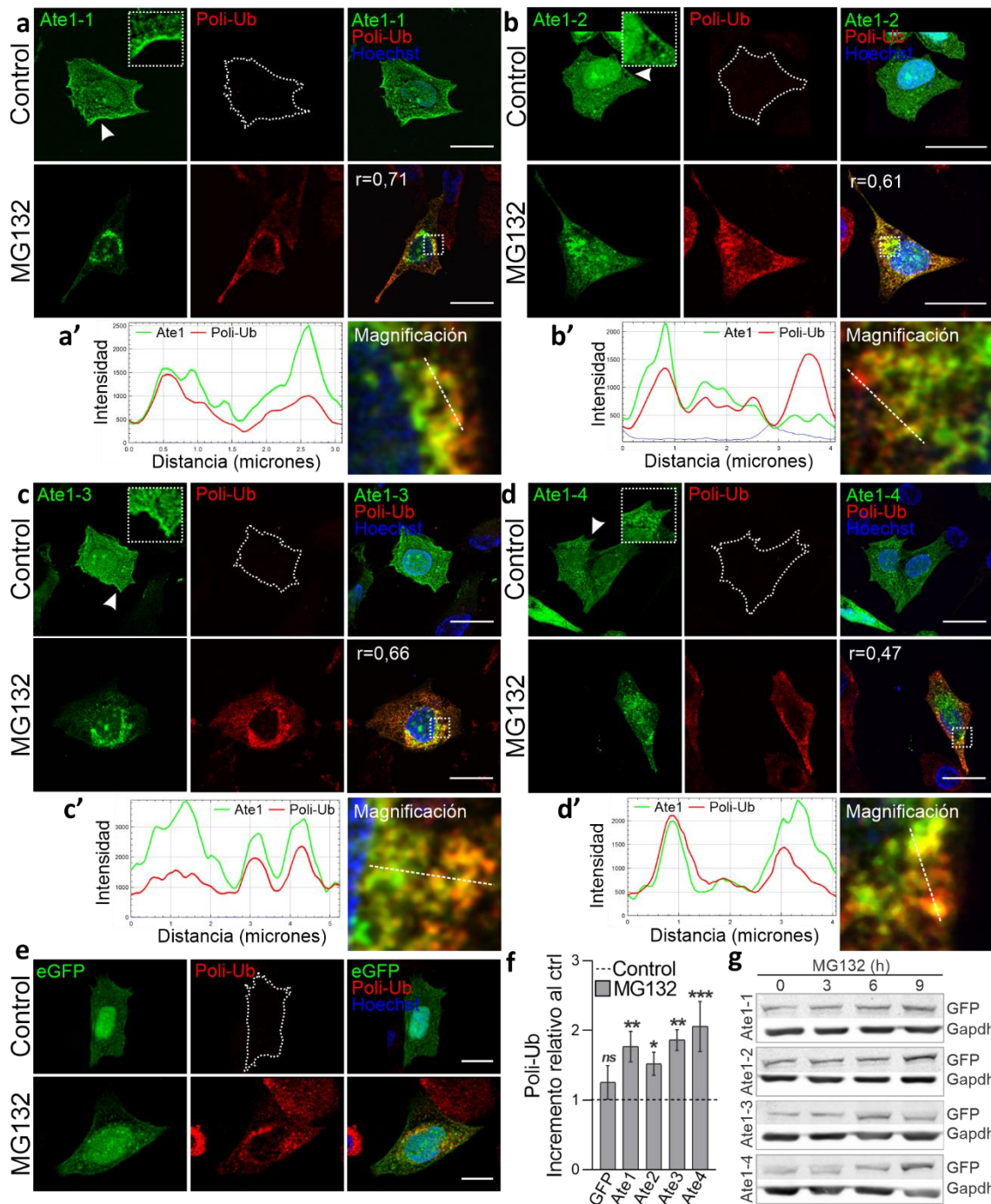


Figura 9. Localización subcelular de las isoformas de Ate1 y proteínas poli-Ub. Células CHO-K1 fueron transfectadas con los plásmidos (a) pGFP-Ate1-1, (b) pGFP-Ate1-2, (c) pGFP-Ate1-3, (d) pGFP-Ate1-4 o (e) pGFP-N2 y tratadas con MG132 10 μ M durante 12 h. Se realizó una inmunotinción y se analizó mediante microscopía confocal. Las isoformas de Ate1 se detectaron utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo GFP. Las proteínas poli-Ub (rojo) se detectaron mediante un anticuerpo que no reconoce a las proteínas mono-Ub. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Los recuadros representan imágenes a mayor magnificación de las regiones señaladas con flechas blancas. El coeficiente de correlación de Pearson está expresado como r . (a'-d') Der. Magnificación del recuadro señalado en la imagen de superposición. Izq. Histograma de los niveles de intensidad de la señal de Ate1 y poli-Ub a lo largo de la línea punteada señalada en el panel Der. (f) Incremento del nivel de proteínas poli-Ub relativo al control. (g) Niveles de la proteína GFP en células CHO-K1 transfectadas con cada isoforma de Ate1 y tratadas con MG132 10 μ M (3, 6 y 9 h). Gapdh se utilizó como control de carga. La cuantificación representa la media \pm EE. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativo. $n=8$. Barra de escala: 10 μ m. **Las variantes de Ate1 se localizan en el núcleo y citosol, y cuando se inhibe el proteasoma, se acumulan en la región perinuclear de la célula junto con proteínas poli-Ub.**

Para evaluar dónde se acumulan las isoformas de Ate1, se realizó un fraccionamiento subcelular a partir de células embrionarias de fibroblastos de ratón (MEFs, del inglés *Mouse Embryonic Fibroblast*) que carecen del gen *ate1* y que expresan establemente y en niveles endógenos cada isoforma individual: MEFs *Ate1-1*, *Ate1-2*, *Ate1-3* y *Ate1-4*. Estas células fueron incubadas con MG132 durante 16 h y se prepararon homogenatos a partir de los cuales se aislaron extractos de proteínas citosólicas, de membranas (RE, Golgi, mitocondria y membrana plasmática), nucleares, unidas a cromatina y asociadas al citoesqueleto. Las muestras se analizaron mediante Western blot. Gapdh, vimentina y proteínas totales se utilizaron como controles endógenos del fraccionamiento (**Figura 10**).

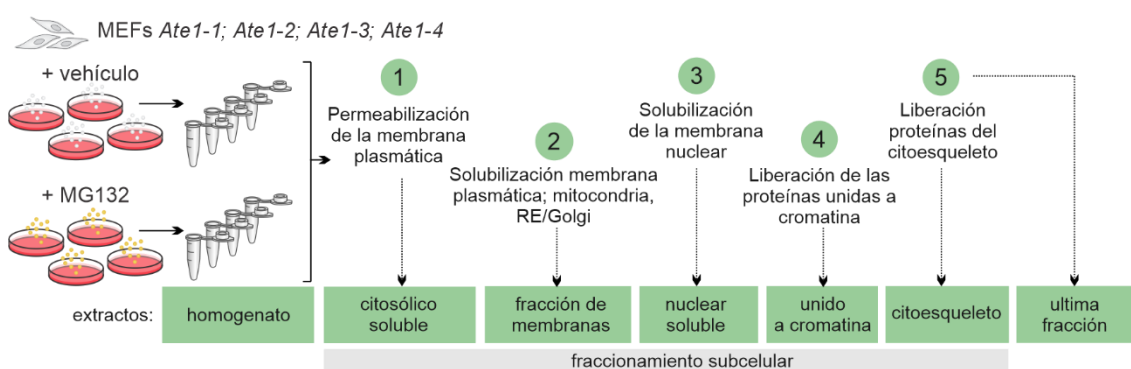


Figura 10. Modelo experimental del fraccionamiento subcelular. Células MEFs *Ate1-1*, -2, -3 y -4 fueron incubadas con MG132 10 μ M durante 16 h. Los homogenatos se sometieron a un proceso de fraccionamiento subcelular mediante un kit de separación de proteínas de células en cultivo, según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Se obtuvieron extractos de proteínas citosólicas, proteínas de membranas del RE, Golgi, mitocondria y membrana plasmática, proteínas nucleares solubles, proteínas unidas a cromatina, proteínas asociadas al citoesqueleto y la última fracción.

De acuerdo con lo esperado, las cuatro variantes se recuperaron mayoritariamente en la fracción de proteínas citosólicas y nucleares solubles (visible cuando se satura la imagen) (**Figura 11**). No obstante, más del 25 % de Ate1 se detectó en la fracción de proteínas asociadas a membranas (**Figura 11. Control**). Al inhibir el proteasoma, se observó una disminución de Ate1 en las fracciones citosólica y de membranas, acompañado de un aumento en la fracción de proteínas asociadas al citoesqueleto. Además, en esta última, se visualiza una segunda banda de Ate1 de mayor peso molecular, que se presume podría tratarse de una modificación postraducciona de la enzima (**Figura 11. MG132**). Estos resultados muestran que las isoformas de Ate1 se distribuyen de manera comparable en el citosol y núcleo de la célula. Además, se puede evidenciar, por primera vez, la asociación de Ate1 a membranas. En concordancia con la localización perinuclear observada en la Figura 9, la inhibición del proteasoma provoca una redistribución de la enzima y un enriquecimiento en la fracción de citoesqueleto.

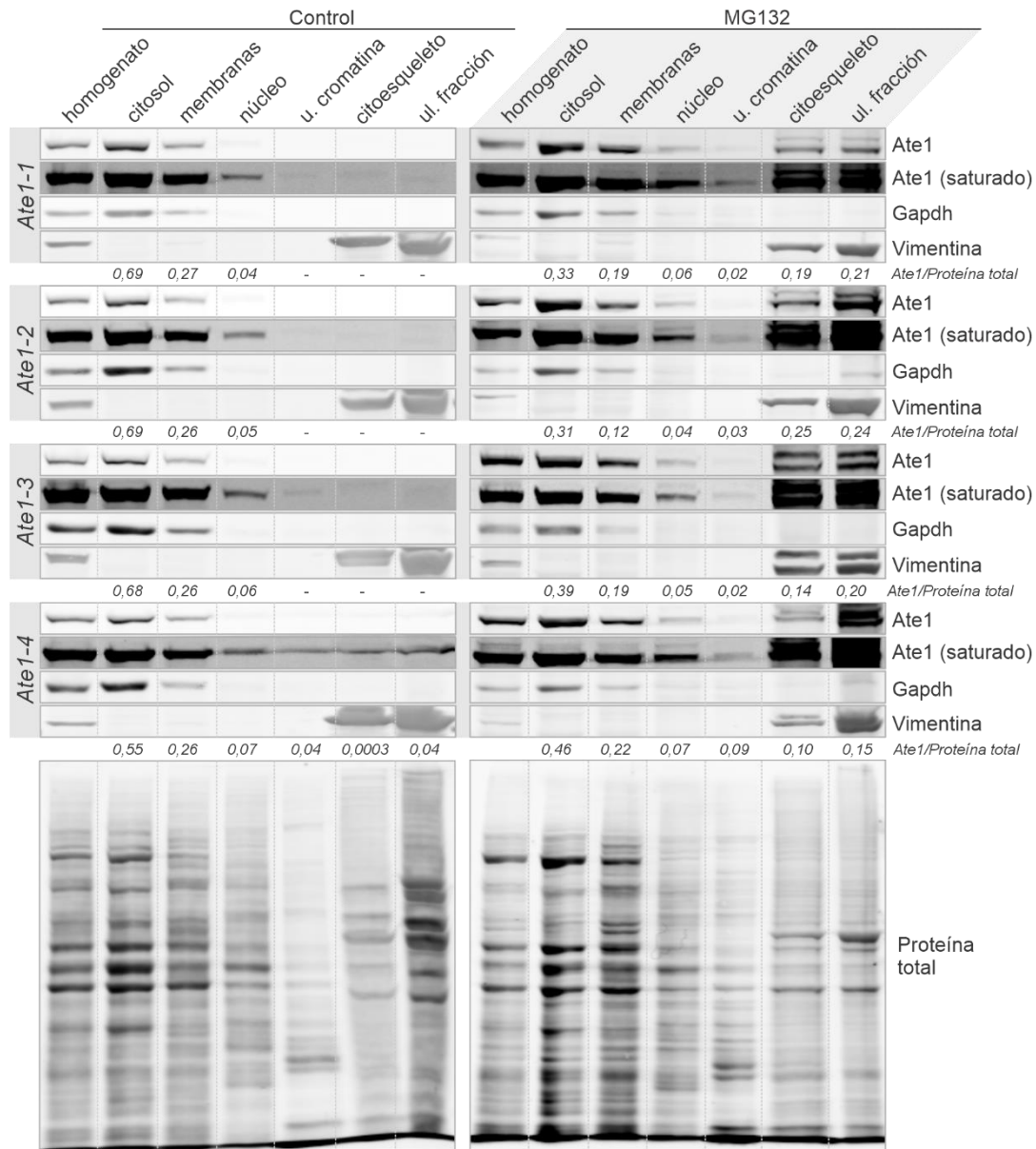


Figura 11. Distribución subcelular de las isoformas de Ate1. Células MEFs Ate1-1, -2, -3 y -4 fueron incubadas con MG132 10 μ M durante 16 h. Cada homogenato se sometió a un proceso de fraccionamiento subcelular, según el procedimiento descrito en la Figura 10. El nivel de expresión de Ate1 se analizó mediante Western blot. Gapdh y vimentina se utilizaron como marcadores de proteínas citosólicas y asociadas al citoesqueleto, respectivamente. El marcador de proteínas totales se utilizó como control de carga. La cuantificación de Ate1 respecto a proteína total expresa la proporción de la enzima en cada fracción. **Las isoformas de Ate1 están distribuidas en las fracciones citosólica, de membranas y ligeramente en la nuclear. La inhibición del proteasoma promueve su enriquecimiento principalmente en la fracción de citoesqueleto.**

Según lo descrito en la bibliografía, las proteínas poli-Ub forman agregados insolubles cuando se inhibe el proteasoma [150]. Para evaluar si esto mismo ocurre con Ate1 y caracterizar el comportamiento de la proteína, se realizó un fraccionamiento en células HOG separando la fracción de proteínas solubles de aquellas insolubles. Para ello, las células fueron incubadas con el inhibidor irreversible del proteasoma,

bortezomib (BT) durante 16 h y se sometieron a ultracentrifugación a 400.000 xg por 1 h. La expresión endógena de Ate1 se analizó por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce todas las variantes de la proteína. Gapdh y Caveolina-1 (Cav1) se utilizaron como marcadores de la fracción soluble (S) e insoluble (P), respectivamente. En células sin tratar, más del 80 % de la enzima se recuperó en la fracción soluble, sin embargo, en respuesta al tratamiento, se observó un aumento significativo de la enzima en la fracción insoluble (**Figura 12a, b**). Además, se analizó el nivel de dos sustratos de Ate1, β -actina y CRT, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente a las variantes arginiladas y no arginiladas de estas proteínas. A pesar del incremento de la enzima en la fracción insoluble, no se observaron diferencias en los niveles de las proteínas arginiladas, R-CRT y R- β -actina. Estos resultados señalan que Ate1 endógeno se enriquece en la fracción insoluble cuando se inhibe el proteasoma, lo que sugiere que Ate1 podría estar presente en estructuras como agregados y/o vesículas. Además, revela que al igual que las variantes de Ate1 fusionadas a GFP, la proteína endógena se enriquece en la fracción insoluble en respuesta a la inhibición proteasomal, excluyendo la posibilidad de que la adición del epítipo GFP pudiese modificar la asociación de la enzima con esta fracción.

Para evaluar si la presencia de Ate1 en la fracción insoluble depende de interacciones no covalentes, como puente hidrógeno o interacciones electrostáticas, se incubó el precipitado obtenido por ultracentrifugación (P_1) en células HOG tratadas con BT, con una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a pH 11,5 durante 40 min. Las proteínas extraídas (S_2) fueron separadas de las que permanecieron unidas (P_2) mediante otro paso de ultracentrifugación (**Figura 12c**). El nivel endógeno de Ate1 se analizó por Western blot. β -actina, Gapdh y Cav1 se utilizaron como marcadores endógenos de la separación. La exposición de la fracción insoluble a condiciones alcalinas no permitió extraer la enzima, la cual permaneció casi en su totalidad en el precipitado P_2 luego del proceso de ultracentrifugación, al igual que la proteína integral de membrana Cav1. Por su parte, la incubación de membranas con el *buffer* control (5 mM Tris pH 7,4) no afectó la asociación de las proteínas analizadas con las membranas (**Figura 12d**). Este resultado revela que la presencia de Ate1 en la fracción insoluble no depende de uniones no covalentes.

Posteriormente, se analizó la distribución de Ate1 entre las fases acuosa y detergente obtenidas después de la extracción de proteínas en presencia de Tritón X-114 (TX114), seguido de la separación de fases inducida por temperatura (**Figura 12e**). Estas condiciones experimentales permitieron la separación de proteínas

hidrofílicas (que particionan a la fase acuosa) de aquellas proteínas con carácter hidrofóbico (que particionan a la fase detergente). Estas últimas, por lo general son proteínas transmembrana o poseen anclas de glicosilfosfatidilinositol, ácidos grasos o grupos prenilo que contribuyen a la hidrofobicidad. En el caso de Ate1, casi la totalidad de la enzima se recuperó en la fase acuosa de la fracción asociada a membranas en células CHO-K1 (**Figura 12f**) y HOG (**Figura 12g**) tratadas con BT. Por el contrario, la

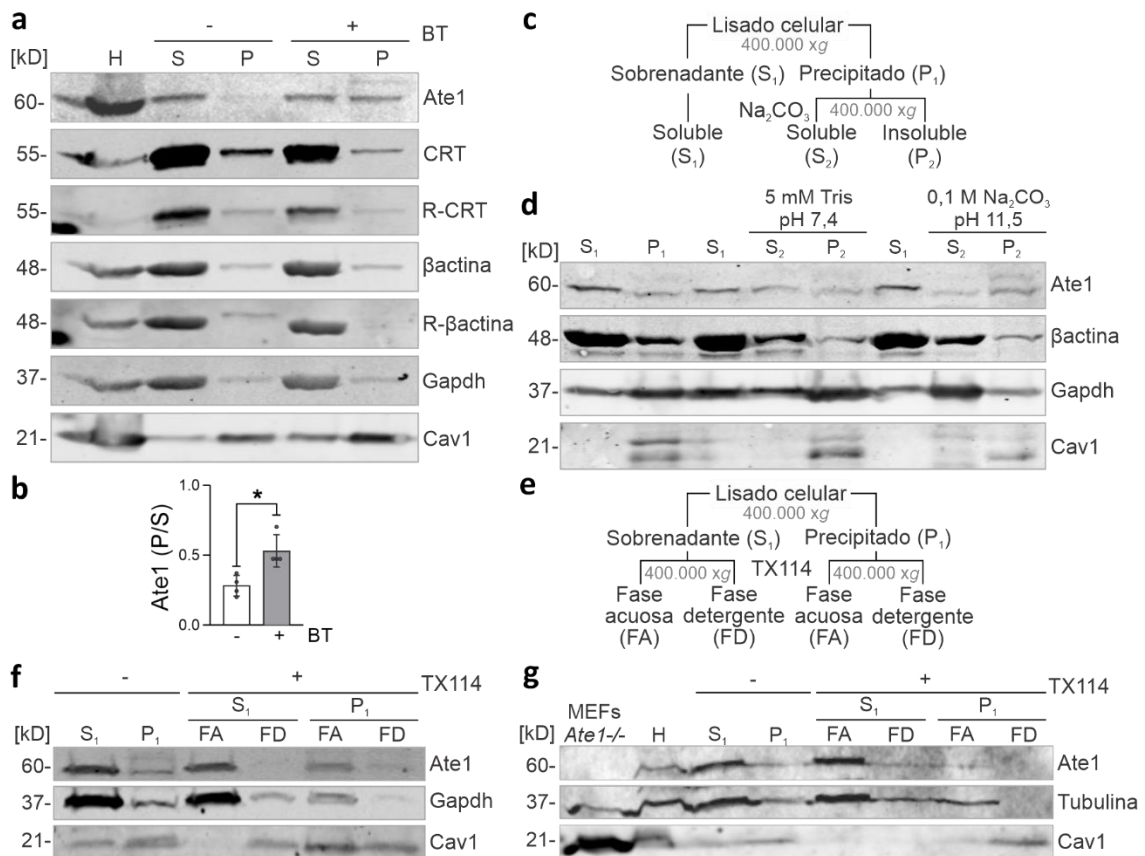


Figura 12. Caracterización de la asociación de Ate1 a la fracción insoluble (a) Células HOG fueron tratadas con BT 500 nM durante 16 h. Los homogenatos (H) se sometieron a ultracentrifugación a 400.000 xg para separar el sobrenadante (S) del precipitado (P). La distribución de Ate1 en las fracciones S y P se analizó mediante Western blot. Cav1 y Gapdh se utilizaron como controles endógenos del fraccionamiento. El nivel de R-βactina y R-CRT se evaluó mediante anticuerpos específicos contra las especies N-terminal arginiladas. (b) Cuantificación del nivel de Ate1 en la fracción P con respecto a la fracción S. (c) Esquema de procesamiento de las muestras para la extracción con carbonato de sodio (Na_2CO_3). La fracción P_1 obtenida por ultracentrifugación en (a) se incubó con *buffer* control (Tris 5 mM pH 7,4) o con Na_2CO_3 0,1 M pH 11,5. Luego del tratamiento, las proteínas solubilizadas (S_2) se separaron de las que permanecieron unidas a membranas (P_2) mediante ultracentrifugación a 400.000 xg y se analizaron mediante Western blot. (d) Extracción con Na_2CO_3 en células HOG. (e) Las fracciones S y P obtenidas por ultracentrifugación a 400.000 xg, se sometieron a la partición en fase acuosa (FA) o detergente (FD) al incubarlas con TX114 y se analizaron mediante Western blot. (f) Partición con TX114 en células CHO-K1 y (g) HOG. La cuantificación de Ate1 representa la media \pm EE. *, $p < 0,05$; $n = 4$. **La inhibición del proteasoma en células HOG promueve el enriquecimiento de Ate1 principalmente en la fracción insoluble. La interacción con dicha fase no es susceptible al lavado con una solución salina a pH alcalino, aunque sí es extraíble con un detergente no iónico.**

proteína de membrana Cav1 particionó mayoritariamente a la fase detergente en HOG y parcialmente en CHO-K1. De este modo, si bien Ate1 se enriquece en la fracción insoluble, esta enzima actúa como una proteína hidrofílica. En conjunto, estos resultados sugieren que Ate1 podría asociarse con agregados ubiquitinados perinucleares cuando se inhibe la degradación proteasomal.

ii. Compartimentación de Ate1 y del adaptador autofágico p62

De acuerdo con lo reportado en la bibliografía, la maquinaria autofágica puede procesar los agregados ubiquitinados acumulados en la región perinuclear de la célula por inhibición del proteasoma [30, 151, 152]. Para evaluar esta posibilidad, en primer lugar, se analizó mediante microscopía confocal la localización intracelular de dos marcadores de autofagia, p62 y LC3B en células HeLa que expresan establemente GFP-LC3 tratadas con BT durante 12 h. En la condición control, se observó que p62 se expresa en forma de puntos esféricos distribuidos en la célula de manera homogénea, que colocalizan parcialmente con la señal de LC3 (**Figura 13**). Al inhibir el proteasoma, se observó una marcada acumulación de p62 en la región perinuclear de la célula acompañado de un enriquecimiento de LC3. Este resultado muestra que dos componentes principales de la maquinaria de autofagia selectiva se relocalizan hacia la región perinuclear de la célula cuando se inhibe el proteasoma. El cambio en el patrón de expresión de p62 podría indicar que la proteína está en su conformación oligomérica,

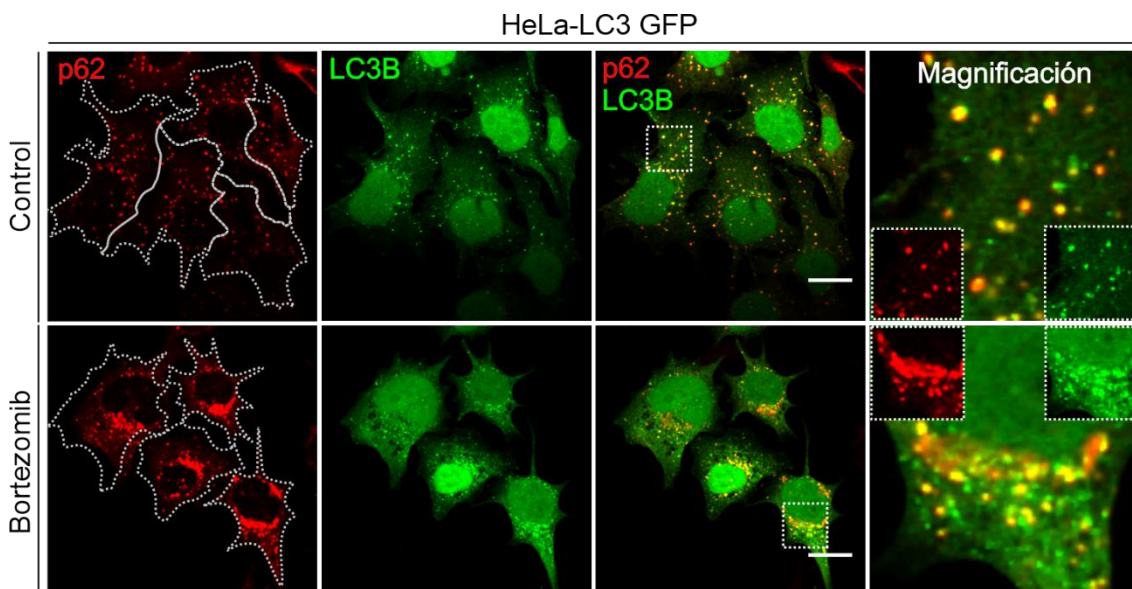


Figura 13. Localización subcelular de p62 y LC3 durante la respuesta autofágica. Células LC3B-GFP fueron incubadas con BT 500 nm por 12 h. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta y se analizó mediante microscopía confocal. La detección de LC3B proviene de la fluorescencia intrínseca de la GFP (verde). p62 se detectó mediante un anticuerpo (MBL) (rojo). Los recuadros señalan las áreas magnificadas. Barra de escala: 10 μ m. **LC3B y p62 se reagrupan en la región perinuclear de la célula cuando se inhibe el proteasoma.**

formando agregados del tipo secuestrosomas.

Para evaluar si Ate1 se acumula en la misma fracción subcelular que p62 y proteínas poli-Ub, se realizó un ensayo de fraccionamiento subcelular en células MEFs *Ate1-1* incubadas con MG132 durante 12 h. Los extractos se analizaron mediante Western blot utilizando γ -tubulina como marcador del citoesqueleto asociado al centrosoma de las células (también utilizado como marcador de agregados ubiquitinados o agresomas), Gapdh como marcador citosólico y proteínas totales como control de carga. En células sin tratar, se observó que el nivel basal de p62 es relativamente bajo en casi todas las fracciones (esto concuerda con un flujo de autofagia basal). Sin embargo, al inhibir el proteasoma se observó un marcado incremento de la proteína adaptadora, particularmente en la fracción de proteínas asociadas al citoesqueleto junto con Ate1 y proteínas poli-Ub (**Figura 14**). Este resultado indicaría que Ate1, al igual que p62 y proteínas poli-Ub, se acumulan en la región del centrosoma de la célula.

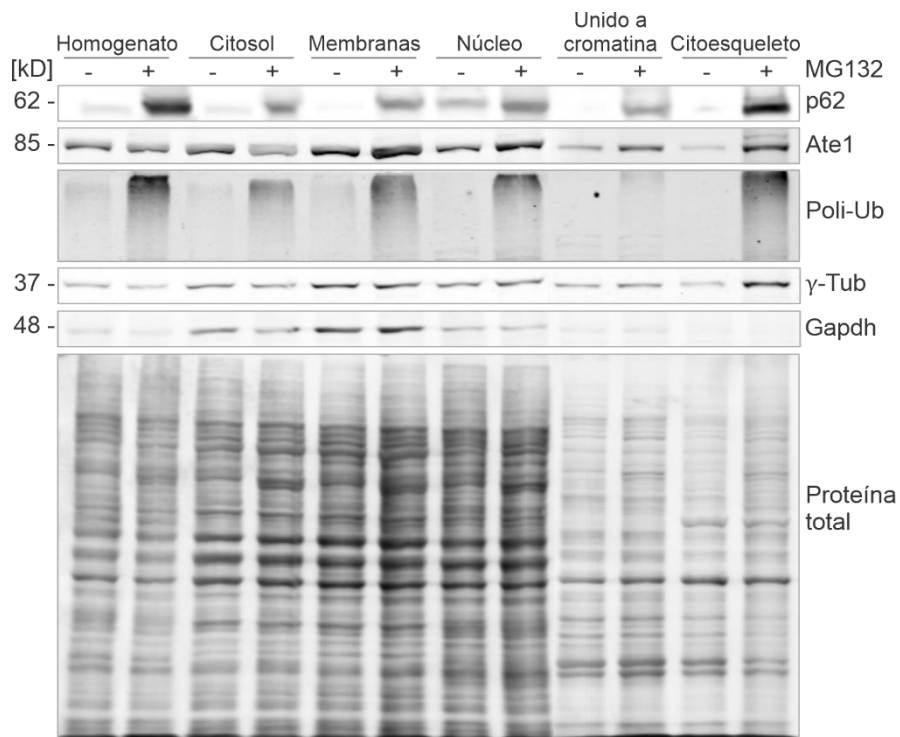


Figura 14. Distribución subcelular de Ate1, p62 y proteínas poli-Ub durante la respuesta autofágica. Células MEFs *Ate1-1* fueron incubadas con MG132 10 μ M durante 12 h. Los homogenatos se sometieron a un proceso de fraccionamiento subcelular, de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 10. La distribución de Ate1, p62 y proteínas poli-Ub se analizó mediante Western blot. Gapdh (citosol), γ -tubulina (citoesqueleto, agresomas) y un marcador de proteínas totales se utilizaron como controles endógenos del fraccionamiento. **Los niveles de p62, Ate1 y poli-Ub aumentan en la fracción de citoesqueleto cuando se inhibe el proteasoma.**

Con el propósito de evaluar si Ate1 y p62 forman agregados, oligómeros o se asocian con otras proteínas por intermedio de enlaces disulfuro, se realizó una SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Para ello, células MEFs *Ate1-1* fueron incubadas con el inhibidor de proteasoma, MG132 y/o con un inhibidor autofágico (Cloroquina, CQ) durante 12 h. La proteína p62 humana contiene 14 residuos Cys, entre los cuales 11 están presentes en el dominio PB1 de oligomerización. Se demostró que la Cys113 de la proteína p62 humana participa en la formación de enlaces inter-disulfuro durante su polimerización *in vitro* [153]. Hasta el momento, todos los ensayos de Western blot fueron realizados en condiciones reductoras, mediante el agregado de β -Mercaptoetanol (β -Mer) lo que permitió en la mayoría de los casos observar una única banda de ~60 y 62 kD correspondiente a Ate1 y p62, respectivamente. En condiciones no reductoras y sin la presencia de inhibidores, p62 se observó como una banda de ~62 kD y una menos enriquecida de ~120 kD, correspondientes al monómero y dímero de la proteína, respectivamente. Además, se visualizó una banda de alto peso molecular correspondiente a los agregados/oligómeros de la proteína que permanecieron en el gel concentrador, dado que, por su tamaño no pudieron ingresar al gel separador (**Figura 15**). Al inhibir el proteasoma, se observó un marcado incremento del monómero de p62 mientras que la inhibición de la autofagia provocó un incremento de los agregados/oligómeros de la proteína. Esto puede explicarse debido a que el monómero de p62 se degradaría por la vía proteasomal mientras que los agregados/oligómeros se degradan por la vía autofágica. En efecto, al inhibir ambas vías, se observó una acumulación tanto del monómero como de los agregados/oligómeros. Estos resultados señalan que, en células sin tratar, p62 se halla principalmente como monómero o como agregado/oligómero, cuya degradación puede ser inhibida por MG132 o CQ, respectivamente. Para el caso de Ate1, en condiciones no reductoras y ausencia de inhibidores, se observó una banda de 60 kD correspondiente al monómero de la enzima y un patrón de múltiples bandas, similar al observado para las proteínas poli-Ub, que involucraría su asociación con proteínas de distinto peso molecular. Además, en el gel concentrador, se visualizó otra banda que corresponde a los compuestos de alto peso molecular. A diferencia de p62, los distintos tratamientos con inhibidores no afectan significativamente los niveles de la enzima. De este modo, independiente de la actividad proteolítica de la célula, Ate1 puede formar complejos hetero-oligoméricos, agregados/oligómeros de mayor peso molecular. En línea con estos resultados, la formación de multímeros de Ate1 también se observó en homogenatos de células CHO-K1 que expresan Ate1 y p62 de manera endógena (no mostrado). Estos resultados revelan que tanto Ate1 como p62 pueden formar estructuras de alto peso molecular, sin

embargo, p62 es capaz de auto-oligomerizar mientras que Ate1 formaría complejos con otras proteínas.

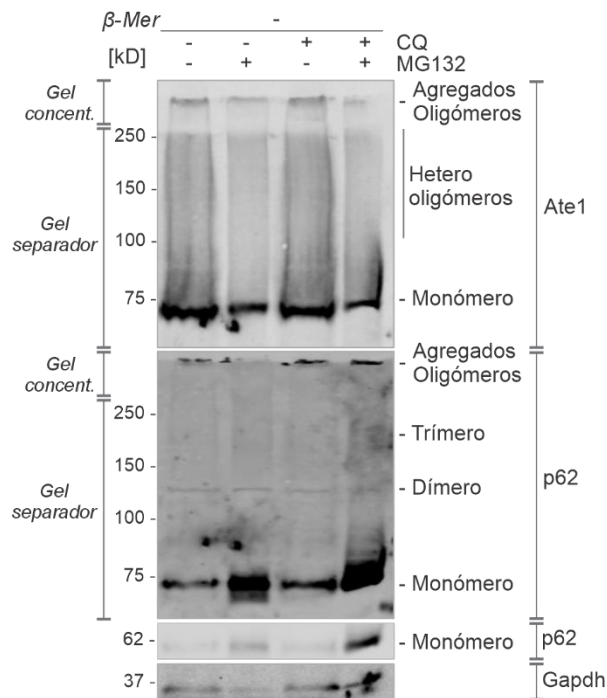


Figura 15. Formación de multímeros de Ate1 y p62. Células MEFs *Ate1-1* fueron incubadas con MG132 10 μ M y/o CQ 20 μ M durante 12 h. Las células fueron procesadas para SDS-PAGE en condiciones no reductoras y desnaturalizantes. Los niveles de Ate1 y p62 fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos contra todas las isoformas de Ate1 (Merck Millipore) y p62 (MBL). Los geles concentrador (concent.) y separador se prepararon al 4 y 12 % de poli-acrilamida, respectivamente. **Ate1 puede formar agregados y complejos hetero-oligoméricos, mientras que p62 forma agregados y homo-oligómeros en condiciones no reductoras.**

A continuación, se realizó una triple inmunofluorescencia en células MEFs *Ate1-1* incubadas con MG132 durante 6 h, para determinar la localización de Ate1 con respecto a proteínas poli-Ub y p62. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se observó que en la condición control, la señal punteada de p62 colocaliza parcialmente con la de Ate1-1 (**Figura 16. control**). Luego de 6h de tratamiento con MG132, se observó un incremento de la fluorescencia de p62, acompañado de la formación de pequeños *clusters* o conglomerados de proteínas, asimétricos, que colocalizan con Ate1 (**Figura 16. MG132**). Cabe destacar que, a diferencia de los ensayos anteriores, se realizó un tratamiento más corto, esto permitió visualizar a las proteínas en una etapa previa a la formación de agregados perinucleares. En concordancia con esto, la colocalización entre p62 y proteínas poli-Ub aún no es tan marcada en este estadio. Sorprendentemente, Ate1 no solo colocaliza con la señal punteada de p62 en la condición control sino también con los *clusters* de p62 formados al inhibir el proteasoma. De acuerdo con la simetría y distribución de los *clusters* de p62, podrían ser secuestrosomas. En conjunto, estos resultados sugieren que p62 y Ate1 podrían estar asociadas en los secuestrosomas en un estadio previo al secuestro de proteínas poli-Ub. Es importante resaltar que la colocalización entre Ate1 y p62 también se observa con las otras variantes de la enzima (no mostrado). En conjunto, estos resultados sugieren que Ate1 estaría compartimentada junto a p62 en los secuestrosomas.

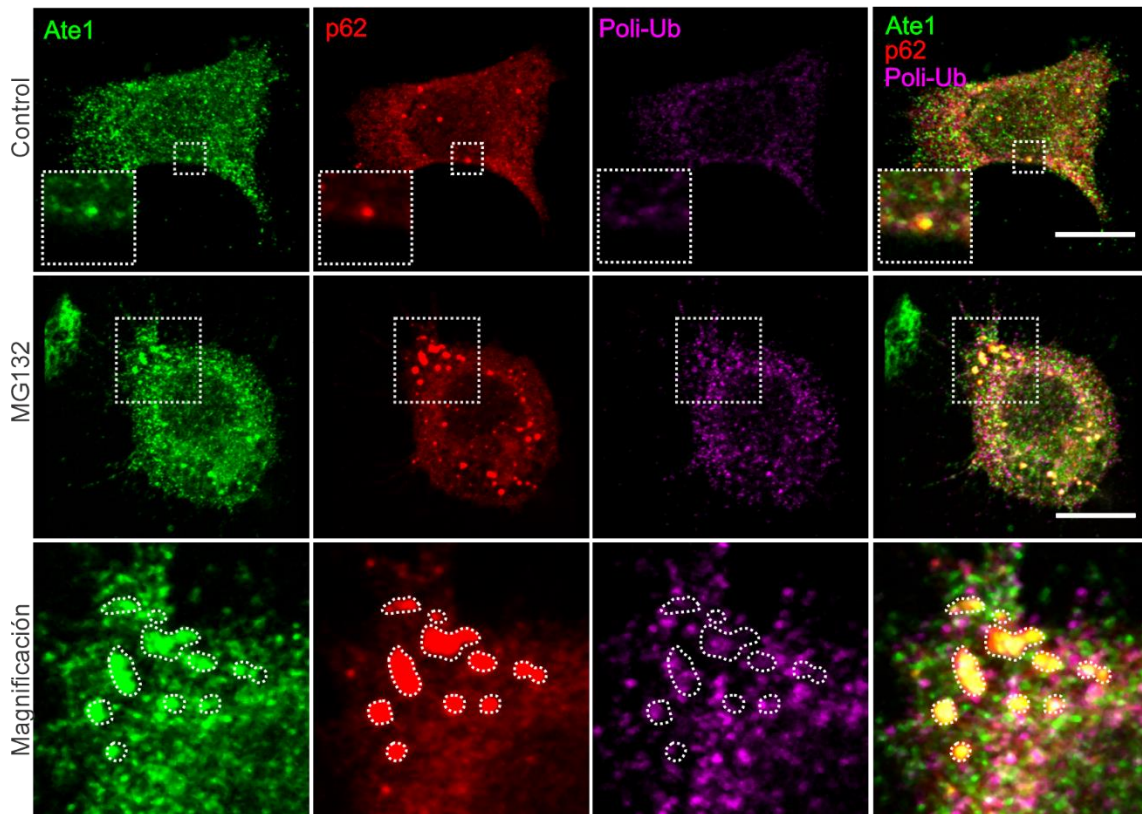
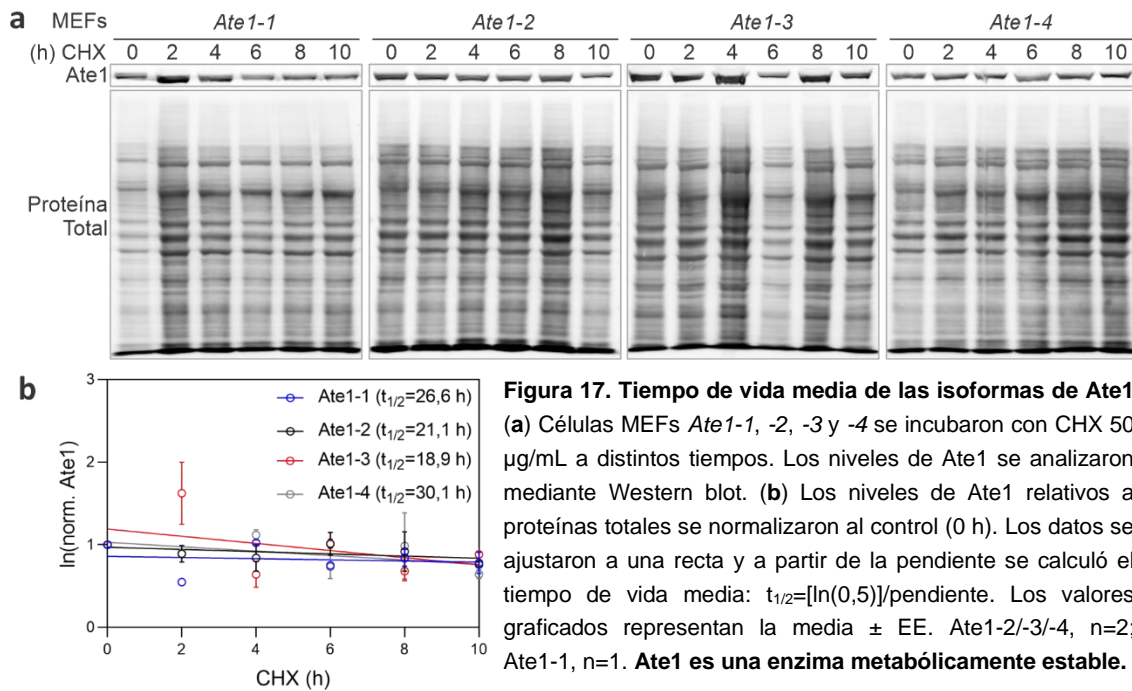


Figura 16. Distribución subcelular de Ate1, p62 y proteínas poli-Ub durante la respuesta autofágica. Células MEFs *Ate1-1* fueron incubadas con MG132 10 μ M durante 6 h. Se realizó una triple inmunotinción utilizando anticuerpos contra Ate1 (verde), p62 (rojo) y proteínas poli-Ub (magenta) y se analizó mediante microscopía confocal. Los recuadros señalan áreas de magnificación. Barra de escala: 10 μ m. **En respuesta a la inhibición del proteasoma, p62 forma *clusters* de proteínas que colocalizan con Ate1, en etapas previas al secuestro de proteínas poli-Ub.**

iii. Estabilidad metabólica de Ate1

De acuerdo con la distribución y compartimentación de la enzima, existe una posibilidad de que Ate1 pueda ser un sustrato de degradación en lugar de participar activamente en el mecanismo proteolítico. Para evaluar si Ate1 pertenece al conjunto de proteínas de vida media corta que pueden ser procesadas por el sistema UPS, se evaluó la vida media de cada una de sus variantes en presencia del inhibidor de síntesis cicloheximida (CHX). Las líneas estables MEFs *Ate1-1*, -2, -3, y -4 se incubaron con CHX y se determinó el nivel de cada proteína a distintos tiempos mediante Western blot (**Figura 17a**). Se observó que el tiempo de vida media de cada variante oscila entre 18 a 30 h (**Figura 17b**). La mayoría de las proteínas tiene una vida media promedio de 8,7 h en la célula, mientras que en otros casos está por debajo de 1-2 h (vida media corta) o por encima de las 15 h (vida media larga) [154]. De acuerdo con esto, este resultado indica que Ate1 es una proteína de vida media larga, lo que apoya la hipótesis

de que podría estar asociada a los secuestrosomas como un componente de la maquinaria proteolítica y no como sustrato de degradación.



Discusión

Los resultados de este capítulo proveen un análisis comprensivo de la distribución subcelular de las isoformas de la enzima Ate1 y brindan nuevas evidencias acerca de su localización junto a componentes de la maquinaria de autofagia y sustratos de degradación durante la respuesta autofágica. En concordancia con la localización descrita para Ate1, gran parte del arginoloma se halla en el citosol y núcleo de la célula [113, 116]. No obstante, se han identificado proteínas susceptibles de ser arginiladas que se encuentran compartimentadas en organelas, vesículas de secreción o en el espacio extracelular [116, 120]. Si bien existen al menos cuatro isoformas activas en ratón, que se diferencian por su preferencia en el residuo que modifican en las distintas proteínas sustrato, aún no está claro cómo su actividad está regulada en la célula. Este interrogante suscitó un gran interés por dilucidar el comportamiento de esta enzima en la célula. En este capítulo, se demostró que las isoformas de Ate1 se localizan en el citosol y núcleo de la célula (**Figura 9**). Esta distribución contrasta ligeramente con la descrita en la literatura, donde se observó que dos de las cuatro isoformas de ratón eran excluidas del núcleo [89, 90]. Además, ensayos de microscopía confocal y bioquímicos, confirmaron que una fracción de esas enzimas permanece soluble en el citosol y núcleo de la célula, mientras que otra, se asocia a membranas biológicas (**Figura 11**). Es importante mencionar que esta tesis describe por primera vez la asociación de Ate1 a membranas, y que este hallazgo podría tener grandes implicancias en el mecanismo de arginilación postraduccional y su función en la célula, como por ejemplo regulando el tráfico de vesículas (endocitosis/exocitosis), en el transporte o en la asociación de proteínas a membrana que median señalización bioquímica, entre otras.

Por otra parte, se ha reportado que las proteínas ubiquitinadas, cuando se acumulan, son propensas a formar agregados que pueden ser almacenados temporalmente en el centrosoma de la célula, como agresomas [59-61]. Estas estructuras también están compuestas por proteínas solubles, no ubiquitinadas, tales como componentes de la maquinaria proteasomal, chaperonas moleculares, así como numerosas proteínas del citoesqueleto. La prevalencia de esta clase de proteínas no es sorprendente, ya que desempeñan un rol central en la formación y transporte de estos agregados [155, 156]. En concordancia con esto, se comprobó que al inhibir la actividad del proteasoma, las variantes de Ate1 adquieren una distribución similar a la de agresomas, dada su localización perinuclear junto con sustratos ubiquitinados y a la co-sedimentación con proteínas asociadas al citoesqueleto (**Figura 9, 11**).

El análisis de la distribución de Ate1 se profundizó evaluando el nivel de expresión endógeno de la enzima en fracciones celulares obtenidas por ultracentrifugación. Este diseño experimental, permitió recuperar más del 40% de la enzima en la fracción insoluble, demostrando que Ate1 podría estar asociada con estructuras insolubles de un tamaño comparable con el de agregados proteicos, o vesículas (**Figura 12a**). Adicionalmente, se realizaron ensayos tendientes a determinar el tipo de interacción que retiene a la enzima en la fracción insoluble. Mediante el lavado de la fracción insoluble obtenida por ultracentrifugación con una solución alcalina, se confirmó que esta asociación no depende de uniones no covalentes (**Figura 12c**). Además, el análisis del comportamiento hidrofílico/hidrofóbico de Ate1 mediante partición en fase acuosa o detergente después del tratamiento con TX114 reveló la segregación casi completa de la enzima en la fase acuosa, poniendo de manifiesto el carácter hidrofílico de la misma (**Figura 12e**). Este análisis demuestra que, aunque Ate1 se comporta como una proteína soluble, una fracción de la misma se enriquece en la fase insoluble de la célula cuando se inhibe el proteasoma. De acuerdo con lo reportado en la literatura, los agregados del tipo agregomas son insolubles en presencia de detergentes; mientras que los que están formados por oligómeros de p62 (secuestosomas) serían solubles en presencia de detergente, particionando por lo tanto en la fase acuosa, de modo similar al comportamiento de Ate1 frente al tratamiento con TX114 [59-61, 153]. De acuerdo con esta evidencia, Ate1 podría estar asociada con agregados perinucleares tales como, secuestosomas.

Numerosos estudios han descrito que el estrés proteotóxico impuesto por la inhibición del proteasoma, aumenta la actividad autofágica para compensar la deficiencia del UPS [58, 157]. Este mecanismo induce la oligomerización de la proteína adaptadora p62 y, por lo tanto, promueve la formación de inclusiones localizadas en el centrosoma (secuestosomas), principalmente mediante el secuestro de sustratos ubiquitinados. Además, la fosforilación de p62 de ratón en Ser 405/409 a través de ULK1, aumenta su afinidad por los sustratos ubiquitinados. Esto estabiliza a los sustratos en el secuestosoma y conduce a la degradación de los agregados proteicos [158-160]. Acorde con esto, se comprobó mediante microscopía confocal, que las proteínas p62 y LC3, se dirigen hacia la región perinuclear de la célula cuando se inhibe el proteasoma y que p62, junto a Ate1 y proteínas poli-Ub, co-sedimentan con el marcador de centrosoma, γ -tubulina (**Figura 14**). El cambio en el patrón de expresión de p62, desde estructuras simétricas a depósitos polimórficos (**Figura 13**), junto con el ensayo de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (**Figura 15**), confirman que la proteína se encuentra en su estado oligomérico, formando secuestosomas. Mediante

microscopía confocal, se comprobó que en respuesta a la inhibición del proteasoma, p62 forma *clusters* de proteínas que colocalizan con Ate1, incluso a tiempos cortos de tratamiento (**Figura 16**). Además, se confirmó que Ate1 puede formar estructuras de alto peso molecular, como agregados y complejos hetero-oligoméricos; aunque a diferencia de p62, estos no parecen ser susceptibles al tratamiento con inhibidores de del proteasoma (MG132) y de la vía autofágica (CQ) (**Figura 15**). Estos resultados constatan un fenómeno previamente descrito, donde la inhibición del proteasoma induce una respuesta autofágica mediada por p62 que involucra la relocalización y oligomerización de la proteína adaptadora [157]. Sin embargo, por primera vez, la enzima Ate1 se halla compartimentada en estructuras compatibles con secuestrosomas junto a p62 y sustratos ubiquitinados y se describe formando complejos con otras proteínas.

Adicionalmente, en resultados preliminares de ensayos de FRET (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), se observó que ambas proteínas se encuentran lo suficientemente cerca como para interactuar y observar el fenómeno de transferencia de energía entre fluoróforos (véase **Anexo. Figura Sup. 1**). Por otra parte, se realizaron ensayos bioquímicos para estudiar la posible interacción entre Ate1 y p62. Se utilizaron distintas estrategias de co-inmunoprecipitación, sin embargo, la formación de agregados intracelulares de estas proteínas dificultó el proceso de inmunoprecipitación, aun así, no se descarta que Ate1 pueda estar asociada a p62. En este sentido, Kwon y colaboradores reportaron que la oligomerización de p62 es inducida a través de la interacción de su dominio ZZ con el extremo Arg N-terminal de proteínas arginiladas que residen en el RE, tales como BIP y CRT [39, 153]. Estos oligómeros se separan del RE junto con una porción del mismo y por intermedio de LC3 se dirigen a los autofagosomas. Este proceso, conocido como reticulofagia (del inglés, *ER-phagy*) facilita el recambio del RE [149, 161]. Dada la colocalización observada entre Ate1 y p62, sería interesante confirmar si Ate1 es requerida en el proceso de oligomerización y función de p62. Otro aspecto importante, sería extender el estudio a otros adaptadores autofágicos, como NBR1, NDP52, OPTN, VCP, entre otros. En conjunto, estos resultados sugieren que Ate1 estaría compartimentada junto a p62, en estructuras de tipo agregado, solubles en detergente, que se forman cuando se inhibe el proteasoma. Esta evidencia refuerza la hipótesis de que la enzima podría ser necesaria durante el reconocimiento de los sustratos junto a p62 y que interviene en la degradación autofágica selectiva. Existe la posibilidad de que Ate1 esté siendo modificada por ubiquitinación y que su enriquecimiento en la región perinuclear sea propio de un sustrato de la vía. No obstante, se confirmó que las isoformas de la enzima

tienen una vida media larga (~18-30 h) (**Figura 17**). Si bien no se descarta que la proteína pueda ser degradada junto con los otros sustratos, esta evidencia sugiere que Ate1 podría estar actuando dinámicamente en los secuestrosomas arginilando proteínas para promover su degradación.

De acuerdo con un reporte reciente, la maquinaria de degradación de proteínas citosólicas se concentra en focos de ~200 nm que toman contacto con determinadas regiones de la membrana del RE alejadas de la interfaz RE-Golgi [162]. Estos microcompartimentos, libres de membrana, excluyen a los ribosomas y consisten en un núcleo de proteasomas 26S densamente agrupados; que se acumulan dramáticamente en la envoltura nuclear, en presencia del inhibidor MG132. Se ha propuesto que estos microcompartimentos llevan a cabo la degradación asociada al RE, colocando a la maquinaria de degradación proteasomal en puntos específicos del RE para facilitar el control de calidad de las proteínas recién sintetizadas. Además, se ha demostrado que muchas enzimas que intervienen en una misma ruta metabólica se concentran en una región o compartimento celular, no unido por membranas, para facilitar el procesamiento de sus sustratos [163, 164]. En este sentido, se demostró en levaduras que Ate1 es capaz de formar complejos multi-enzimáticos con enzimas desamidadas (que catalizan la desamidación de residuos de asparagina N-terminal a aspartato, necesaria para la arginilación) y con enzimas E3 ligasas (requeridas en el proceso de ubiquitinación en la vía UPS) [106]. Aunque esto no ha sido verificado en células de mamíferos, la formación de esta estructura supramolecular incrementaría la eficiencia catalítica de estas enzimas y protegería a la célula de los intermediarios inestables o tóxicos evitando su difusión al citosol [164-166]. Considerando estos antecedentes y la evidencia presentada, se postula que Ate1 podría intervenir en el reconocimiento y secuestro de agregados ubiquitinados de manera coordinada con p62, desde microcompartimentos de degradación que pueden asociarse a la membrana nuclear o al RE de la célula para facilitar el procesamiento y la degradación autofágica de los sustratos.

CAPÍTULO 2

Participación de Ate1 en el mecanismo de la autofagia

Resultados

Con el objetivo de caracterizar la función de la enzima Ate1 en el proceso de autofagia, se investigó el efecto producido por cambios en la expresión de esta proteína en cultivo celular. Para ello, se utilizaron células MEFs que expresan de manera endógena todas las isoformas de la proteína (MEFs *Ate1^{+/+}*) y células que no expresan el gen *ate1* (MEFs *Ate1^{-/-}*). Además, como modelo de rescate del fenotipo salvaje, se emplearon células obtenidas a partir de células *Ate1^{-/-}* que expresan establemente la isoforma Ate1-1 (MEFs *Ate1-1*). Considerando que la autofagia es un proceso que abarca distintas etapas y moléculas desde su inicio hasta la degradación de los sustratos, en este capítulo se analizó la capacidad degradativa de las células desde tres perspectivas diferentes, se evaluó: i) el flujo de autofagia, ii) la degradación de vacuolas y sustratos de autofagia, y por último iii) el estado de activación de las principales rutas metabólicas involucradas en esta vía.

i. Flujo de autofagia

El flujo de autofagia representa una medida de la actividad autofágica de la célula. Con el propósito de establecer si el flujo está alterado en ausencia de Ate1, se monitoreó la formación de autofagosomas en las distintas líneas celulares. Es posible detener la autofagia en un punto y luego registrar la acumulación de vacuolas autofágicas (fagoforos, autofagosomas y autolisosomas) en el tiempo. En los ensayos que se detallan a continuación, se utilizó Cloroquina (CQ), un compuesto lisosomotrópico capaz de neutralizar el pH lisosomal provocando un bloqueo de la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Dado que LC3-II es la principal proteína que se asocia específicamente con autofagosomas y autolisosomas, sus niveles proteicos se correlacionan con el número de autofagosomas. Además, para analizar la capacidad de las células para inducir el flujo, éstas se cultivaron en condiciones de ayuno nutricional, en ausencia de suero fetal bovino (SFB). De este modo, para monitorear los niveles de LC3-I y LC3-II, se incubaron células *Ate1^{+/+}*, *Ate1^{-/-}* y *Ate1-1* con CQ, en presencia de SFB (autofagia basal) y en ausencia de SFB (autofagia inducida) durante 6 y 24 h (**Figura 18a**). A continuación, los niveles de LC3B se analizaron por Western blot (**Figura 18b**). En condiciones basales, el nivel de LC3-II observado fue significativamente mayor en las células *Ate1^{-/-}* comparado con *Ate1^{+/+}* y *Ate1-1* (**Figura 18c**). Dado que el nivel de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas, esta evidencia sugiere que el flujo de autofagia basal podría estar alterado en células *Ate1^{-/-}*. Para evaluar esta posibilidad, se comparó el nivel de LC3-I y LC3-II en presencia del inhibidor lisosomal. Para simplificar el análisis en las distintas

líneas celulares, el cambio en el nivel de ambas especies se expresó como el cociente de LC3-II respecto a LC3-I (LC3-II/LC3-I) (**Figura 18d-f**). En las células *Ate1*^{+/+}, el bloqueo lisosomal prolongado provocó un incremento significativo de LC3-II/LC3-I; mientras que en las células *Ate1*^{-/-} no se observaron cambios significativos (**Figura 18f**. (+)SFB, (+)CQ, 0 vs 24 h). Este resultado revela que el flujo de autofagia está disminuido en células *Ate1*^{-/-} comparado con células *Ate1*^{+/+}.

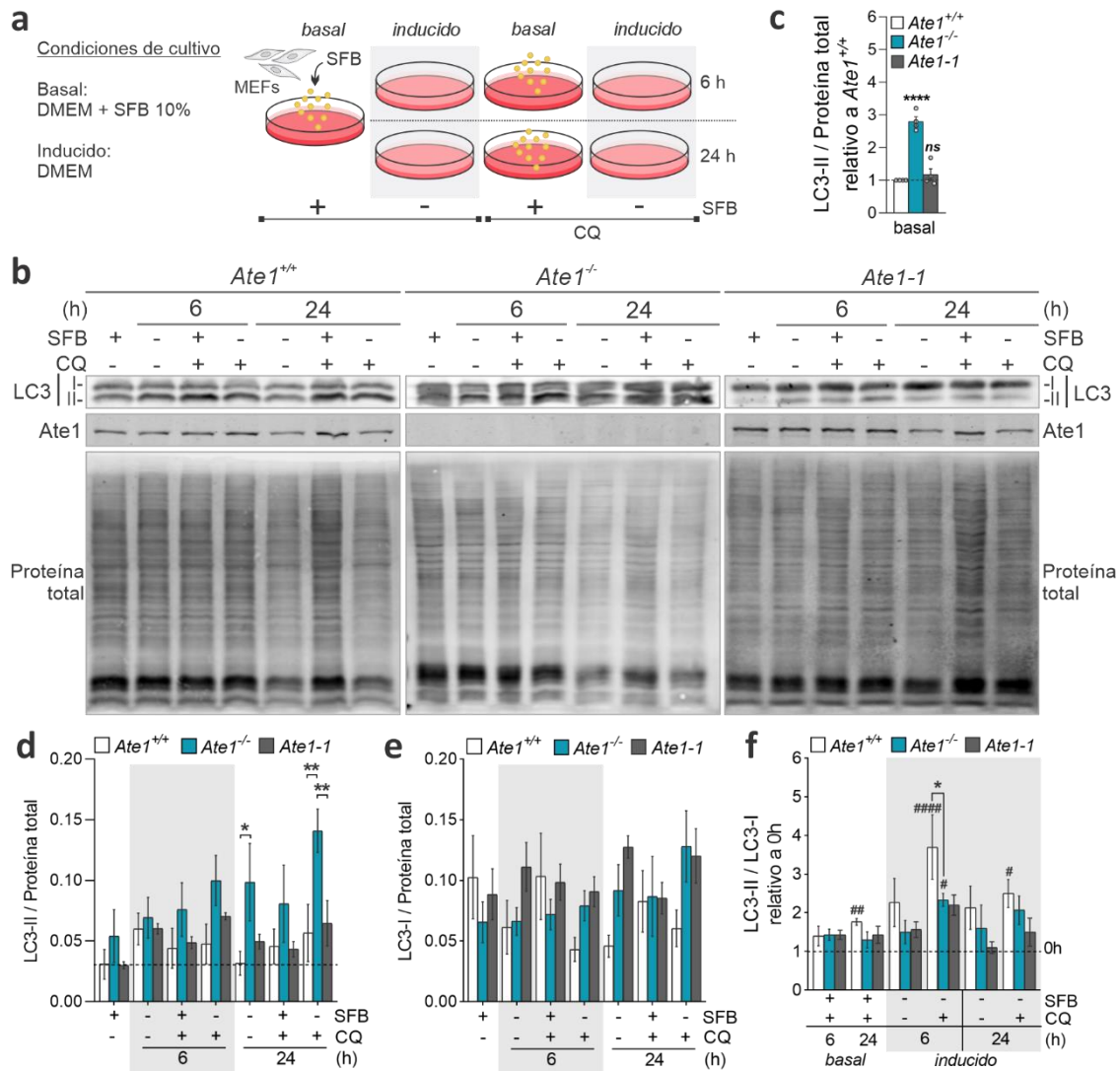


Figura 18. Niveles de LC3-II y LC3-I en condiciones basales y de inducción de autofagia. (a) Células MEFs *Ate1*^{+/+}, *Ate1*^{-/-} y *Ate1*⁻¹ fueron cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de suero y CQ 20 μ M por 6 y 24 h. (b) Las células fueron procesadas para SDS-PAGE y los niveles de LC3 fueron analizados por Western blot mediante el anticuerpo LC3B (Sigma). (c-f) Cuantificación de los niveles de LC3-I, LC3-II y LC3-II/LC3-I en condiciones basales o de inducción de autofagia, en las distintas líneas celulares, según se indica. La cuantificación se obtuvo por análisis densimétrico de las bandas de LC3-I y LC3-II respecto a las de proteínas totales. Los valores graficados representan la media del valor absoluto \pm EE. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Los resultados en (c) y (d-f) son representativos de 4 y 3 experimentos independientes, respectivamente. Nivel de significancia entre grupos (*) y respecto al control (#). **En células *Ate1*^{-/-}, el nivel de LC3-II está aumentado y la inducción de autofagia está atenuada en condiciones de ayuno de suero, esto sugiere que el flujo de autofagia está alterado en ausencia de Ate1.**

Con el propósito de evaluar si la autofagia puede ser inducida en ausencia de Ate1, se analizó el nivel de LC3-II/LC3-I en células cultivadas en condiciones de privación de SFB. En células *Ate1^{+/+}*, la carencia de SFB a tiempos cortos produjo un marcado incremento en el nivel de LC3-II/LC3-I comparado con el control (0 h); esta diferencia fue mayor al bloquear la degradación lisosomal (**Figura 18f**. (-) SFB, (±) CQ, 6 h). En células *Ate1^{-/-}*, no se observaron cambios significativos en los niveles de LC3-II/LC3-I a tiempos cortos; sin embargo, al bloquear la degradación lisosomal, se observó un incremento relativo al control (**Figura 18f**. (-) SFB, (±) CQ, 6 h), aunque el aumento observado en células *Ate1^{+/+}* es significativamente mayor al de células *Ate1^{-/-}* (**Figura 18f**. (-) SFB, (+) CQ, +/+ vs -/-). La inducción de autofagia por un periodo de tiempo más prolongado generó una respuesta más moderada (**Figura 18f**. (-) SFB, (±) CQ, 24 h). Estos resultados revelan que en células *Ate1^{+/+}*, el déficit nutricional produce un incremento de LC3-II con respecto a LC3-I, probablemente debido a la rápida conversión de LC3-I a LC3-II en respuesta a la inducción de la vía. Esto se ve reflejado en el aumento de LC3-II/LC3-I cuando se bloquea la degradación lisosomal. Sin embargo, a diferencia de las células *Ate1^{+/+}*, en células *Ate1^{-/-}* la inducción de la autofagia en ausencia de SFB está atenuada. En las células *Ate1-1*, los niveles de LC3-I presentan una gran variabilidad respecto a las otras líneas celulares (**Figura 18e**), y aunque los niveles de LC3-II si son comparables a los observados en células *Ate1^{+/+}* (**Figura 18d**), el cociente LC3-II/LC3-I no muestra un efecto claro de recuperación del fenotipo.

Adicionalmente, se calculó el recambio neto autofágico, que representa una medida de la velocidad relativa de formación de LC3-II respecto a la de degradación. Las tasas de formación y degradación de LC3-II se calcularon a partir de los niveles de LC3-II obtenidos en el ensayo de Western blot, mediante un modelo descrito por el grupo de Sierra A. y colaboradores (véase Materiales y Métodos. Monitoreo de la actividad autofágica) [167]. En células *Ate1^{-/-}*, se observó que la tasa de degradación tiende a ser menor que la tasa de síntesis de LC3-II (**Figura 19a**). Esta diferencia conduce a una disminución del recambio neto autofágico en células *Ate1^{-/-}* comparado con células *Ate1^{+/+}* (**Figura 19b**). En conjunto, estos resultados revelan que en ausencia de Ate1: i) LC3-II se acumula, ii) el recambio neto de LC3-II está disminuido, y iii) la inducción de autofagia mediante privación de nutrientes está atenuada, lo que sugiere que la autofagia estaría disminuida en ausencia de Ate1.

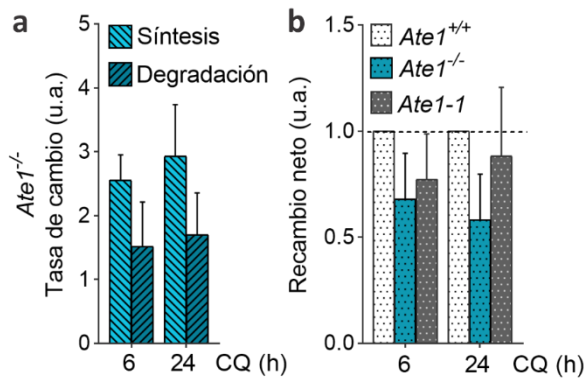


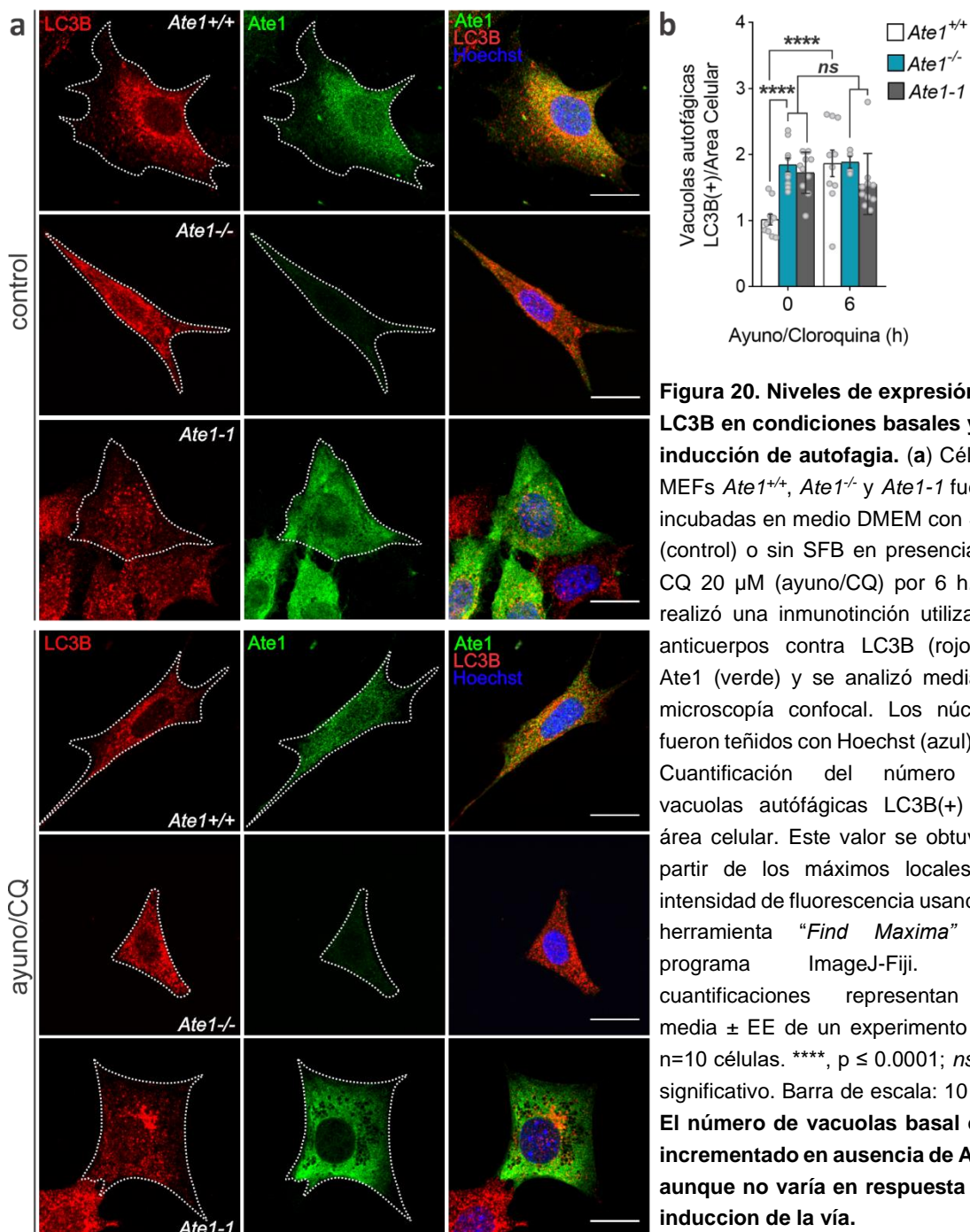
Figura 19. Tasa de formación, de degradación y recambio neto de LC3-II. Células MEFs *Ate1*^{+/+}, *Ate1*^{-/-} y *Ate1*⁻¹ fueron tratadas con CQ 20 μ M 6 y 24 h. **(a)** Cuantificación de la tasa de formación y degradación de LC3-II y **(b)** tasa recambio neto autofágico. Los valores graficados representan la media \pm EE. n=3 (Tabla Sup. 1). **En ausencia de Ate1, la tasa de degradación de LC3-II es menor a la de formación, esto produce una disminución del recambio neto autofágico.**

ii. Degradación de vacuolas y sustratos autofágicos

La capacidad autofágica de las células en estudio, se puede evaluar comparando el número de autofagosomas presentes en las condiciones basales y de inducción de la vía. Para ello, células *Ate1*^{+/+}, *Ate1*^{-/-} y *Ate1*⁻¹ se incubaron en medio con SFB (control) y en ausencia de SFB con CQ por 6 h (ayuno/CQ). A continuación, se realizó una inmunotinción utilizando anticuerpos contra LC3B y Ate1 y se analizó el número de vacuolas autofágicas mediante microscopía confocal. En las imágenes de fluorescencia, se observó que la señal de LC3B presenta un patrón de expresión punteado que corresponde a la señal proveniente de las vacuolas autofágicas (**Figura 20a**). En la condición control, donde el flujo de autofagia no está perturbado, el número de vacuolas es mayor en células *Ate1*^{-/-} que en *Ate1*^{+/+} (**Figura 20b**). En la condición ayuno/CQ, en la que el flujo de autofagia está inducido y la degradación del autofagosoma está bloqueada, se observó un marcado incremento de la cantidad de vacuolas en células *Ate1*^{+/+}; mientras que en células *Ate1*^{-/-} no se observaron cambios significativos. Este resultado muestra que en ausencia de Ate1 hay una mayor acumulación de vacuolas autofágicas en condiciones basales lo que se correlaciona con la disminución del flujo observada y además señala que la formación de autofagosomas inducida por ayuno está afectada.

A continuación, se analizó el nivel de p62 y proteínas poli-Ub que se acumulan en condiciones basales o cuando se bloquea la degradación en cada línea celular. Dado que estas proteínas también pueden ser procesadas por el proteasoma, es importante bloquear alternativamente ambas vías proteolíticas para poder evidenciar el nivel de proteína total. Cabe recordar que la autofagia y el proteasoma pueden actuar de manera compensatoria. Cuando la maquinaria proteasomal está saturada o inhibida se produce una acumulación de proteínas poli-Ub (**Figura 9**), éstas pueden ser reconocidas y sequestradas como carga por p62 para su procesamiento en los autofagosomas (**Figura 12**). De este modo, la inhibición farmacológica del proteasoma podría inducir el

proceso de autofagia, y con ello la degradación selectiva de p62 y de los sustratos carga. De acuerdo con esto, se analizó el nivel de p62 y de proteínas poli-Ub en condiciones basales y en respuesta a la inhibición de la autofagia y/o del proteasoma con CQ y MG132, respectivamente. Para ello, las células *Ate1*^{+/+}, *Ate1*^{-/-} y *Ate1*⁻¹ se cultivaron en medio completo en presencia o ausencia de estos inhibidores por 6 h. Luego, las muestras fueron analizadas por Western blot. En condiciones basales, se observó que p62 está aumentado en células *Ate1*^{-/-} con respecto a *Ate1*^{+/+} y *Ate1*⁻¹ (**Figura 21a**), al igual que las proteínas poli-Ub (**Figura 21b**, sin tratar). En concordancia con lo observado en la Figura 18c, el nivel basal de LC3-II está aumentado en células *Ate1*^{-/-}



(Figura 21a, b, sin tratar). Al inhibir el proteasoma, se observó un marcado incremento del nivel de p62 junto con un aumento de proteínas poli-Ub en células *Ate1*^{-/-} comparado con células *Ate1*^{+/+} y *Ate1*⁻¹ (Figura 21b, MG132), mientras que el tratamiento con CQ no afectó drásticamente los niveles de estas proteínas (Figura 21b, CQ). Por su parte, el co-tratamiento con CQ/MG132 provocó un incremento similar al observado solo con MG132 (Figura 21b, MG132, (±) CQ). Estos resultados muestran que tanto en condiciones basales o de inhibición del proteasoma, condiciones en las que se espera que la autofagia esté activa, p62 y las proteínas poli-Ub se acumulan en mayor proporción en células *Ate1*^{-/-}. Se observó un resultado similar en células HOG en las que se silenció establemente el gen *ate1*. El tratamiento de estas células con el inhibidor de proteasoma BT, en presencia o ausencia de CQ durante 3 o 24 h, muestra un marcado

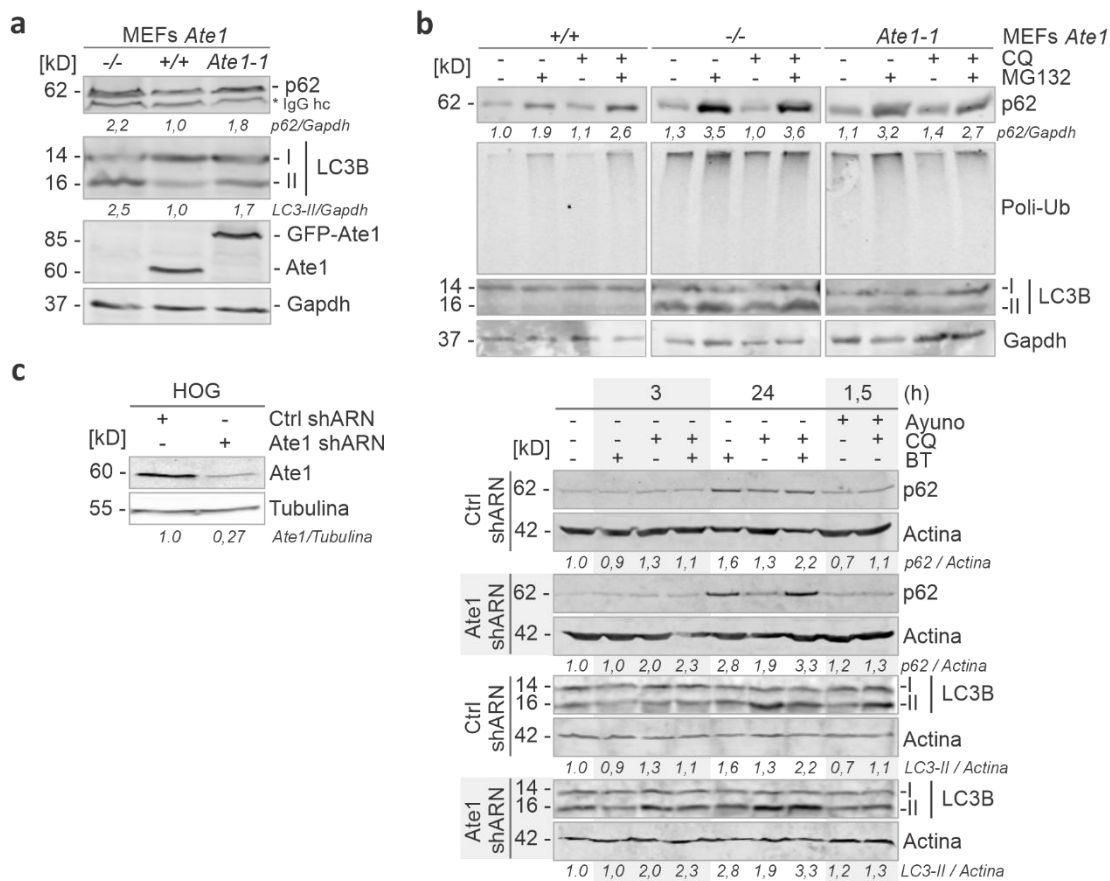


Figura 21. Niveles proteicos de p62, proteínas poli-Ub y LC3B. (a) Células MEFs *Ate1*^{-/-}, *Ate1*^{+/+} y *Ate1*⁻¹ fueron cultivadas en medio completo y (b) tratadas con MG132 10 μM y/o CQ 10 μM por 6 h. Las células se procesaron para Western blot utilizando anticuerpos contra p62 (MBL), LC3B (Sigma), proteínas poli-Ub (Enzo), *Ate1* (Millipore) y Gapdh (Abcam). (c) Células HOG silenciadas establemente para *Ate1* fueron cultivadas en medio completo y tratadas con BT 500 nM y/o CQ 10 μM por 3 y 24 h. Como control de la inducción de autofagia se incubaron en medio sin suero (ayuno) con o sin CQ por 1,5 h. Se utilizaron los anticuerpos contra p62 (Cell Signaling), LC3B (Sigma) y actina (Sigma). La cuantificación de p62 y LC3-II se expresó como el nivel de proteína respecto al control de carga, Gapdh o Actina. IgG hc: cadena pesada de la inmunoglobulina G del anticuerpo de p62. Geles al (a) 8 y (b) 14% de policrilamida. **p62 y proteínas poli-Ub se acumulan cuando la expresión de *Ate1* está ausente o disminuida.**

incremento de p62 y LC3-II (**Figura 21c**). Aunque no se puede descartar que haya un aumento de la síntesis de p62, esto sugiere que la degradación autofágica de este adaptador y de proteínas poli-Ub podría estar afectada en ausencia de Ate1.

La oligomerización de p62 y formación del secuestrosoma es un proceso esencial para su interacción con los sustratos carga y con LC3 en el autofagosoma [47]. Con el objetivo de evaluar si p62 se acumula como monómero o secuestrosoma, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia en células *Ate1^{+/+}*, *Ate1^{-/-}* y *Ate1-1* tratadas con MG132 y/o Ayuno/CQ. La señal de esta proteína se detectó mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo contra p62, y además se analizó el nivel de proteínas poli-Ub, y Ate1. Se cuantificó el número de agregados oligoméricos y el nivel de fluorescencia total de p62 junto con el de proteínas poli-Ub. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que, en condiciones basales, el número de oligómeros de p62 está significativamente aumentado en *Ate1^{-/-}* con respecto a *Ate1^{+/+}* y *Ate1-1* (**Figura 22a, b**). Esta diferencia es aún más marcada en respuesta al tratamiento con MG132, tanto en el número de oligómeros como en los niveles de fluorescencia total de p62 y de proteínas poli-Ub (**Figura 22a-d**). Cuando se induce autofagia por ayuno de suero en presencia de CQ, si bien el número de agregados cuantificados no varía significativamente entre las distintas líneas celulares, los niveles de la fluorescencia total de p62 y de proteínas poli-Ub están incrementados en *Ate1^{-/-}* con respecto a *Ate1^{+/+}* (**Figura 22a**). El co-tratamiento ayuno/CQ y MG132 induce una respuesta similar a la observada con el tratamiento de ayuno/CQ solo; aunque se observa una disminución en el número de agregados comparado con el control (sin tratar) en los tres tipos celulares. Estos resultados revelan que en ausencia de Ate1, p62 se acumula principalmente como agregado oligomérico junto a proteínas poli-Ub tanto en condiciones basales como de inhibición del proteasoma. En respuesta al bloqueo de la degradación lisosomal se observa un incremento de la fluorescencia total de p62 y de proteínas poli-Ub. En conjunto estos resultados muestran que en ausencia de Ate1, se acumulan vacuolas autofágicas y proteínas sustratos, como p62 y proteínas poli-Ub.

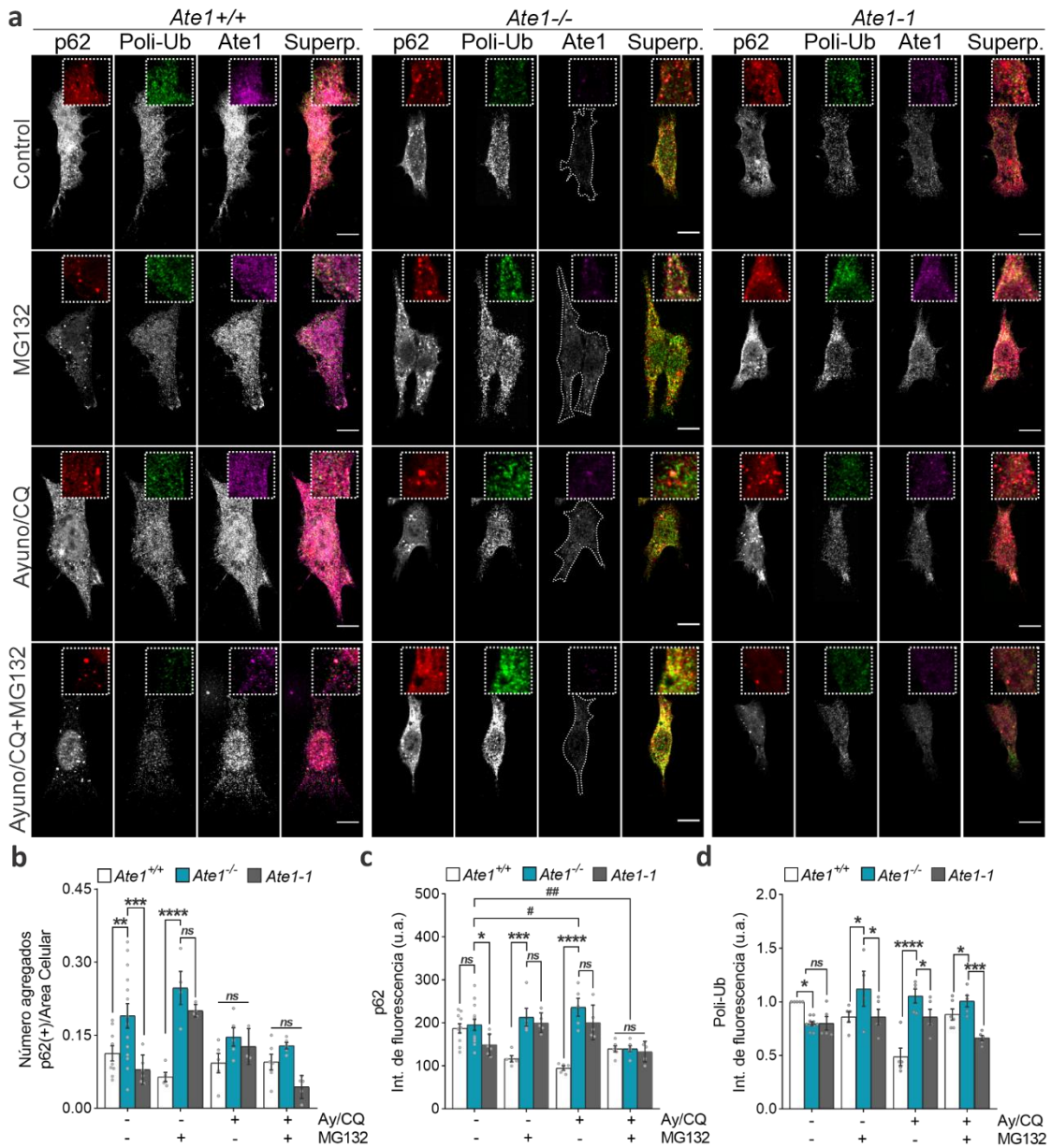
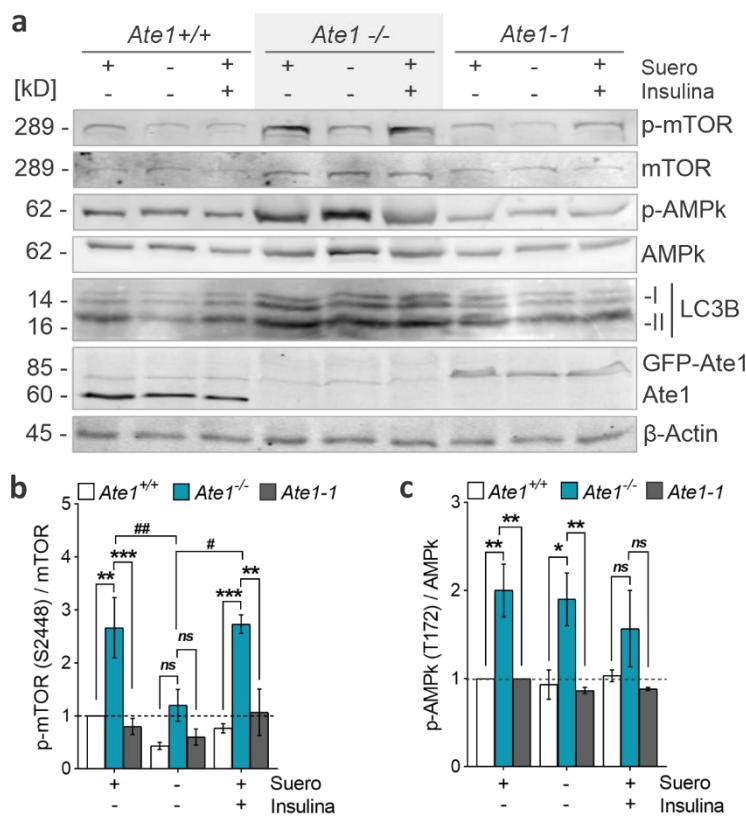


Figura 22. Agregados de p62 y niveles de proteínas poli-Ub. (a) Células *Ate1*^{+/+}, *Ate1*^{-/-} y *Ate1*⁻¹ fueron tratadas con MG132 10 μ M y/o Ayuno/CQ 20 μ M por 6 h. Se realizó una inmunotinción utilizando anticuerpos contra p62 (rojo), proteínas poli-Ub (verde) y Ate1 (magenta). Las células se analizaron mediante microscopía confocal. (b) Cuantificación del número de cuerpos de inclusión p62(+) por área celular. Este valor se obtuvo a partir de la medición de los máximos locales de intensidad de fluorescencia usando la herramienta “Find Maxima” del programa ImageJ-Fiji. (c) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de proteínas de p62 total. (d) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de proteínas poli-Ub normalizada al control. Las cuantificaciones representan la media \pm EE de un experimento con n=5-15 células. *, p<0,05; **, p<0,01; *** p<0,001; ****, p \leq 0.0001; ns: no significativo. Nivel de significancia entre grupos (*) y respecto al control (#). Ay: ayuno. Superp.: superposición. Barra de escala: 10 μ m. **El número de agregados oligoméricos de p62 y los niveles de proteínas poli-Ub están aumentados en ausencia de Ate1.**

iii. Rutas metabólicas involucradas en la respuesta autofágica

Con el propósito de determinar si la alteración observada en el flujo de autofagia está señalizada por las vías metabólicas que la regulan, se analizó el estado de activación de mTORC1 y AMPk. Para ello, se evaluó el nivel de fosforilación de la Ser2448 de mTOR (p-mTOR^{S2448}) y de la Thr172 de AMPk (p-AMPk^{T172}) frente a cambios en la expresión de Ate1. Como controles, se utilizó una condición de ayuno de suero que inhibe al complejo mTOR y una condición con suero e insulina que inhibe AMPk y activa mTOR [168]. De este modo, se cultivaron células MEFs *Ate1*^{-/-}, *Ate1*^{+/+} y *Ate1-1* en condiciones basales, en medio DMEM sin suero y en medio DMEM suplementado con insulina. Luego de 6 h de incubación, las muestras fueron procesadas y analizadas por Western blot. En presencia de suero, se observó que el nivel de p-mTOR^{S2448} está significativamente aumentado en las células *Ate1*^{-/-} con respecto a *Ate1*^{+/+} y *Ate1-1* (Figura 23a, b). En ausencia de suero, se observó una significativa disminución del nivel de p-mTOR^{S2448} en las células *Ate1*^{-/-}, mientras que en presencia de suero e insulina esta proteína fosforilada incrementó hasta alcanzar un nivel similar al control (en presencia de suero). En la vía de AMPk, se observó que el nivel de p-AMPk^{T172} está aumentado en las células *Ate1*^{-/-} en los distintos tratamientos (Figura 23a, c) y que disminuye ligeramente en presencia de insulina. Los niveles de



p-mTOR^{S2448} y p-AMPK^{T172} en células *Ate1-1* son comparables a los observados en células *Ate1^{+/+}*. Cabe destacar que la insulina, a pesar de actuar como inhibidor de la vía AMPk, no afectó significativamente los niveles de AMPk y mTOR fosforilado. Además, no se observaron cambios significativos en la activación de la vía AMPk en ausencia de suero. Estos resultados revelan que el nivel de fosforilación de mTORC1 está aumentado en ausencia de *Ate1*, y que a diferencia de AMPk, este complejo es sensible a los cambios nutricionales y energéticos de las células.

A continuación, se evaluó si la inhibición farmacológica de mTORC1 puede afectar el estado de fosforilación del complejo y los niveles de LC3-II/LC3-I, tanto en presencia como ausencia de *Ate1*. Para ello, se monitoreó el nivel de p-mTOR^{S2448} y LC3B en células *Ate1^{+/+}*, *Ate1^{-/-}* y *Ate1-1* tratadas con rapamicina (un inhibidor de mTORC1 que ejerce un efecto inductor de la autofagia) en presencia de CQ por 6 y 24 h [169]. Las muestras se analizaron por Western blot. Se observó que el nivel de p-mTOR^{S2448} está inicialmente aumentado en células *Ate1^{-/-}* (**Figura 24a, b**). Luego de 6 y 24 h de tratamiento, estos niveles disminuyeron hasta alcanzar valores equivalentes a los observados en *Ate1^{+/+}* y *Ate1-1*. Conforme con lo observado previamente en

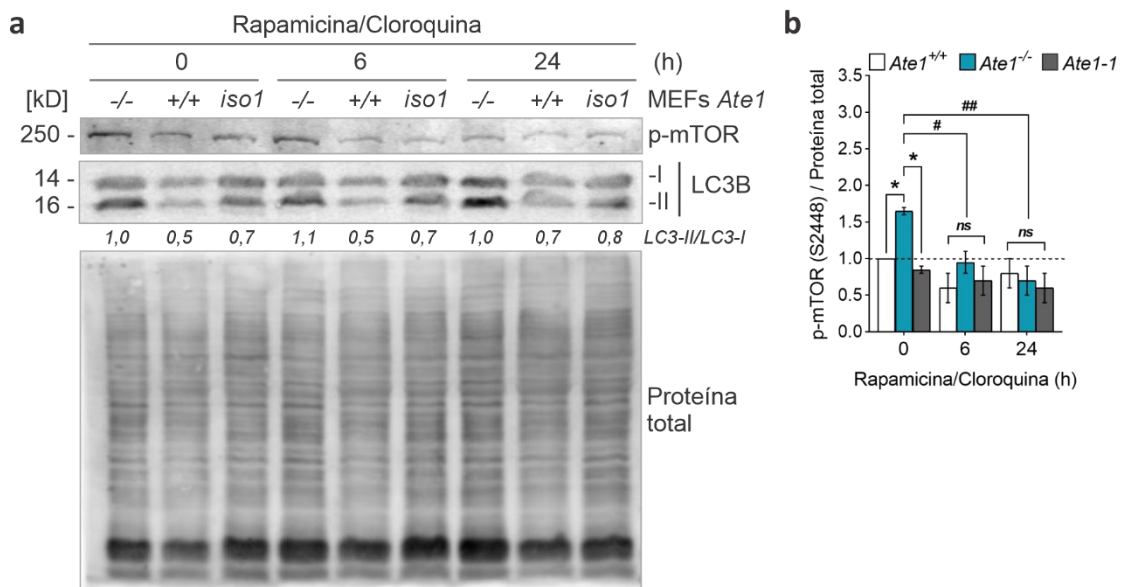


Figura 24. Niveles de fosforilación de mTORC1 (S2448) en presencia de rapamicina. (a) Células *Ate1^{-/-}*, *Ate1^{+/+}* y *Ate1-1* (*iso1*) se trataron con rapamicina 10 nM y CQ 20 μ M en medio completo durante 6 y 24 h. Las muestras se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos contra p-mTOR (S2448), LC3B y un marcador de proteínas totales como control de carga. La cuantificación de LC3-II, se expresó como el nivel de LC3-II respecto a LC3-I. (b) Cuantificación de los niveles p-mTOR (S2448) con respecto a proteínas totales. Los valores graficados son representativos de 2 experimentos independientes y corresponden a la media \pm EE. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ns, no significativo. Nivel de significancia entre grupos (*) y respecto al control (#). **El elevado nivel de fosforilación de mTORC1 observado en células *Ate1^{-/-}* es sensible a la inhibición farmacológica mediada por rapamicina; mientras que, la desfosforilación de mTOR no parece afectar el nivel de LC3-II/LC3-I.**

células *Ate1*^{-/-} en condiciones basales, los niveles de LC3-II están aumentados con respecto a LC3-I y, además, independientemente de la inhibición de mTOR, no se observaron cambios significativos en los niveles de esta proteína en las células. Este resultado revela que la inhibición farmacológica de mTORC1 con rapamicina promueve la desfosforilación del complejo en las tres líneas celulares, y que este estado no produce un cambio significativo en la conversión de LC3-I a LC3-II, al menos en los tiempos analizados.

La activación de mTORC1 implica la translocación de este complejo a la superficie de los lisosomas [17]. Para evaluar la localización de mTOR en nuestro modelo de estudio, se realizó una triple inmunotinción utilizando anticuerpos contra p-mTOR^{S2448}, Lamp-2 y Ate1 en células *Ate1*^{+/+} y *Ate1*^{-/-} incubadas en medio con o sin suero por 6 h. La distribución intracelular y los niveles endógenos de las proteínas se analizaron mediante microscopía confocal. En ausencia de suero, se observó que el patrón de expresión de p-mTOR^{S2448} es punteado y está distribuido en el citosol de las células *Ate1*^{+/+} (**Figura 25a**). En células *Ate1*^{-/-}, p-mTOR^{S2448} está ligeramente enriquecido en la región perinuclear de la célula y además, la intensidad de fluorescencia total del complejo es significativamente mayor que en células *Ate1*^{+/+} (**Figura 25a, b**). Cuando las células *Ate1*^{+/+} se cultivaron en presencia de suero, se observó un aumento de los niveles de p-mTOR principalmente en la región perinuclear de la célula. En células *Ate1*^{-/-}, la localización subcelular de la proteína no cambió significativamente, mientras que la intensidad de la fluorescencia sigue siendo mayor comparado con las células salvajes. Además, los niveles totales del complejo disminuyen cuando se cultivan las células *Ate1*^{+/+} en ausencia de suero comparado con los cultivos en presencia de suero, mientras que en células *Ate1*^{-/-} esta diferencia no se observa (**Figura 25b**). Adicionalmente, se evaluó si la señal de p-mTOR y Lamp-2 co-existen en el citosol y/o en la proximidades al núcleo de la célula. Para ello, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson de ambas señales en cada una de las condiciones. Este análisis reveló que en ausencia de suero el solapamiento de las señales de p-mTOR y Lamp-2 disminuye en células *Ate1*^{+/+}, mientras que en células *Ate1*^{-/-} no varía (**Figura 25c**). Por otra parte, no se observaron cambios significativos en los niveles de Lamp-2 tanto en células mutantes como salvajes (**Figura 25d**). Finalmente, estos resultados revelan que en presencia de suero en células *Ate1*^{+/+}, mTORC1 se fosforila y redistribuye en las cercanías al núcleo donde colocaliza con los lisosomas. En ausencia de Ate1, este efecto no se aprecia, dado que los niveles permanecen elevados y la distribución es acorde a un estado de activación, tanto en

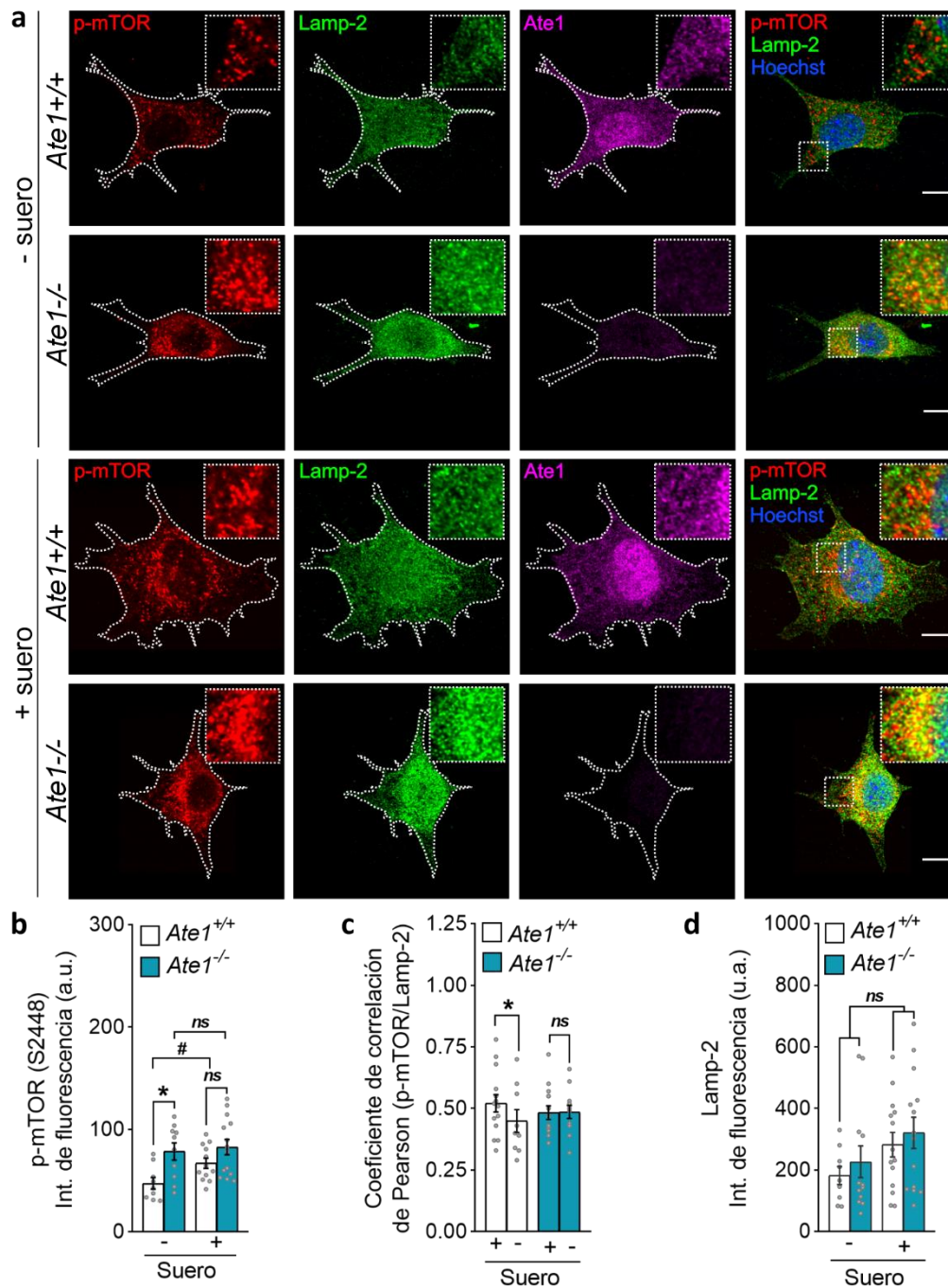
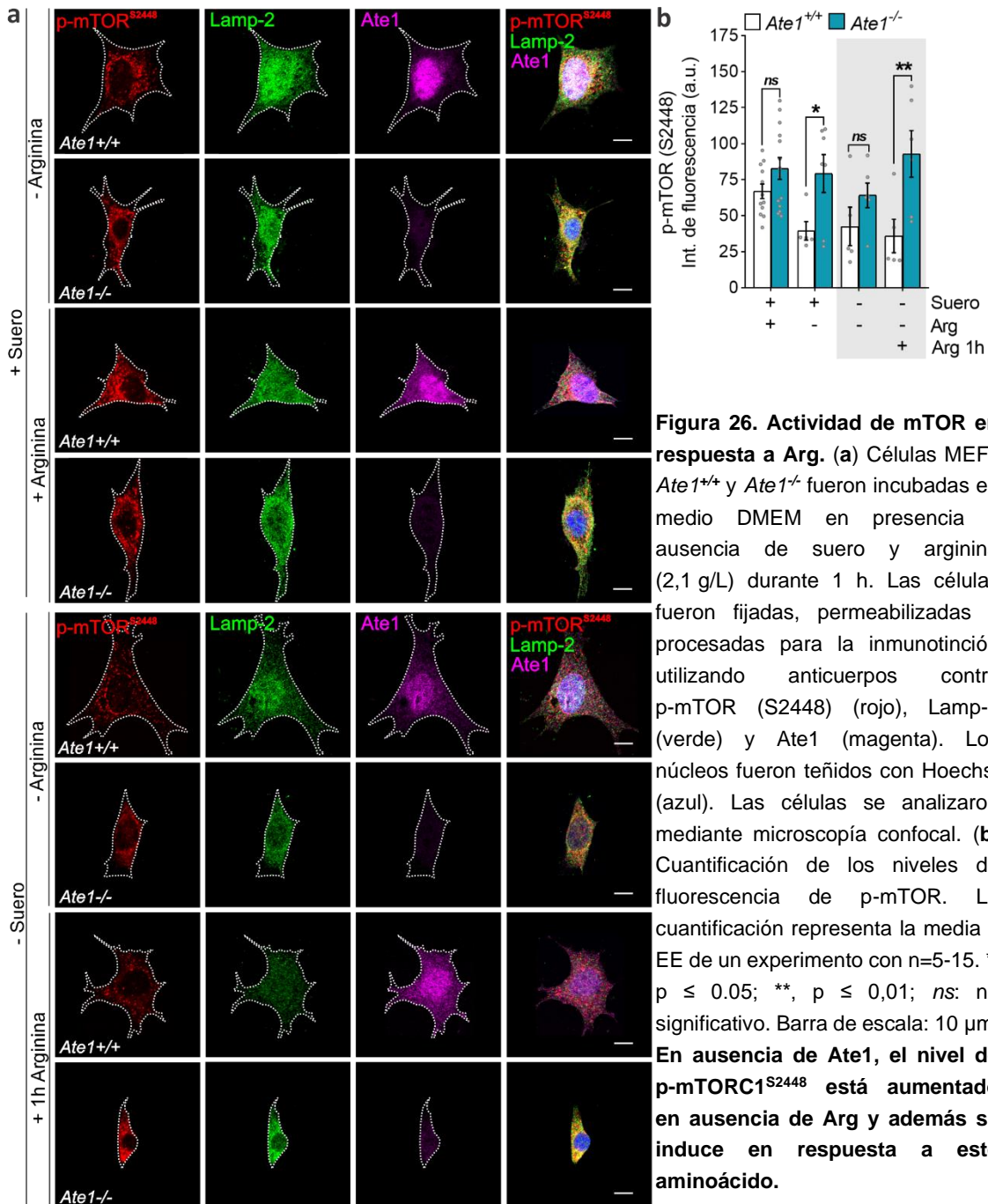


Figura 25. Distribución subcelular y niveles de p-mTORC1 (S2448). (a) Células MEFs *Ate1*^{+/+} y *Ate1*^{-/-} fueron incubadas en medio DMEM con o sin suero durante 16 h. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para la inmunotinción utilizando los anticuerpos p-mTOR (S2448) (rojo), Lamp-2 (verde) y Ate1 (magenta). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Las células se analizaron mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. Cuantificación de los niveles de fluorescencia total de (b) p-mTOR, (d) Lamp-2 y del (c) Coeficiente de Correlación de Pearson (CCP) de la señal de p-mTOR y Lamp-2. El CCP se calculó usando el *plug-in* "Coloc 2" del programa ImageJ-Fiji. Las cuantificaciones son representativas de un experimento con n=14 (*Ate1*^{-/-}) y n=14 (*Ate1*^{+/+}) células representadas por la media ± EE. *, p ≤ 0.05; ns: no significativo. Nivel de significancia entre grupos (*) y respecto al control (#). Barra de escala: 10 μm. **En células *Ate1*^{+/+}, mTOR se activa en presencia de suero, mientras que en células *Ate1*^{-/-}, mTOR se encuentra activo tanto en presencia o ausencia de suero.**

presencia como ausencia de suero. Esto sugiere que el complejo mTOR está activo en ausencia de Ate1, aún en condiciones de privación nutricional.

En ausencia de Ate1 en la célula, el metabolismo de la Arg podría estar afectado y en consecuencia, la disponibilidad de aminoácido libre o como residuo metabolizado. Se ha descrito que los aminoácidos Arg, Leu y Metionina (Met), son capaces de estimular la activación del complejo mTORC1 y su cascada de señalización [17]. Para evaluar si las células MEFs *Ate1*^{+/+} y *Ate1*^{-/-} son igualmente susceptibles a los niveles de Arg, se analizó mediante microscopía confocal, la distribución subcelular y los niveles de fluorescencia total de p-mTOR^{S2448} en células incubadas con medio DMEM con suero en presencia/ausencia de Arg, o en ausencia de suero/Arg y con un estímulo de Arg durante 1 h. Los resultados revelaron que en ausencia de este aminoácido, las células *Ate1*^{-/-} muestran un aumento significativo de los niveles de p-mTOR^{S2448} comparado con células *Ate1*^{+/+} (**Figura 26a, b**). Por otra parte, cuando se incubaron con Arg por 1 h se observó un aumento significativo de los niveles de p-mTOR en *Ate1*^{-/-} comparado con células *Ate1*^{+/+}. Estos resultados revelan que la vía mTOR está mayormente activa en ausencia de Ate1, y además señalan que el aminoácido Arg actúa como estímulo de la vía.



Discusión

Los resultados de este capítulo aportan evidencias concretas de la alteración del proceso de autofagia en ausencia de Ate1, y permiten establecer la importancia de esta enzima en la regulación de este mecanismo. En los últimos años se han identificado numerosas proteínas arginiladas metabólicamente estables, que intervienen en diferentes procesos biológicos [116, 123]. Por ejemplo, la arginilación de la chaperona CRT prolonga su vida media y tiene implicancias en los mecanismos de respuesta al estrés y en la supervivencia de la célula [122, 123, 170]. Recientemente, se demostró que esta proteína, al igual que otras chaperonas arginiladas, pueden interactuar con p62 y ser degradadas por la vía autofágica [149, 171-173]. Esta evidencia señala que no todos los sustratos de Ate1 son susceptibles a la degradación proteasomal y demuestra que el rol de la arginilación en los mecanismos de regulación proteolítica de proteínas es más complejo que el propuesto por la vía del N-degron. Con tales antecedentes, en este capítulo, se propuso caracterizar la respuesta autofágica en células frente a cambios en la expresión de la enzima Ate1.

En condiciones fisiológicas normales, la autofagia se produce en niveles basales bajos, por lo que el nivel de LC3-II suele ser menor al de LC3-I, o incluso a veces no es detectable. En ausencia de Ate1, se confirmó mediante ensayos de Western blot y microscopía confocal, que el nivel basal de LC3-II y el número de vacuolas autofágicas está significativamente aumentado (**Figura 18c, 20b**). Aunque este resultado indicaría que el flujo de autofagia está alterado, es importante diferenciar entre un aumento transiente de autofagosomas, producto de la inducción de la vía, respecto de una acumulación, debido a una degradación ineficiente de los sustratos. Para distinguir el efecto inductor o inhibidor del gen *ate1*, se analizó la tasa de formación y degradación de LC3-II y el recambio neto autofágico. De acuerdo con este análisis, se comprobó que la tasa de degradación de LC3-II está disminuida respecto a la tasa de formación (**Figura 19a**). Esta diferencia conduce a una disminución del recambio neto autofágico comparado con las células salvajes, *Ate1^{+/+}* (**Figura 19b**), revelando que el flujo de autofagia está disminuido en ausencia de Ate1. Si bien este ensayo permitió inferir el flujo de autofagia, sería importante complementar este análisis con la cuantificación del número de autofagosomas que transitan por la célula en tiempo real mediante microscopía confocal, es decir el flujo real de autofagia.

Adicionalmente, se analizó la capacidad de las células para inducir el flujo de autofagia en condiciones de privación de nutrientes. En células salvajes, la activación de la vía produce una mayor conversión de LC3-I a LC3-II, lo que se correlaciona con

un aumento del número de vacuolas autofágicas; mientras que, en ausencia de Ate1, se comprobó que este fenómeno está atenuado (**Figura 18, 20**). En relación al rescate del fenotipo salvaje, la expresión de la isoforma Ate1-1 en células *Ate1^{-/-}*, recuperó ligeramente la tasa de recambio autofágico (**Figura 19b**). El rescate parcial del fenotipo observado puede deberse a que la enzima en estas células está representada por múltiples isoformas y la presencia de todas estas proteínas pueda ser necesaria para lograr un efecto de rescate completo. También es posible que la plasticidad genética observada en las células *Ate1^{-/-}* pueda causar cambios adicionales en la vía de la autofagia que no puedan ser recuperados con la expresión ectópica de una única isoforma [144]. De acuerdo con esta evidencia, la respuesta autofágica está disminuida en ausencia de Ate1, y la expresión de la isoforma Ate1-1 revierte parcialmente este fenotipo.

La actividad autofágica se puede inferir a partir del seguimiento de los niveles de sustratos de autofagia. Es posible arrestar el flujo en un determinado punto y luego detectar la acumulación de organelas, marcadores de organelas, marcadores de cargas o una carga con el tiempo. Sin embargo, esta aproximación supone que no existe una retroalimentación del sustrato en cuestión, es decir, síntesis *de novo*. Por ese motivo, se realizó un análisis en condiciones basales y a tiempos cortos de tratamiento. Si bien se podría haber inhibido la síntesis de proteínas y analizado la disminución de un determinado sustrato, no es posible descartar el aporte a la degradación de la vía proteasomal. Además, es importante considerar que la cicloheximida puede activar el complejo mTORC1, e inhibir el flujo autofagia [174]. De acuerdo con esto, se analizó el nivel del sustrato autofágico p62. La alteración de la autofagia suele ir acompañada de una acumulación de p62, principalmente como oligómeros (secuestosomas) que pueden fusionarse hasta formar grandes agregados perinucleares, positivos para Ub, como se ha informado en numerosas enfermedades neurodegenerativas [175-180]. En concordancia con esto, se confirmó mediante ensayos de Western blot y microscopía confocal, que los niveles basales de p62 están incrementados en ausencia de Ate1 (**Figura 21a**), y que esta proteína se acumula mayoritariamente como secuestosoma (**Figura 22a, b**). Adicionalmente, se evaluó el nivel de p62 cuando se bloquean alternativamente las vías proteolíticas. Este ensayo permitió comprobar que independientemente de la vía bloqueada, p62 está aumentada en células *Ate1^{-/-}* respecto a células *Ate1^{+/+}* y *Ate1-1* (**Figura 21b**). Además, durante la inhibición proteasomal, la activación del mecanismo de autofagia debería ser capaz de compensar la degradación de p62, sin embargo, se observó una significativa acumulación de la proteína, y de los secuestosomas en células *Ate1^{-/-}* (**Figura 21b, 22b**). Cabe destacar

que este mecanismo de respuesta autofágica a la inhibición proteasomal puede inducir la expresión de p62, por lo que no se puede descartar que haya una contribución debido a un aumento de la transcripción del gen *p62* [181-183]. Se hubiera esperado que en respuesta a la inhibición autofágica, se acumularan los oligómeros de p62, sin embargo, esto no se observó en la cuantificación del número de agregados de la proteína (**Figura 22b**). Esto puede deberse a que, durante el bloqueo de la vía, los secuestrosomas se hayan fusionado entre sí formando estructuras de mayor tamaño, y por ello, la cuantificación resulte en un menor número de agregados. Por otra parte, se analizaron los niveles de las proteínas poli-Ub, las proteínas carga de p62 y se confirmó que los niveles de estos sustratos están aumentados en ausencia de Ate1 (**Figura 21b, 22d**). Dado que p62 interacciona con estas proteínas, este aumento podría atribuirse a la acumulación del adaptador por defectos en la degradación autofágica. En concordancia con la acumulación de vacuolas autofágicas observada, esta evidencia confirma que los sustratos de autofagia, p62 y proteínas poli-Ub se acumulan en ausencia de Ate1.

De acuerdo con el mecanismo de regulación que existe entre la maquinaria de autofagia y las condiciones nutricionales y energéticas de las células, se analizó el estado de activación de las principales rutas metabólicas involucradas en la respuesta autofágica, particularmente de mTOR y AMPk. En la mayoría de los sistemas, mTORC1 regula negativamente a la autofagia, por lo que la activación de este complejo se traduce en la inhibición de esta vía degradativa [184]. Acorde con esto, y con la disminución del recambio autofágico observada (**Figura 19**), se confirmó mediante microscopía confocal y ensayos bioquímicos, que en ausencia de Ate1, las células exhiben elevados niveles de mTORC1 fosforilado en Ser2448 (**Figura 23a, b**), una modificación que refleja el estado de activación del complejo [17, 19]. Se observó que, en condiciones de carencia nutricional, los niveles de fosforilación del complejo disminuyen significativamente, mientras que en presencia de nutrientes e insulina permanecen elevados (**Figura 23a, b**). Esto confirma que mTORC1 es capaz de censar los cambios nutricionales y energéticos en estas células y en consecuencia cambiar su estado de fosforilación. Además, es importante destacar que la expresión de la isoforma Ate1-1 en células *Ate1*^{-/-}, restablece casi totalmente los niveles de p-mTOR^{S2448} (**Figura 23a, b**).

Por otra parte, el efecto de AMPk en la autofagia depende del tipo celular y de las condiciones metabólicas de la célula. En hepatocitos, se ha descrito que AMPk tiene un efecto inhibitorio sobre la autofagia, mientras que puede estimularla en otros tipos celulares, como fibroblastos, carcinoma de colon, y células musculares [185-194].

La activación de este sensor energético se correlaciona con el estado de fosforilación en Thr172 y en general, antagoniza con la función de mTORC1 [29]. Se confirmó que el nivel de p-AMPK^{T172} está significativamente aumentado en células *Ate1*^{-/-}, tanto en presencia o ausencia de suero e insulina (**Figura 23a, c**). Además, este fenotipo se revierte cuando se expresa la isoforma *Ate1-1*. De este modo, el elevado nivel de fosforilación de mTOR en Ser2448 observado en células *Ate1*^{-/-} se correlaciona con la disminución del flujo de autofagia descrito en condiciones basales. Por otro lado, los niveles de fosforilación del complejo disminuyen en ausencia de suero (autofagia inducida), lo que se condice con una leve inducción de autofagia en estas células. Una posible explicación para este comportamiento es la presencia de niveles residuales de p-mTOR^{S2448} observados en células *Ate1*^{-/-} (**Figura 23a, b**), que podrían estar inhibiendo la activación de autofagia mediada por AMPK/ULK1.

Se ha descrito que la actividad de mTOR puede ser inhibida en respuesta al tratamiento con rapamicina [169]. Esta molécula forma un complejo con la proteína de unión a FKB506 (FKBP12), inhibiendo las rutas de señalización efectoras dependientes de mTOR. Acorde con esto, se encontró que rapamicina disminuye los niveles de p-mTORC1^{S2448} hasta alcanzar valores similares al de las células *Ate1*^{+/+} y *Ate1-1* (**Figura 24b**). Si bien las células *Ate1*^{-/-} sufren una dramática disminución de los niveles de p-mTORC1^{S2448} en respuesta a rapamicina en comparación con las otras líneas celulares, esto no se traduce en una mayor conversión de LC3-II a LC3-I, o inducción de autofagia (**Figura 24a**). Esta evidencia confirma, por un lado, que la fosforilación S2448 de mTORC1 se correlaciona con el estado de activación del complejo y, por otro lado, sugiere que la inducción de autofagia está afectada en ausencia de *Ate1*.

Se ha reportado que la activación de mTORC1 implica la translocación del complejo hacia la superficie del lisosoma donde interacciona con el complejo Rags/Ragulator/v-ATPasa, por intermedio del cual se desencadena la cascada de señalización que culmina en la inducción de múltiples procesos anabólicos y en la inhibición de procesos catabólicos (**Figura 27**) [17]. Acorde con esto, se comprobó que, en presencia de nutrientes, p-mTOR^{S2448} colocaliza con una proteína de la superficie lisosomal (Lamp-2), tanto en células *Ate1*^{+/+} como *Ate1*^{-/-}. Sin embargo, en ausencia de nutrientes, esta colocalización se pierde en células *Ate1*^{+/+}, y el nivel de fluorescencia total disminuye, lo que se atribuye a una relocalización citosólica e inactivación del complejo. Esto no se observa en células *Ate1*^{-/-}, donde el complejo mantiene su localización junto al lisosoma y no se observan cambios significativos en el nivel de fluorescencia total (**Figura 25**). La permanencia de este complejo en la superficie del

lisosoma, en presencia y ausencia de nutrientes, podría estar relacionada con el estado de hiperfosforilación de mTORC1. De acuerdo con este fenotipo, el complejo mTORC1 podría estar hiperactivado en estas células, aunque para confirmarlo sería necesario evaluar el estado de fosforilación de ULK1, que se encuentra corriente abajo en la cascada de señalización.

Es preciso señalar, que el estado de activación permanente o crónico de mTOR puede provocar una respuesta diferencial a la de una inducción transiente. Dado que este complejo regula el crecimiento celular, durante su activación, la célula podría sufrir hipertrofia como resultado de la síntesis de proteína, lípidos, y otros componentes celulares [17]. Sin embargo, este fenómeno no se observa en las células *Ate1^{-/-}*, por el contrario, estas son de menor tamaño comparado con las células salvajes, *Ate1^{+/+}* (**Figura 26**). De este modo, la activación de mTORC1 en células *Ate1^{-/-}*, podría tener otras implicancias respecto a las observadas durante una inducción transiente y de corto plazo.

La activación de los procesos anabólicos dependientes de mTORC1 ocurren en presencia de señales endocrinas favorables al crecimiento, reservas energéticas y residuos aminoacídicos para la síntesis de macromoléculas. mTORC1 es capaz de detectar los niveles de aminoácidos a través de sensores citoplasmáticos e intralisosomales (**Figura 27**) [195]. Estudios recientes han demostrado que tres aminoácidos pueden activar la vía de mTORC1: Leu, que posee dos sensores citoplasmáticos (Sestrin 1/2 y Leucil-ARNt sintetasa), Met que posee un único sensor citoplasmático (Samtor), y Arg que posee tres sensores, uno citoplasmático (CASTOR1) y dos intralisosomales (SLC38A9, TM4SF5) [196-202]. De acuerdo con Navé y colaboradores, la privación de aminoácidos está asociada a la desfosforilación de mTORC1 en Ser2448, y desempeña un rol clave en la regulación de la función de mTOR y la síntesis de proteínas [203]. Estos antecedentes, resultan muy interesantes, dado que en ausencia de *Ate1*, la arginilación no ocurre en la célula, y por ello, los niveles de Arg libres disponibles podrían variar. En concordancia con esto, se observó que el nivel de p-mTOR^{S2448} disminuye cuando las células *Ate1^{+/+}* se cultivan en ausencia de Arg, mientras que en células *Ate1^{-/-}* está aumentado (**Figura 26**). Además, se confirmó que la adición de Arg al medio de cultivo provoca una sobreestimulación de p-mTOR^{S2448} en células *Ate1^{-/-}* que no se observa en células *Ate1^{+/+}* después de 1 h de incubación. De acuerdo con esta evidencia, los niveles de Arg libre podrían actuar como un suplemento nutricional que mantiene activo al complejo, independientemente del estado nutricional y energético de la célula. Este fenómeno podría explicar por qué el complejo permanece

en la superficie de los lisosomas y por qué sus niveles de fosforilación están aumentados comparado con el de células salvajes.

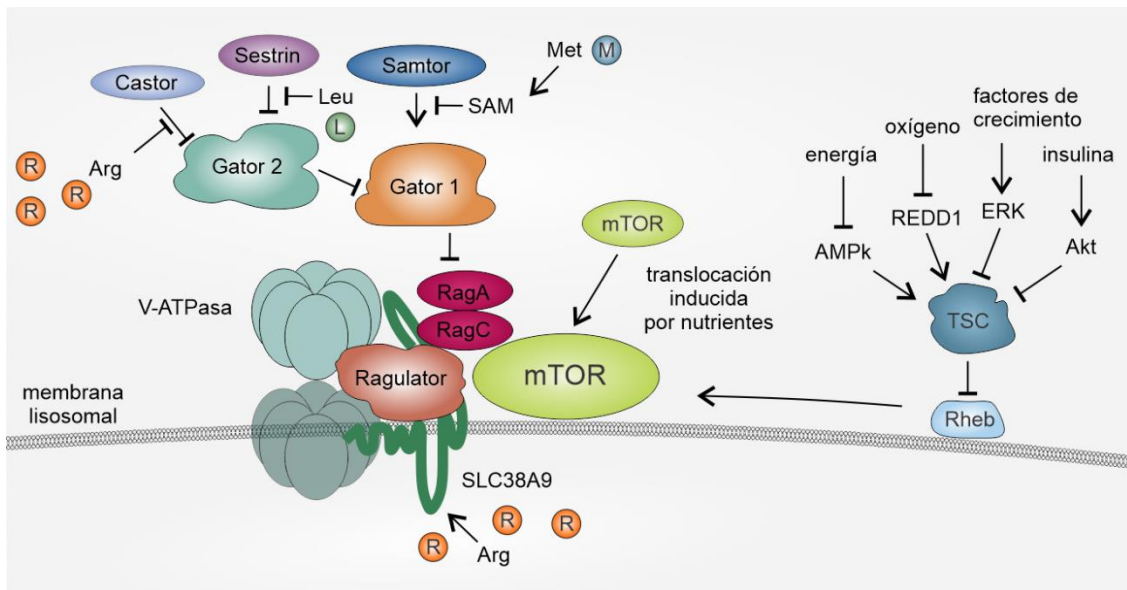


Figura 27. Mecanismo de activación de mTORC1. En ausencia de aminoácidos y factores de crecimiento, Rag-GTPasas (Rags) y Rheb están inactivos, y mTORC1 está físicamente disociado de Rheb. Los factores de crecimiento activan Rheb, sin embargo, los aminoácidos (Arg, Leu y Met) son esenciales para su interacción con mTORC1, por lo que este complejo permanece inactivo. Los aminoácidos activan las Rags, las cuales reclutan a mTORC1 al lisosoma, permitiendo la interacción con Rheb. Sin embargo, en ausencia de factores de crecimiento, Rheb y mTORC1 permanecen inactivos. La estimulación con aminoácidos convierte a las Rags en su estado activo unido a nucleótidos, lo que facilita el reclutamiento de mTORC1 a la superficie lisosomal, donde se encuentra con Rheb. La señalización de mTORC1 sólo se activa cuando las Rags y Rheb están activados, lo que explica por qué tanto los factores de crecimiento y los aminoácidos son necesarios para la activación de esta vía. mTORC1 detecta tanto los aminoácidos intralisosomales como los citosólicos. A nivel citosólico, los sensores Castor, Sestrin y Samtor son capaces de detectar Arg, Leu y Met, respectivamente y a través de Gator1/Gator2 inducir la activación de mTORC1. mTORC1 responde a otras señales intracelulares tales como bajos niveles de ATP (energía), hipoxia (oxígeno) y hormonas a través de AMPk, REDD1 y Akt, respectivamente. Los aminoácidos dentro del lumen lisosomal alteran el estado de los nucleótidos de Rag a través de un mecanismo que depende de la v-ATPasa, que interactúa con el complejo Rag/Ragulator para promover la actividad del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, del inglés *Guanine nucleotide Exchange Factor*) de Ragulator hacia RagA/B. El transportador lisosomal de aminoácidos SLC38A9 interactúa con el complejo Ragulator-v-ATPasa y es necesario para que Arg active mTORC1. Adaptado de Saxton y col. 2017 [17].

Otra posible contribución al fenotipo de activación de mTORC1 en las células *Ate1*^{-/-} podría estar relacionado con determinados sustratos de arginilación. Se ha descrito que la arginilación de sustratos pertenecientes a la familia de proteínas RGS (RGS4, RGS5, RGS16 y RGS7) controla el recambio proteico de las mismas a través de la vía del N-degron [110, 112]. En el ratón *Ate1* KO, las proteínas RGS no se degradan adecuadamente por lo que la señalización de la vía asociada a proteína G está afectada, lo que conduce a una significativa disminución de los formas activas de RAF1, MEK1, ERK1/2 [112, 126]. Esto altera el desarrollo del tubo neural y produce

deficiencias cardiovasculares que afectan la supervivencia del animal. Además, en otros modelos de animales deficientes de *Ate1*, se han descrito numerosas alteraciones metabólicas. Por ejemplo, Brower y colaboradores desarrollaron un sistema de delección condicionada de *Ate1* en ratón, inducible por tamoxifeno utilizando el sistema *Cre-loxP*, que sufre de pérdida de peso, órganos de gran tamaño y un mayor índice metabólico basal [127]. Otros autores reportaron que a nivel celular, la arginilación mediada por la enzima *Ate1* interviene en procesos que modulan el crecimiento, la migración y diferenciación celular [114, 116, 131, 144]. Al igual que la autofagia, muchos de los estímulos que modulan estos procesos lo hacen a través de la activación o represión del complejo mTOR. La autofagia es elemental para la renovación celular y forma parte del proceso de desarrollo y la diferenciación celular en condiciones fisiológicas normales. Precisamente, la diferenciación celular implica el reciclado de parte de sus moléculas y organelas para dar lugar a una nueva célula con morfología y función específicas. En este sentido, en nuestro laboratorio se demostró que el silenciamiento de *Ate1* en cultivos primarios de oligodendrocitos, reduce la extensión y complejidad de los procesos, afectando la diferenciación de dichas células gliales [118]. En relación a esto, en células HOG en las que se sobreexpresó individualmente cada isoforma, se observó un mayor número de procesos (véase **Anexo. Figura Sup. 2**). Por otro lado, en un modelo *in vivo* de ratón *Ate1* cKO en oligodendrocitos, se observaron múltiples capas de mielina no compacta en axones de la médula espinal [118]. Con respecto a esto, se conoce que la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Akt es suficiente para incrementar la mielinización en el SNC a través de la señalización de mTOR [204-206]. Además, mTORC1 es uno de los principales impulsores del crecimiento celular y suele estar desregulado en el cáncer [207]. Kashina A. y colaboradores describieron que las células utilizadas en este trabajo de tesis, MEFs *Ate1*^{-/-} exhiben un fenotipo tumoral, con una alta tasa de proliferación (**Tabla 2**). Estos antecedentes muestran que la desregulación del gen *ate1* está implicada en numerosos procesos relacionados a mTOR.

Tabla 2. Características fenotípicas de las células MEFs *Ate1*^{-/-}.

Mecanismo	Observaciones
Proliferación	Severos defectos en la inhibición por contacto durante el crecimiento. Forma <i>clusters</i> y <i>foci</i> con múltiples capas de células apiladas [131, 144].
Apoptosis	No se observan diferencias con respecto a las células salvajes.
Adhesión	Defectos en la expresión de E-cadherina y en la adhesión célula-célula [114].
Migración	Defectos en la migración [116].
Ciclo celular	No se observan alteraciones del ciclo celular con respecto a las células salvajes. En cultivos confluentes el ciclo celular sigue activo [144].

De acuerdo con lo expuesto en este capítulo, en ausencia de Ate1 el complejo mTORC1 se encuentra hiperactivado, esto se correlaciona una disminución del flujo de autofagia, que a su vez provoca una acumulación de los sustratos autofágicos. La expresión de la isoforma Ate1-1 en estas células restablece los niveles de mTORC1, AMPk y p62, y parcialmente los niveles de LC3 y el flujo de autofagia. Además, en condiciones de déficit nutricional, estas células no activan eficientemente la autofagia. Si bien esto podría deberse a que el sensor está desensibilizado, este no parece ser el caso, ya que el complejo es capaz de responder a los cambios nutricional y energéticos de la célula. Los resultados de este capítulo proporcionan la primera evidencia de que Ate1 es necesaria para la activación y el correcto funcionamiento del proceso de degradación autofágico.

Aunque los antecedentes sugieren que la arginilación puede estar implicada en la respuesta al estrés y/o en la degradación de proteínas, Ate1 parece tener mayores implicancias en la fisiología de la célula. Teniendo en cuenta la amplia gama de proteínas sustrato de la arginilación, es razonable especular que esta enzima pueda actuar como regulador de múltiples procesos celulares. La comprensión del mecanismo de regulación de esta enzima en los procesos asociadas a la vía de mTOR, será motivo de futuros estudios.

CONCLUSIÓN

Los resultados que integran esta tesis revelan que Ate1 está involucrada en la regulación y activación del proceso de autofagia. La distribución subcelular de esta enzima junto con el adaptador autofágico p62 y sus cargas, pone de manifiesto la estrecha relación que existe entre Ate1 y la maquinaria de autofagia. Más aún, la estabilidad y capacidad de esta enzima para formar complejos hetero-oligoméricos revelan que podría contribuir al procesamiento de sustratos de degradación. Además, la ausencia de Ate1 en células produce alteraciones metabólicas relacionadas a la hiperactivación de mTOR, que afectan directamente el proceso de inducción y degradación de sustratos, lo cual pone en evidencia su implicancia en la regulación de la autofagia.

Estos hallazgos representan un avance al estado actual del conocimiento acerca de la función de Ate1 en los mecanismos de regulación proteolíticos. Dado que la proteólisis desempeña un rol central en varios procesos biológicos subyacentes a múltiples enfermedades humanas, la comprensión de la relación funcional y la regulación entre el UPS y la autofagia contribuirá al desarrollo de nuevas terapias para modular la proteostasis.

PERSPECTIVAS

Ate1 y su asociación a membranas biológicas.

De acuerdo con la localización descrita para Ate1 y los componentes de la maquinaria de arginilación postraduccional, actualmente, se ha postulado que esta reacción ocurre en el citosol de la célula. Sin embargo, mediante ensayos bioquímicos y de proteómica se identificaron cientos de sustratos arginilados tanto *in vitro* como *in vivo* que varían en su localización, desde proteínas citosólicas, nucleares y compartimentadas en organelas y/o en vesículas [113, 120]. Un ejemplo, es la proteína β -amiloide que puede ser internalizada por la vía endocítica, allí se escinde un péptido formando un fragmento susceptible de ser arginilado [135, 208]. También fue descrita la arginilación de numerosas chaperonas residentes del RE, tal como CRT, BIP, y PDI [111, 120]. Algunos autores han demostrado que estas proteínas sufren una retrotranslocación desde el RE al citosol donde podrían ser modificadas; sin embargo, en el caso de la proteína de secreción α -1-antitripsina, sintetizada en el RE y sustrato de arginilación, no hay evidencia de su presencia en el citosol [209]. Hasta el momento, no está claro el mecanismo a través del cual se modifican estos sustratos. La asociación de Ate1 a membranas biológicas observada en esta tesis aporta una nueva evidencia que podría explicar la dinámica de arginilación de algunos sustratos. En este sentido, sería interesante identificar la membrana con la que Ate1 está asociada y confirmar el tipo de interacción que la mantiene unida. Mediante un análisis bioinformático de la secuencia de Ate1, se identificó un segmento hidrofóbico conservado de 19 aminoácidos que podría estar involucrado en esta interacción (véase **Anexo. Figura Sup. 3**). Además, en experimentos preliminares de aislamiento de vesículas extracelulares (EVs), se observó la presencia de la enzima (véase **Anexo. Figura Sup. 4**). Dado que Ate1 transfiere Arg desde un arginil-ARNt^{ARG}, la reacción de arginilación depende de la presencia y actividad de la enzima arginil-ARNt-sintetasa. De acuerdo con las moléculas identificadas en EVs publicadas en bases de datos, la enzima arginil-ARNt sintasa y el ARNt^{ARG} están presentes en EVs de células humanas y de ratón. La presencia de enzimas involucradas en el mecanismo de arginilación asociadas a EVs no ha sido descrita con anterioridad. Esto abre un nuevo capítulo en el campo de esta modificación postraduccional y pone en evidencia la existencia de mecanismos celulares alternativos para la modificación local de sustratos compartimentados.

Regulación de la degradación autofágica y neurodegeneración

En el SNC, Ate1 se expresa en neuronas, oligodendrocitos y otras células gliales. Los oligodendrocitos cumplen una función esencial para el correcto funcionamiento del SNC, como es la producción de mielina. El rol de Ate1 en estas células, se describió por

primera vez en nuestro laboratorio, producto del estudio realizado en un ratón con una mutación condicional de *Ate1* en oligodendrocitos [118]. En este trabajo se demostró que la delección de *Ate1* afecta la diferenciación de los oligodendrocitos y el proceso de mielinización de los axones, lo que produce alteraciones motrices en el ratón cKO. Por otra parte, la delección de genes esenciales en el proceso de autofagia (como *atg5* o *atg7*) en el SNC, provoca un retraso en el crecimiento del animal, alteraciones del comportamiento, déficit motor y neurodegeneración. Dichos cambios se encuentran asociados a una acumulación de agregados proteicos lo que refleja la importancia de la autofagia en el desarrollo del SNC [210, 211]. De acuerdo a lo descrito en esta tesis, respecto del fenotipo observado en células *Ate1*^{-/-} y el funcionamiento de la autofagia, sería interesante estudiar el efecto de la delección de *Ate1* en oligodendrocitos *in vivo*. Por ejemplo, la atrofia multisistémica (AMS) forma parte de un grupo diverso de trastornos neurodegenerativos denominados α -sinucleinopatías debido a la presencia de inclusiones citoplasmáticas anormales de α -sinucleína en los oligodendrocitos (denominadas inclusiones citoplasmáticas gliales). Estas inclusiones son características de la AMS y se cree que desempeñan un rol central en la patogénesis de la enfermedad [212]. En este aspecto, sería interesante analizar la expresión y la acumulación de α -sinucleína en el modelo de ratón *Ate1* cKO y establecer la implicancia de *Ate1* en este proceso fisiopatológico *in vivo*. Asimismo, este análisis se podría realizar en neuronas, las cuales expresan numerosas proteínas (Tau, TDP-43, β -amiloide, Huntingtina, etc.) asociadas a enfermedades neurodegenerativas.

Arginilación y síntesis proteica

De acuerdo con lo descrito por Sabatini y colaboradores, la Arg es uno de los principales aminoácidos capaces de activar al complejo mTORC1 [198, 201]. Los resultados presentados en el Capítulo 2, muestran que este sensor nutricional se encuentra activado en células *Ate1*^{-/-}, aún en ausencia de nutrientes. Conforme con esto, existe la posibilidad que debido a una mayor disponibilidad de Arg libre (en ausencia de *Ate1* y de arginilación), el complejo se mantenga activo e impida que la autofagia sea inducida adecuadamente. Es importante tener en cuenta que mTOR controla la síntesis de ARNt, la producción de aminoácidos, los principales componentes de la síntesis de proteínas y de la reacción de arginilación. En relación a eso, sería interesante evaluar si existe algún mecanismo de regulación entre estos procesos, por ejemplo, a través del metabolismo de la Arg y/o del complejo mTOR.

ANEXO

Figuras Suplementarias

Figura Suplementaria 1. Análisis de FRET mediante microscopía confocal. (a) Células MEFs *Ate1-2* fueron transfectadas con un plásmido p62-mCherry. La señal de p62 y Ate1-2 proviene de la fluorescencia intrínseca de mCherry (rojo) y GFP (verde). Las flechas blancas señalan la colocalización entre ambos fluoróforos. (b) Análisis de la transferencia de energía entre el fluoróforo GFP (aceptor) y mCherry. La escala color representa la intensidad de la transferencia de fluorescencia de menor (azul) a mayor (naranja). Los recuadros señalan las áreas magnificadas. Barra de escala: 2 μ M. **Ate1 se encuentra interaccionando con p62.**

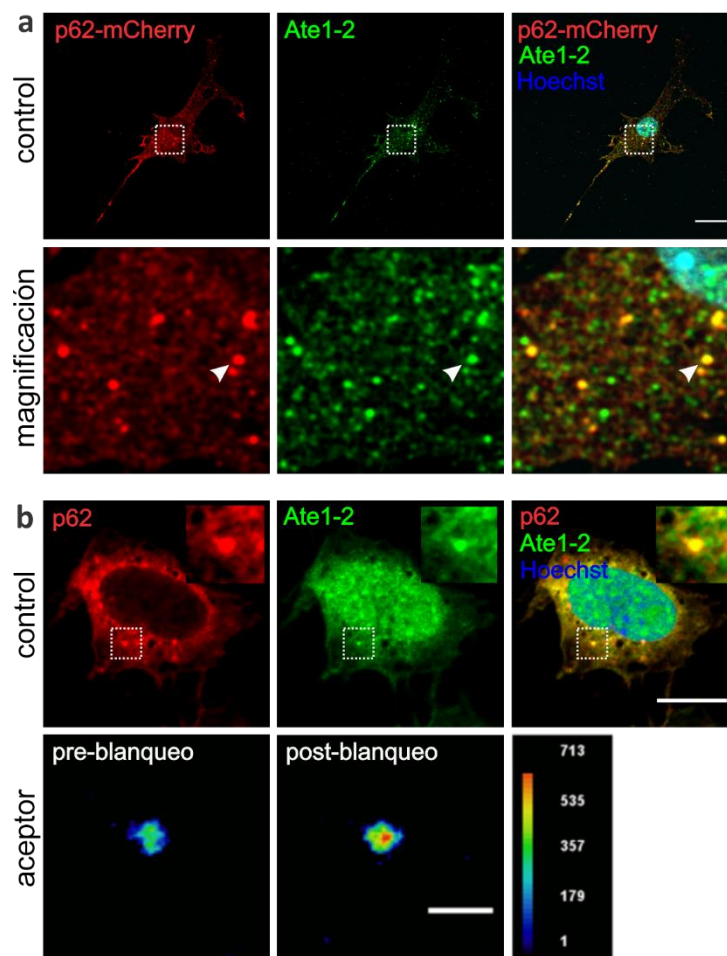


Figura Suplementaria 2. Fenotipo de diferenciación en células HOG. Células HOG fueron infectadas con partículas virales: vacías (pLenti), con peGFP (GFP) y con cada isoforma de Ate1 fusionada a GFP (Ate1-1, -2, -3 y -4) y luego se trataron con BT 500 nM por 12 h. Las células se fijaron y permeabilizaron. La detección de las isoformas de Ate1 se realizó observando la fluorescencia intrínseca de la GFP (verde). Para la marcación de la membrana plasmática y del núcleo celular se utilizaron los colorantes, Aglutinina de germen de trigo (AGT) (rojo) y Hoechst (azul). Las células se analizaron mediante microscopía confocal. Los recuadros muestran detalles con mayor magnificación. Barra de escala: 20 μ m. **La sobreexpresión de Ate1 induce la diferenciación de las células HOG cuando se inhibe el proteasoma.**

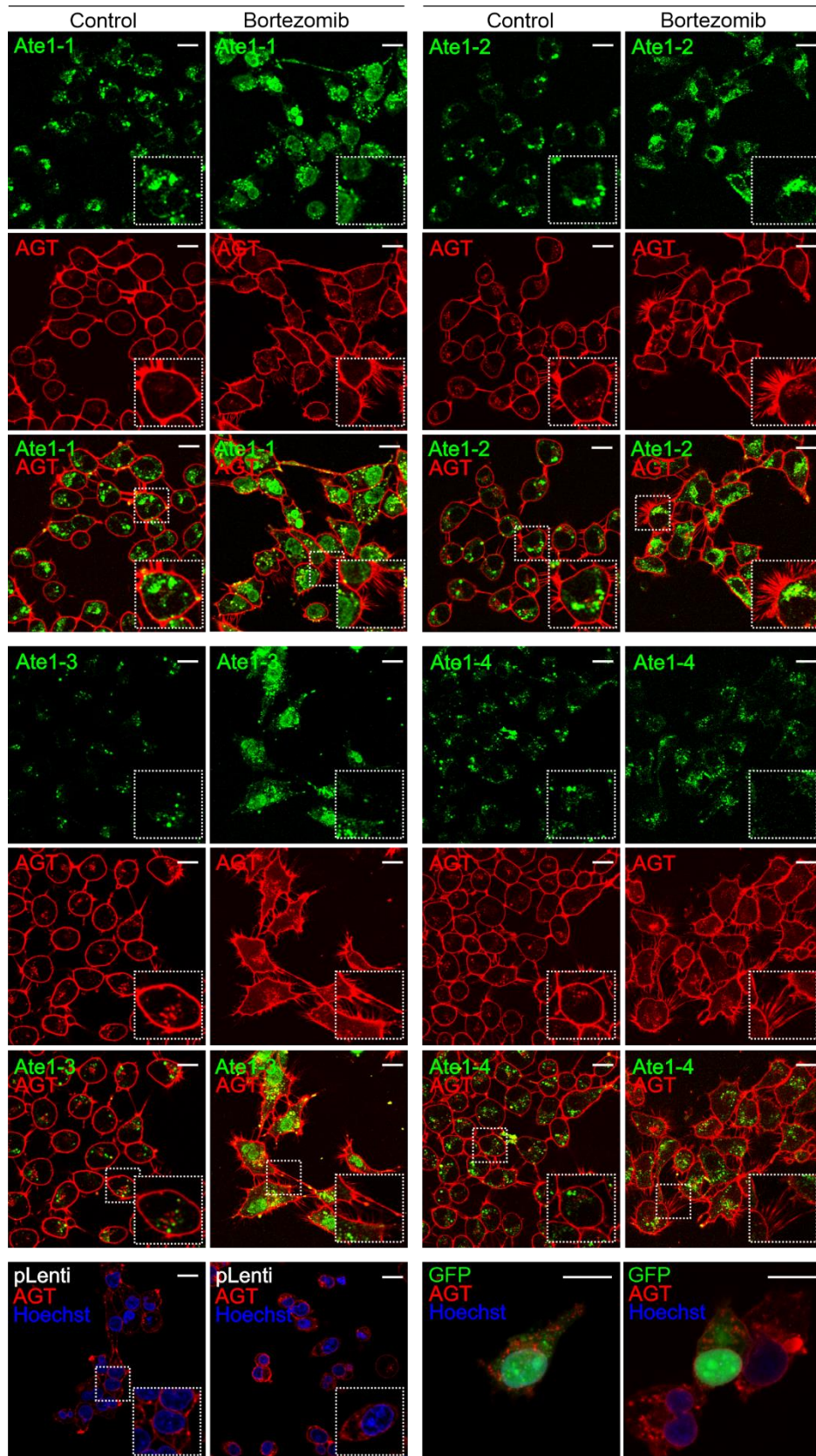
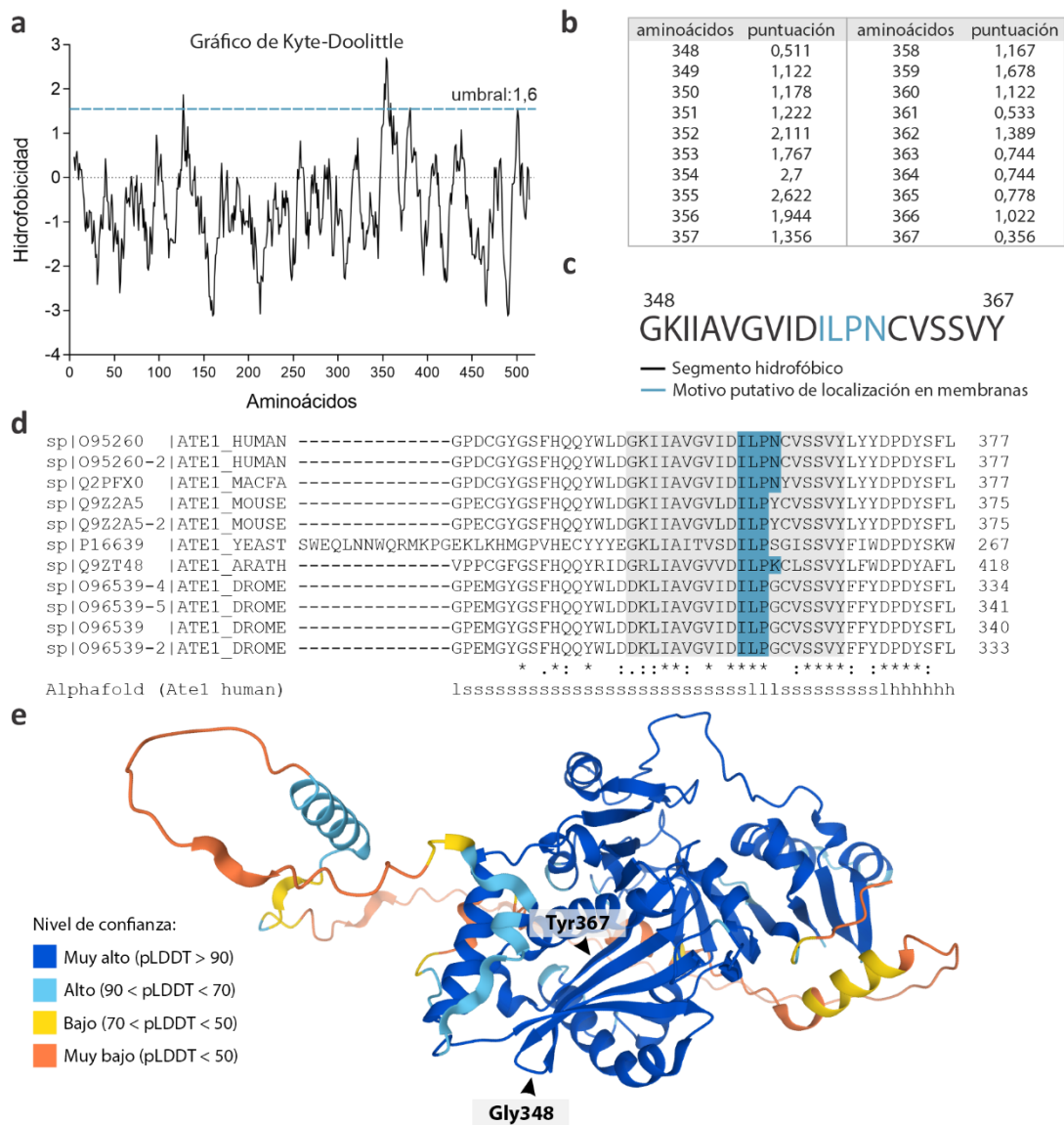
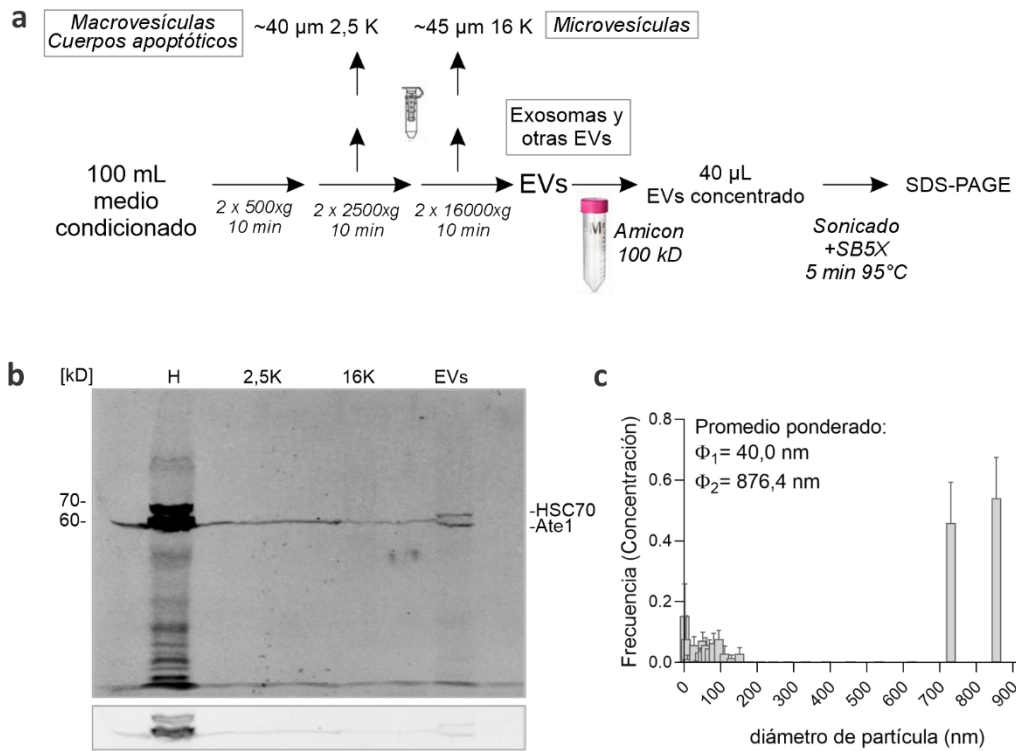


Figura Suplementaria 3. Análisis bioinformático de la hidrofobicidad de Ate1. (a) Análisis de la hidrofobicidad ponderada de la secuencia de aminoácidos de Ate1-1 (homo sapiens) representado en un gráfico de Kyte-Doolittle. La línea de color representa el valor de corte designado empíricamente como 1,6 para una secuencia mínima de 19 aminoácidos, por encima de ese valor se considera que el segmento tiene carácter hidrofóbico. (b) Secuencia aminoacídica del segmento hidrofóbico (negro) y del presunto motivo de direccionamiento a membrana vacuolar (DILP). (c) Puntuación de la hidrofobicidad de los aminoácidos del segmento hidrofóbico. (d) Alineamiento de las secuencias de Ate1 de especies homólogas y predicción de la estructura secundaria mediante el programa AlphaFold. El segmento hidrofóbico está identificado en gris y el motivo ILPN/ILPK en verde. l: loop (giro); s: strand (lámina-β); h: hélix (hélice). (e) Modelo de la estructura secundaria de Ate1 humana. AlphaFold le asigna una puntuación de 0 a 100 a cada residuo (pLDDT, del inglés *per-residue confidence score*) según el nivel de confianza del modelo. Los residuos Gly348 y Tyr367 del segmento hidrofóbico están señalados con flechas negras. [102]. **Ate1 posee un segmento hidrofóbico conservado, que contiene un posible dominio de unión a membranas. Se predice una conformación lámina-β para la región hidrofóbica [348-367].**



Debido a que la estructura cristalina de Ate1 no está disponible, las posibles regiones hidrofóbicas presentes en la secuencia de la enzima se identificaron a través del programa de predicción ProtScale. Este predictor calculó y representó el perfil de hidrofobicidad de Ate1 humana según la escala de Kyte-Doolittle (KD). De acuerdo con esta escala, las regiones con un valor positivo son hidrofóbicas. En general, los segmentos de 5-7 aminoácidos corresponden a regiones expuestas a la superficie, mientras que los segmentos más extensos de 19-21 aminoácidos podrían ser compatibles con dominios transmembrana, siempre que la puntuación o *score* esté por encima de 1,6 en la escala de KD [213]. El análisis de la secuencia de Ate1-1 humana indicó que posee un segmento hidrofóbico de 19 aminoácidos (**Figura Sup. 3a-c**). Además, utilizando el programa de predicción de localización Wolf Psort, se identificó un posible dominio de direccionamiento a membranas vacuolar (ILPN/ILPK) dentro de la región hidrofóbica (**Figura Sup. 3b**). A continuación, se realizó un alineamiento de múltiples secuencias de Ate1 homólogas mediante el programa Clustal Omega, el cual reveló que el motivo ILPN/ILPK está conservado (**Figura Sup. 3d**). Mediante Alphafold, se predijo la estructura secundaria de Ate1 humana. Este análisis reveló que el segmento identificado como hidrofóbico tiene una conformación lámina- β (con un muy alto nivel de confianza), la cual no sería compatible con un paso transmembrana (**Figura Sup. 3e**). Otros antecedentes señalan que Ate1 “interactúa” con proteínas localizadas en los endosomas involucradas en procesos de endo y exocitosis y transporte intracelular, tal como Rab7b; Rab5a; Vsp26; Rae1, entre otras. Además, Ate1 presenta un motivo di-leucina conservado en humano, ratón y *Drosophila melanogaster* que actúa como sitio de unión para las proteínas adaptadoras necesarias para el tráfico intracelular de proteínas.

Figura Suplementaria 4. Aislamiento de Ate1 en vesículas extracelulares. (a) Procedimiento del aislamiento de las EVs en células HeLa-LC3 GFP. (b) Los niveles de Ate1 en el homogenato total (H), y en las fracciones de 2,5 K, 16 K y de EVs se analizaron Western blot utilizando un anticuerpo contra Ate1 (Merck Millipore). Como control de las EVs se utilizó la proteína HSC70 (Santa Cruz).



Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Niveles de LC3-II y LC3-II (*raw data*). Cuantificación de la tasa de formación y degradación de LC3-II y recambio neto autofágico.

6 h CQ		WT		KO		Ate1	
		Exp-/CQ-	Exp-/CQ+	Exp+/CQ-	Exp+/CQ+	Exp+/CQ-	Exp+/CQ+
	Exp162-1	0,03133108	0,06050616	0,09322320	0,11742616	0,02926631	0,04175505
	Exp162-2	0,05221648	0,06028741	0,05185936	0,06972983	0,03540055	0,05809001
	Exp162-3	0,00950284	0,01102250	0,01762298	0,04114568	0,02558531	0,04601094
	Raw data	0,031	0,044	0,054	0,076	0,030	0,049
		Formación	Degradación	Flujo Neto			
Exp162-1	Exp- (WT)	0,0291751	0,0291751	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,0860951	0,0242030	0,2811190			
	Exp+(Ate1)	0,0104240	0,0124887	1,1980794			
Exp162-2	Exp- (WT)	0,0080709	0,0080709	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,0175134	0,0178705	1,0203909			
	Exp+(Ate1)	0,0365081	0,0204256	0,5594821			
Exp162-3	Exp- (WT)	0,0015197	0,0015197	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,0316428	0,0235227	0,7433814			
	Exp+(Ate1)	0,0365081	0,0204256	0,5594821			
		FormRatio	FormDeg	Flujo neto	Flujo Neto Prom		
KO	Exp162-1	2,95	0,83	0,28	1,00	WT	
	Exp162-2	2,17	2,21	1,02	0,68	KO	
	Exp162-3	20,82	15,48	0,74	0,77	Ate1	
Ate1	Exp162-1	0,36	0,43	1,20			
	Exp162-2	4,52	2,53	0,56			
	Exp162-3	24,02	13,44	0,56			

24 h CQ		WT		KO		Ate1	
		Exp-/CQ-	Exp-/CQ+	Exp+/CQ-	Exp+/CQ+	Exp-/CQ-	Exp-/CQ+
	Exp162-1	0,03133108	0,05421705	0,09322320	0,13157733	0,02926631	0,03523371
	Exp162-2	0,05221648	0,06490009	0,05185936	0,08794037	0,03540055	0,05575464
	Exp162-3	0,00950284	0,01754258	0,01762298	0,02226734	0,02558531	0,04601094
	Raw data	0,031	0,046	0,054	0,081	0,030	0,046
		Formación	Degradación	Flujo Neto			
Exp162-1	Exp- (WT)	0,022886	0,022886	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,100246	0,038354	0,382599			
	Exp+(Ate1)	0,003903	0,005967	1,529072			
Exp162-2	Exp- (WT)	0,012684	0,012684	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,035724	0,036081	1,009996			
	Exp+(Ate1)	0,036508	0,020426	0,559482			
Exp162-3	Exp- (WT)	0,008040	0,008040	1,0000000			
	Exp+ (KO)	0,012764	0,004644	0,363849			
	Exp+(Ate1)	0,036508	0,020426	0,559482			
		FormRatio	DegRatio	Flujo neto	Flujo Neto Prom		
KO	Exp162-1	4,38	1,68	0,38	1,00	WT	
	Exp162-2	2,82	2,84	1,01	0,59	KO	
	Exp162-3	1,59	0,58	0,36	0,88	Ate1	
Ate1	Exp162-1	0,17	0,26	1,53			
	Exp162-2	2,88	1,61	0,56			
	Exp162-3	4,54	2,54	0,56			

6 h CQ/AYU		WT		KO		Ate1	
		Exp-/CQ-	Exp-/CQ+	Exp+/CQ-	Exp+/CQ+	Exp-/CQ-	Exp-/CQ+
	Exp162-1	0,03133108	0,04343852	0,09322320	0,13525752	0,02926631	0,06539853
	Exp162-2	0,05221648	0,07750412	0,05185936	0,10135721	0,03540055	0,07087047
	Exp162-3	0,00950284	0,02193922	0,01762298	0,06354430	0,02558531	0,07501855
	Raw data	0,031	0,048	0,054	0,100	0,030	0,070
		Formación	Degradación	Flujo Neto			
Exp162-1	Exp- (WT)	0,012	0,012	1,00			
	Exp+ (KO)	0,104	0,042	0,40			
	Exp+(Ate1)	0,034	0,036	1,06			
Exp162-2	Exp- (WT)	0,025	0,025	1,00			
	Exp+ (KO)	0,049	0,049	1,01			
	Exp+(Ate1)	0,019	0,035	1,90			
Exp162-3	Exp- (WT)	0,012	0,012	1,00			
	Exp+ (KO)	0,054	0,046	0,85			
	Exp+(Ate1)	0,066	0,049	0,75			
		FormRatio	DegRatio	Flujo neto	Flujo Neto Prom		
KO	Exp162-1	8,58	3,47	0,40	1,00	WT	
	Exp162-2	1,94	1,96	1,01	0,75	KO	
	Exp162-3	4,35	3,69	0,85	1,24	Ate1	
Ate1	Exp162-1	2,81	2,98	1,06			
	Exp162-2	0,74	1,40	1,90			
	Exp162-3	5,27	3,97	0,75			
24 h CQ/AYU		WT		KO		Ate1	
		Exp-/CQ-	Exp-/CQ+	Exp+/CQ-	Exp+/CQ+	Exp-/CQ-	Exp-/CQ+
	Exp162-1	0,03133108	0,06332388	0,0932232	0,15472547	0,02926631	0,03142842
	Exp162-2	0,05221648	0,0941813	0,05185936	0,162244229	0,03540055	0,09520193
	Exp162-3	0,00950284	0,01291937	0,01762298	0,1053994	0,02558531	0,06826273
	Raw data	0,031	0,057	0,054	0,141	0,030	0,065
		Formación	Degradación	Flujo Neto			
Exp162-1	Exp- (WT)	0,03	0,03	1,00			
	Exp+ (KO)	0,12	0,06	0,50			
	Exp+(Ate1)	0,00	0,00	22,21			
Exp162-2	Exp- (WT)	0,04	0,04	1,00			
	Exp+ (KO)	0,11	0,11	1,00			
	Exp+(Ate1)	0,04	0,06	1,39			
Exp162-3	Exp- (WT)	0,00	0,00	1,00			
	Exp+ (KO)	0,10	0,09	0,92			
	Exp+(Ate1)	0,06	0,04	0,73			
		FormRatio	DegRatio	Flujo neto	Flujo Neto Prom		
KO	Exp162-1	3,86	1,92	0,50	1,00	WT	
	Exp162-2	2,62	2,63	1,00	0,81	KO	
	Exp162-3	28,07	25,69	0,92	1,06	Ate1	
Ate1	Exp162-1	0,00	0,07	22,21			
	Exp162-2	1,02	1,43	1,39			
	Exp162-3	17,20	12,49	0,73			

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares.

Las líneas celulares MEFs *Ate1*^{-/-}, *Ate1*^{+/+}, *Ate1*-1, -2, -3 y -4 fueron proporcionadas por la Dra. Anna Kashina (Departamento de Ciencias Médicas, Universidad de Pennsylvania, Filadelfia, EE.UU.). Tanto las líneas celulares *Ate1*^{+/+} como MEFs *Ate1*- [1-4] expresan niveles de proteínas comparables (**Figura 27**). Cabe destacar que las células provienen de embriones de ratones, dado que la delección a edad postnatal es letal. La línea celular estable HeLa-LC3-GFP fue provista por el Dr. Mario Rossi (Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT), Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina). Las diferentes líneas celulares empleadas fueron cultivadas en medio 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 1 mM de piruvato de sodio, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich), 200 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin (Invitrogen) y 10 % SFB (Gibco).

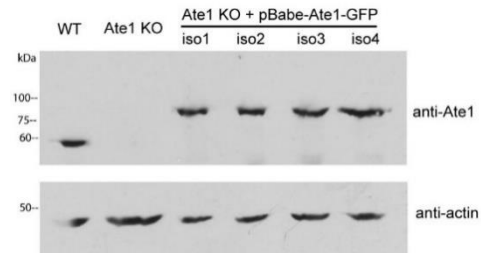


Figura 27. Niveles de expresión de Ate1 en células MEFs *Ate1*^{+/+} y *Ate1*-GFP isoformas 1, 2, 3 y 4.

Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Anticuerpo	Marca	Catálogo
Arginiltransferasa 1	Ate1	EMD Millipore	MABS436, (Clon 6F11)
Proteína fluorescente verde	GFP	Roche	11814460001
p62/Secuestrosoma-1	p62	Cell Signaling	88588
p62/Secuestrosoma-1	p62	MBL	PM045
Proteínas asociadas a microtúbulos 1A/B precursor de la cadena ligera 3B	LC3B	Sigma	L7543
Ubiquitina	Ub	Cytoskeleton	AUB01
Proteínas poliubiquitinadas	Poli-Ub	Enzo	BML-PW8805-0500
Actina arginilada	R-ACT	Merck	ABT264
Calreticulina arginilada	R-CRT	Merck	ABS1671
Calreticulina	CRT	BD Bioscience	612136
Vimentina	Vim	Sigma	V5255

Diana de rapamicina en células de mamífero fosforilada en Serina 2448	p-mTOR	Cell Signaling	5536S
Diana de rapamicina en células de mamífero	mTOR	Cell Signaling	2972S
Subunidad catalítica alfa-1 de proteína quinasa activada por 5'-AMP fosforilada en Treonina 172	p-AMPk	Cell Signaling	2535S
Subunidad catalítica alfa-1 de proteína quinasa activada por 5'-AMP	AMPk	Cell Signaling	2603S
Gamma-tubulina	γ -tub	Sigma	T6557
Beta-actina	β -ACT	Sigma	A1978
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Gapdh	Abcam	Ab8245
Caveolina	Cav1	Santa Cruz	sc-53564
Proteína 2 de membrana asociada al lisosoma	Lamp-2	Santa Cruz	sc-18822
Proteína de choque térmico de 71 kDa	HSC70	Santa Cruz	sc-7298

Inhibidores e inductores farmacológicos.

Los inhibidores e inductores farmacológicos utilizados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Inhibidores e inductores farmacológicos.

Agente farmacológico	Acción	Concentración	Marca
Cloroquina (CQ)	Inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma	20 μ M	Sigma
MG132	Inhibidor reversible de la subunidad 20S del complejo proteasomal	10 μ M	Sigma
Bortezomib (BT)	Inhibidor irreversible de la subunidad 20S del complejo proteasomal	0,5 μ M	Selleckchem
Rapamicina (RAPA)	Inhibidor del complejo mTORC1	80 nM	Selleckchem
Insulina (INS)	Inductor del complejo AMPk	3,5 mg/mL	NovoRapid Penfill, Novo Nordisk Pharma
Cicloheximida (CHX)	Inhibidor de la síntesis proteica	50 μ g/mL	Sigma
L-Arginina.HCl (Arg)	Inductor del complejo mTORC1	2,1 g/L	Sigma

Plásmidos

Los vectores de expresión de cada variantes de Ate1:pEGFPN2-Ate1-[1-4] fueron proporcionados por la Dra. Anna Kashina. Para el silenciamiento de Ate1 mediante shARN se diseñó un oligonucleótido de doble cadena, contra una región compartida entre las cuatro variantes de Ate1. El shARN de secuencia: 5'-ccgggccatgccttacggtgtttatctcgagataaacaccgtaaggcatggctttttg-3' fue sintetizado por la empresa Sigma-Aldrich y clonado en el vector pLKO-1-puro. Los vectores de expresión

mCherry y mCherry-p62 fueron cedido por el grupo del Dr. P. Echenique (CIBICI-CONICET).

Producción y transducción con partículas lentivirales

Para la producción de partículas lentivirales se sembraron 5×10^5 células empaquetadoras HEK293T en placas de 3,5 cm. Al día siguiente, las células se transfectaron con los vectores lentivirales: pPAX2, pVSVG y el plásmido de interés según el ensayo: shAte1/shScramble o GFP-Ate1-(1, 2, 3 y 4) y como reactivo de transfección se utilizó Lipofectamina LTX o 2000. Luego de 24/48 h, se recolectó el sobrenadante con las partículas lentivirales. Se sembraron células HOG en cápsulas 6 cm en medio completo al ~70 % de confluencia. Al día siguiente, se infectaron con 400 μ L partículas virales shC/shAte1 y 10 μ g/mL Polibreno en 2 mL medio completo. Luego de 72 h post-infección se procesaron las células para Western blot. Alternativamente, las células infectadas fueron cultivadas por 15-30 días y seleccionadas en presencia de Puomicina: 2 μ g/ μ L (HOG)(Selleckchem).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot

Los lisados celulares se prepararon en *buffer* RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Nonidet P-40, 0,2 % (p/v) deoxicolato de sodio) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem). Para la cuantificación de proteínas totales de los lisados celulares, se utilizó el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) o Bradford (BioRad). Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en presencia o ausencia de 5 % (v/v) de β -mercaptoetanol y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Las bandas de proteínas transferidas se visualizaron por tinción con 0,2 % (p/v) de Ponceau S en 1 % (v/v) de ácido acético o mediante el Kit de detección de proteínas totales REVERT-700 (LI-COR). Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con albúmina sérica bovina (BSA) al 5 % (p/v) en PBS (solución salina de fosfatos) con Tween-20 0,1 % (PBS-T), particularmente para la detección de anticuerpos de marca *Cell Signaling*. Para la detección de anticuerpos de proteínas fosforiladas, las membranas se bloquearon en BSA 5 % (p/v) en TBS (solución salina con Tris) (200 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH 7,5) que contenía Tween-20 0,1 % (TBS-T). Para la detección del resto de la proteínas se bloquearon las membranas con leche descremada al 10 % (p/v) en *buffer* PBS (detección de Ate1) o al 5 % (p/v) para la detección del resto de la proteínas. Luego se incubaron 16 h a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo apropiada, se lavaron tres veces con PBS-T o TBS-T y se incubaron

1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo. Las bandas de proteínas se revelaron con un sistema de detección de fluorescencia de alta resolución en el infrarrojo cercano (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). El peso molecular de las proteínas de interés se estimó a partir de marcadores de peso molecular conocidos corridos en simultáneo en cada gel.

Monitoreo de la actividad autofágica

Tasa de formación y degradación de LC3-II. Recambio neto autofágico.

En presencia de un posible modulador de autofagia, un incremento en el nivel de LC3-II podría deberse tanto a una inducción de autofagia o un incremento de la formación de autofagosomas, o debido a una disminución del flujo y subsecuente acumulación de LC3-II cuando existe una alteración en la fusión autofagosoma-lisosoma o degradación. Dado que el nivel de LC3-II depende tanto de la tasa de formación como de la tasa de degradación de autofagosomas, se utilizó un modelo desarrollado por el grupo de Sierra A. y colaboradores, para estimar la tasa de formación, de degradación de LC3-II y el recambio neto autofágico. En este modelo, el número neto de autofagosomas (es decir, el grupo o *pool* de autofagosomas) en un momento dado se trata como un sistema en el que hay una entrada (formación) y una salida (degradación) [167]. La fase de formación abarca la formación de fagoforo, el secuestro de carga y el cierre del autofagosoma mientras que la fase de degradación resume la fusión lisosomal y la degradación enzimática del contenido del autofagosoma. Este marco conceptual puede modelarse fácilmente mediante una ecuación diferencial en la que el cambio en el tamaño del grupo de autofagosomas a lo largo del tiempo (t) o después de un estímulo, depende del número de autofagosomas en el estado basal o estacionario (es) más el número de autofagosomas formados, menos los autofagosomas degradados en un cierto período de tiempo:

$$d\text{Autofagosomas}(t)dt = \text{Autofagosomas}_{es} + d\text{Formación}(t)dt - d\text{Degradación}(t)dt$$

La diferencia entre la formación y la degradación de los autofagosomas es el recambio autofágico neto, que es una medida de la velocidad relativa de formación de los autofagosomas frente a la degradación. Un determinado estímulo podría actuar tanto sobre la formación como sobre la degradación, manteniendo el *pool* de autofagosomas constante y dando como resultado una tasa de recambio neta constante. Sin embargo, en algunos casos, la regulación de la formación y degradación puede diferenciarse: una menor degradación y/o mayor formación aumentará el tamaño de la reserva de

autofagosomas, disminuyendo el recambio neto autofágico. Por lo tanto, es necesario analizar por separado la formación, la degradación y el recambio neto autofágico. Este análisis se puede realizar utilizando los datos disponibles en los ensayos de Western blot.

En este tipo de análisis, las células de dos condiciones experimentales (Exp- y Exp+) se incuban con inhibidores lisosomales como CQ (CQ- y CQ+) durante un cierto período de tiempo. Se extraen las proteínas y se analiza la expresión de LC3-II mediante Western blot y se normaliza con las proteínas de referencia. En la condición basal (Exp-), la cantidad de LC3-II en ausencia de inhibidores lisosomales (CQ-) representa el grupo de autofagosomas en el estado basal o estacionario (análogo a tomar una foto instantánea del proceso autofágico). La diferencia entre la cantidad de LC3-II en las células incubadas con y sin inhibidores lisosomales: (CQ+) – (CQ-) en la condición basal representa los autofagosomas que han desaparecido (es decir, la fase de degradación), que es lo que convencionalmente se llama flujo autofágico. Para calcular los autofagosomas que se han formado, este modelo parte de la suposición de que en la condición basal la autofagia está en equilibrio y, por lo tanto, el tamaño de la reserva de autofagosomas es constante (es decir, la formación y degradación ocurren a la misma velocidad):

$$\frac{d\text{Autofagosomas}(t)}{dt} = 0$$

$$\frac{d\text{Formación}(t)}{dt} = \frac{d\text{Degradación}(t)}{dt}$$

Así, en la condición basal (Exp-) los autofagosomas que se han formado son idénticos a los autofagosomas que se han degradado y, por tanto, también están representados por la cantidad de LC3-II con y sin inhibidores lisosomales: (CQ+) - (CQ-).

En la condición experimental (Exp+), la cantidad de LC3-II en ausencia de inhibidores lisosomales (CQ- en Exp+) representa el tamaño de la reserva de autofagosomas bajo el estímulo. De nuevo, la degradación se puede calcular como la diferencia en LC3-II con y sin inhibidores lisosomales: (CQ+ en Exp+) - (CQ- en Exp+). La formación se puede calcular como la diferencia entre la cantidad de LC3-II en presencia de inhibidores lisosomales menos el tamaño del grupo inicial de autofagosomas en condiciones de estado estacionario [(CQ+ en Exp+) - (CQ- en Exp-)]. Este procedimiento permite calcular la formación y degradación de autofagosomas en condiciones basales y experimentales. Para luego comparar si el estímulo actúa proporcionalmente en las etapas de formación y degradación, se puede calcular la

relación entre las condiciones experimentales y basales (Exp+/Exp-) tanto para la formación como para la degradación, y la relación entre ambas como la relación de recambio neto. En condiciones basales, el recambio neto sería igual a uno.

$$\text{Tasa de Formación} = \frac{\text{Formación Exp} +}{\text{Formación Exp} -}$$

$$\text{Tasa de Degradación} = \frac{\text{Degradación Exp} +}{\text{Degradación Exp} -}$$

$$\text{Recambio Neto Autofágico} = \frac{\text{Tasa de Degradación}}{\text{Tasa de Formación}}$$

Detección de los niveles de LC3B mediante Western blot.

El análisis de autofagia mediante Western blot se basa en la detección y cuantificación de LC3-II (forma lipidada, 16 kD) y LC3-I (forma no lipidada, 14 kD). Debido a que LC3-I es más lábil que LC3-II, las muestras fueron procesadas en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas, en frío y fueron sembradas en un plazo no mayor a 5 días posterior al lisado para preservar su estabilidad. Las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 14 % permitiendo que las bandas de LC3-I y LC3-II se separen adecuadamente. Para su detección, se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente a la isoforma B de LC3 (Sigma) capaz de detectar la banda de 14 y 16 kD correspondientes a LC3-I y LC3-II, respectivamente. Ate1 fue detectado con el anticuerpo Ate1 de ratón (Merck Millipore). Dado que, en algunas líneas celulares, las proteínas comúnmente usadas como control de carga pueden disminuir frente a la inducción de autofagia, se utilizó un marcador de proteínas totales (700 Total Protein LICOR) como control de carga.

Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal

Las células crecidas en cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 4 % (p/v) de paraformaldehído (Sigma) y 3 % (p/v) de sucrosa en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, las células se permeabilizaron con 0,01 % (p/v) de Tritón X-100 (US Biological) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con una solución de SFB o suero de caballo al 5 % (v/v) en PBS. A continuación, las células se incubaron con el/los anticuerpos primarios en solución SFB o suero de caballo al 3 % (v/v) en PBS. Luego de tres lavados con PBS, las células se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el/los

anticuerpos secundarios diluidos en SFB o suero de caballo al 3 % (v/v) en PBS. Luego de tres lavados con PBS, se tiñó el núcleo de las células con el colorante Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Después de dos lavados con PBS y un lavado final con agua milli-Q, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con FluorSave (Calbiochem/EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Las imágenes confocales se adquirieron con los microscopios confocales Olympus FluoView (Tokyo, Japan) FV1000 y FV1200, utilizando un objetivo 60x de inmersión en aceite. Las imágenes se adquirieron con un tamaño de 1024x1024 pixeles y se procesaron con el programa FV10-ASW del microscopio y/o Fiji ImageJ. Las imágenes finales se compilaron con los programas Adobe Photoshop CC o Corel Draw 2021.

Fraccionamiento subcelular y extracción de proteínas de membrana

Las células crecidas en placas de 10 cm se lavaron dos veces con PBS y se cosecharon con un raspador (en inglés, *scraper*) en *buffer* Tris (5 mM Tris-HCl pH 7,0) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (PIC) (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, Cat.# 539134). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 10.000 *xg* durante 5 min para posteriormente resuspender las células en *buffer* Tris-PIC y dispersarlas con vortex cada 10 min. Luego de 30 min, los extractos se lisaron mecánicamente pasándolos 60 veces por aguja y jeringa de tuberculina, y se continuaron los vortex cada 10 min durante 30 min más. La fracción nuclear y las células enteras se removieron por centrifugación a 500 *xg* durante 5 min a 4°C. Los homogenatos totales así obtenidos se ultracentrifugaron a 400.000 *xg* durante 1 h a 4°C utilizando un rotor TLA 120.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Las fracciones sobrenadante (S) y precipitado (P) se separaron, y P se resuspendió en *buffer* Tris-PIC. Las proteínas de cada fracción se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot, o bien se usaron para experimentos posteriores.

La extracción de proteínas periféricas de membrana se llevó a cabo exponiendo la fracción P a 0,1 M Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a pH 11,5 durante 40 min a 4°C. Como control, las fracciones P se incubaron en presencia de *buffer* Tris-PIC sólo. Finalmente, las proteínas extraídas se separaron de las que siguieron asociadas a P mediante ultracentrifugación a 400.000 *xg* durante 1 h a 4°C. Las fracciones resultantes se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot. Para el ensayo de fraccionamiento subcelular, se utilizó un kit de separación de proteínas de células en cultivo (Thermo Scientific, Cat. 78840).

Partición con Tritón X-114

Las fracciones S y P obtenidas luego del fraccionamiento subcelular fueron incubadas con 100 μ L de TX114 al 5 % (v/v) en *buffer* Tris-PIC durante 1 h a 4°C y luego se indujo la separación de fases a 37°C durante 3 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13.000 xg durante 1 min. La fase superior acuosa (FA) y la inferior rica en detergente (FD) se separaron y se sometieron a una nueva ronda de partición. Las fracciones resultantes se ajustaron al mismo volumen final y contenido de detergente, se precipitaron con cloroformo:metanol (1:4 v/v) y se analizaron por Western blot.

Ensayo de vida media

Células MEFs *Ate1-1*, -2, -3 y -4 fueron incubadas durante 12 h con MG132 10 μ M para acumular dichas proteínas en el citoplasma. Luego de cuatro lavados con PBS, se cultivaron durante 1 h en medio DMEM con SFB al 10 % para permitir la eliminación completa del inhibidor. Después de un lavado adicional, las células fueron cultivadas en presencia de CHX y cosechadas a diferentes tiempos para la preparación de lisados celulares. Las proteínas contenidas en el lisado celular fueron separadas mediante SDS-PAGE y la expresión de las proteínas de fusión conteniendo EGFP se analizó mediante Western blot.

Predicciones con herramientas bioinformáticas

El análisis bioinformático de las secuencias de *Ate1* fue realizado utilizando las secuencias de referencia anotadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Número de identificación de las secuencias de las isoformas de ratón de *Ate1*.

<i>Isoformas</i>	<i>mRNA</i>	<i>Proteína</i>
<i>Ate1-1</i>	NM-013799.3	NP-038827.2
<i>Ate1-2</i>	NM-001136054.2	NP-001129526.1
<i>Ate1-3</i>	NM-001029895.3	NP-001025066.1
<i>Ate1-4</i>	NM-0012713431	NP-001258272.1

La comparación de las secuencias homólogas de *Ate1* se llevó a cabo usando un método de alineamiento por expectativa logarítmica (MUSCLE): <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> y <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa BLAST a través del servidor HHSearch. Para la predicción de segmentos transmembrana se utilizaron diferentes servidores disponibles online: PHOBIUS, <http://phobius.sbc.su.se/>, TMHMM, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, HMMTOP, <http://www.enzim.hu/hmmtop/>,

PSORT, <https://www.genscript.com/tools/psort>), TOPCONS, <http://topcons.cbr.su.se/>, PHILIUS, <http://www.yeastrc.org/philius>, OCTOPUS, <http://octopus.cbr.su.se/index.php> y TMPRED (<http://www.ch.embnet.org>).

Para la predicción de elementos de estructura secundaria en la secuencia de Ate1 se utilizaron los siguientes servidores: PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), PORTER (<http://distill.ucd.ie/porter/>), YASPIN (<http://ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>) y JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>).

Herramientas y análisis estadístico

Los datos mostrados en las gráficas están expresados como la media \pm error estándar de la media. Los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1. El análisis estadístico de datos se llevó a cabo mediante el software R. El tamaño muestral se corresponde con el número de experimentos independientes señalado en la leyenda de cada figura. La normalidad y la homocedasticidad de los datos se comprobaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Las comparaciones entre las medias de dos grupos experimentales se realizaron mediante la prueba *t* de Student. Para determinar la presencia de diferencias significativas entre más de dos grupos experimentales cuyos datos eran normales, se realizaron pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) seguidas de la correspondiente prueba *post-hoc* (Bonferroni o Tukey). En función del número de variables estudiadas, se realizaron pruebas ANOVA de una y dos vías. El nivel de significancia estadística en todos los casos se estableció en valores de *p* menores a 0,05.

REFERENCIAS

1. Boya, P. and P. Codogno, *Cell biology: Recycling in sight*. Nature, 2013. **501**(7465): p. 40-2.
2. Ishizaki, Y., et al., *Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery*. Surgery, 1993. **114**(3): p. 549-54.
3. Mizushima, N., *A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(5): p. 521-527.
4. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
5. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Autophagy in the cellular energetic balance*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 495-504.
6. Boya, P., *Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(5): p. 766-74.
7. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 713-20.
8. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-31.
9. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1)*. Autophagy, 2021. **17**(1): p. 1-382.
10. Cuervo, A.M., *The plasma membrane brings autophagosomes to life*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(8): p. 735-7.
11. Mari, M. and F. Reggiori, *Atg9 reservoirs, a new organelle of the yeast endomembrane system?* Autophagy, 2010. **6**(8): p. 1221-3.
12. Meiling-Wesse, K., et al., *Trs85 (Gsg1), a component of the TRAPP complexes, is required for the organization of the preautophagosomal structure during selective autophagy via the Cvt pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33669-78.
13. Ravikumar, B., K. Moreau, and D.C. Rubinsztein, *Plasma membrane helps autophagosomes grow*. Autophagy, 2010. **6**(8): p. 1184-6.
14. Reggiori, F., et al., *Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts*. Autophagy, 2005. **1**(2): p. 101-9.
15. Takahashi, Y., et al., *Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy*. Autophagy, 2011. **7**(1): p. 61-73.
16. Yoshimori, T. and T. Noda, *Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(4): p. 401-7.
17. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **169**(2): p. 361-371.
18. Sabatini, D.M., *Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(45): p. 11818-11825.
19. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
20. Allen, G.F., et al., *Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1127-35.
21. Deosaran, E., et al., *NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 4): p. 939-52.
22. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
23. Puente, C., R.C. Hendrickson, and X. Jiang, *Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy*. J Biol Chem, 2016. **291**(11): p. 6026-6035.
24. Mao, K. and D.J. Klionsky, *AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1*. Circ Res, 2011. **108**(7): p. 787-8.

25. Shang, L., et al., *Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4788-93.
26. Hara, T., et al., *FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells*. J Cell Biol, 2008. **181**(3): p. 497-510.
27. Xing, J., et al., *Inhibition of AMP-activated protein kinase accentuates lipopolysaccharide-induced lung endothelial barrier dysfunction and lung injury in vivo*. Am J Pathol, 2013. **182**(3): p. 1021-30.
28. Shin, S., et al., *Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(47): p. E1204-13.
29. Samari, H.R., et al., *Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins*. Biochem J, 2005. **386**(Pt 2): p. 237-44.
30. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 279-96.
31. Moscat, J. and M.T. Diaz-Meco, *p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1001-4.
32. Moscat, J., P. Rennert, and M.T. Diaz-Meco, *PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 702-11.
33. Avila, A., et al., *The Drosophila atypical protein kinase C-ref(2)p complex constitutes a conserved module for signaling in the toll pathway*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8787-95.
34. Cariou, B., et al., *The adapter protein ZIP binds Grb14 and regulates its inhibitory action on insulin signaling by recruiting protein kinase Czeta*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 6959-70.
35. Gong, J., et al., *Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1565-9.
36. Sanz, L., et al., *The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 3044-53.
37. Seibenhener, M.L., et al., *Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 8055-68.
38. Geetha, T. and M.W. Wooten, *Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 19-24.
39. Cha-Molstad, H., Y.T. Kwon, and B.Y. Kim, *Amino-terminal arginylation as a degradation signal for selective autophagy*. BMB Rep, 2015. **48**(9): p. 487-8.
40. Kageyama, S., et al., *p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 16.
41. Noda, N.N., Z. Wang, and H. Zhang, *Liquid-liquid phase separation in autophagy*. J Cell Biol, 2020. **219**(8).
42. Gubas, A. and I. Dikic, *A guide to the regulation of selective autophagy receptors*. FEBS J, 2022. **289**(1): p. 75-89.
43. Bitto, A., et al., *P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease*. Age (Dordr), 2014. **36**(3): p. 9626.
44. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
45. Ichimura, Y., et al., *Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22847-57.
46. Itakura, E. and N. Mizushima, *p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding*. J Cell Biol, 2011. **192**(1): p. 17-27.

47. Wurzer, B., et al., *Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy*. *Elife*, 2015. **4**: p. e08941.
48. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 503-33.
49. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 425-79.
50. Pickart, C.M., *Ubiquitin enters the new millennium*. *Mol Cell*, 2001. **8**(3): p. 499-504.
51. Kawakami, N., et al., *Depressive symptoms and occurrence of type 2 diabetes among Japanese men*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(7): p. 1071-6.
52. Verma, R., et al., *Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome*. *Science*, 2002. **298**(5593): p. 611-5.
53. Yao, T. and R.E. Cohen, *A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome*. *Nature*, 2002. **419**(6905): p. 403-7.
54. Cavo, M., *Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma*. *Leukemia*, 2006. **20**(8): p. 1341-52.
55. Han, Y.H., et al., *The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(1): p. 215-21.
56. Gatica, D., V. Lahiri, and D.J. Klionsky, *Cargo recognition and degradation by selective autophagy*. *Nat Cell Biol*, 2018. **20**(3): p. 233-242.
57. Isogai, S., et al., *Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(36): p. 31864-74.
58. Ji, C.H. and Y.T. Kwon, *Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy*. *Mol Cells*, 2017. **40**(7): p. 441-449.
59. Garcia-Mata, R., et al., *Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(6): p. 1239-54.
60. Johnston, J.A., C.L. Ward, and R.R. Kopito, *Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins*. *J Cell Biol*, 1998. **143**(7): p. 1883-98.
61. Kopito, R.R., *Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(12): p. 524-30.
62. Demishtein, A., et al., *SQSTM1/p62-mediated autophagy compensates for loss of proteasome polyubiquitin recruiting capacity*. *Autophagy*, 2017. **13**(10): p. 1697-1708.
63. Kaji, A., H. Kaji, and G.D. Novelli, *A soluble amino acid incorporating system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1963. **10**: p. 406-9.
64. Kaji, H., G.D. Novelli, and A. Kaji, *A Soluble Amino Acid-Incorporating System from Rat Liver*. *Biochim Biophys Acta*, 1963. **76**: p. 474-7.
65. Kaji, A., H. Kaji, and G.D. Novelli, *Soluble Amino Acid-Incorporating System. I. Preparation of the System and Nature of the Reaction*. *J Biol Chem*, 1965. **240**: p. 1185-91.
66. Kaji, A., H. Kaji, and G.D. Novelli, *Soluble Amino Acid-Incorporating System. II. Soluble Nature of the System and the Characterization of the Radioactive Product*. *J Biol Chem*, 1965. **240**: p. 1192-7.
67. Momose, K. and A. Kaji, *Soluble amino acid-incorporating system. 3. Further studies on the product and its relation to the ribosomal system for incorporation*. *J Biol Chem*, 1966. **241**(14): p. 3294-307.
68. Kaji, H., *Further studies on the soluble amino acid incorporating system from rat liver*. *Biochemistry*, 1968. **7**(11): p. 3844-50.
69. Lock, R.A., H.W. Harding, and G.E. Rogers, *Arginine transferase activity in homogenates from guinea-pig hair follicles*. *J Invest Dermatol*, 1976. **67**(5): p. 582-6.
70. Manahan, C.O. and A.A. App, *An arginyl-transfer ribonucleic Acid protein transferase from cereal embryos*. *Plant Physiol*, 1973. **52**(1): p. 13-6.

71. Soffer, R.L. and N. Mendelsohn, *Incorporation of arginine by a soluble system from sheep thyroid*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **23**(3): p. 252-8.
72. Kemper, B. and J.F. Habener, *Non-rebosomal incorporation of arginine into a specific protein by a cell-free extract of parathyroid tissue*. Biochim Biophys Acta, 1974. **349**(2): p. 235-9.
73. Soffer, R.L., *The arginine transfer reaction*. Biochim Biophys Acta, 1968. **155**(1): p. 228-40.
74. Redeker, V., et al., *Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules*. Science, 1994. **266**(5191): p. 1688-91.
75. Kann, M.L., et al., *Glutamylated tubulin: diversity of expression and distribution of isoforms*. Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **55**(1): p. 14-25.
76. Aillaud, C., et al., *Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation*. Science, 2017. **358**(6369): p. 1448-1453.
77. Arce, C.A., et al., *Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin*. Eur J Biochem, 1975. **59**(1): p. 145-9.
78. Bulinski, J.C., *Tubulin posttranslational modifications: a Pushmi-Pullyu at work?* Dev Cell, 2009. **16**(6): p. 773-4.
79. Hallak, M.E., et al., *Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin*. FEBS Lett, 1977. **73**(2): p. 147-50.
80. Hammond, J.W., D. Cai, and K.J. Verhey, *Tubulin modifications and their cellular functions*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(1): p. 71-6.
81. Kaji, H. and P. Rao, *Membrane modification by arginyl tRNA*. FEBS Lett, 1976. **66**(2): p. 194-7.
82. Eriste, E., et al., *A novel form of neurotensin post-translationally modified by arginylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35089-97.
83. Wang, J., et al., *Arginyltransferase ATE1 catalyzes midchain arginylation of proteins at side chain carboxylates in vivo*. Chem Biol, 2014. **21**(3): p. 331-7.
84. Wang, J., et al., *Target site specificity and in vivo complexity of the mammalian arginylome*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16177.
85. Avcilar-Kucukgoze, I., et al., *tRNA(Arg)-Derived Fragments Can Serve as Arginine Donors for Protein Arginylation*. Cell Chem Biol, 2020. **27**(7): p. 839-849 e4.
86. Balzi, E., et al., *Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7464-71.
87. Deutch, C.E. and R.L. Soffer, *Regulation of proline catabolism by leucyl,phenylalanyl-tRNA-protein transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): p. 405-8.
88. Horinishi, H., S. Hashizume, and M. Seguchi, *Occurrence of arginyl-tRNA: protein arginyl transferase in baker's yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 1975. **65**(1): p. 82-8.
89. Kwon, Y.T., A.S. Kashina, and A. Varshavsky, *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, 1999. **19**(1): p. 182-93.
90. Rai, R. and A. Kashina, *Identification of mammalian arginyltransferases that modify a specific subset of protein substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10123-8.
91. Soffer, R.L. and C.E. Deutch, *Arginyl-tRNA-protein transferase in eucaryotic protists*. Biochem Biophys Res Commun, 1975. **64**(3): p. 926-31.
92. Graciet, E., et al., *Aminoacyl-transferases and the N-end rule pathway of prokaryotic/eukaryotic specificity in a human pathogen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3078-83.

93. Leibowitz, M.J. and R.L. Soffer, *Enzymatic modification of proteins. 3. Purification and properties of a leucyl, phenylalanyl transfer ribonucleic acid protein transferase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1970. **245**(8): p. 2066-73.
94. Benson, T.E., et al., *X-ray crystal structure of Staphylococcus aureus FemA*. Structure, 2002. **10**(8): p. 1107-15.
95. Biarrotte-Sorin, S., et al., *Crystal structures of Weissella viridescens FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition*. Structure, 2004. **12**(2): p. 257-67.
96. Mallorqui-Fernandez, G., et al., *Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **235**(1): p. 1-8.
97. Dong, X., et al., *The crystal structure of leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase from Escherichia coli*. Protein Sci, 2007. **16**(3): p. 528-34.
98. Neuwald, A.F. and D. Landsman, *GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 154-5.
99. Fields, R.N. and H. Roy, *Deciphering the tRNA-dependent lipid aminoacylation systems in bacteria: Novel components and structural advances*. RNA Biol, 2018. **15**(4-5): p. 480-491.
100. Rai, R., et al., *Molecular dissection of arginyltransferases guided by similarity to bacterial peptidoglycan synthases*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 800-5.
101. Batsios, P., et al., *Ate1-mediated posttranslational arginylation affects substrate adhesion and cell migration in Dictyostelium discoideum*. Mol Biol Cell, 2019. **30**(4): p. 453-466.
102. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
103. Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky, *In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue*. Science, 1986. **234**(4773): p. 179-86.
104. Ciechanover, A., et al., *Degradation of proteins by the ubiquitin-mediated proteolytic pathway*. New Biol, 1990. **2**(3): p. 227-34.
105. Wang, K.H., et al., *Tuning the strength of a bacterial N-end rule degradation signal*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24600-7.
106. Varshavsky, A., *N-degron and C-degron pathways of protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(2): p. 358-366.
107. Chen, S.J., A. Melnykov, and A. Varshavsky, *Evolution of Substrates and Components of the Pro/N-Degron Pathway*. Biochemistry, 2020. **59**(4): p. 582-593.
108. Kopitz, J., B. Rist, and P. Bohley, *Post-translational arginylation of ornithine decarboxylase from rat hepatocytes*. Biochem J, 1990. **267**(2): p. 343-8.
109. Davydov, I.V. and A. Varshavsky, *RGS4 is arginylated and degraded by the N-end rule pathway in vitro*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22931-41.
110. Lee, M.J., et al., *RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15030-5.
111. Shim, S.M., et al., *The endoplasmic reticulum-residing chaperone BiP is short-lived and metabolized through N-terminal arginylation*. Sci Signal, 2018. **11**(511).
112. Fina, M.E., et al., *Arginyltransferase (Ate1) regulates the RGS7 protein level and the sensitivity of light-evoked ON-bipolar responses*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 9376.
113. Wong, C.C., et al., *Global analysis of posttranslational protein arginylation*. PLoS Biol, 2007. **5**(10): p. e258.
114. Zhang, F., S. Saha, and A. Kashina, *Arginylation-dependent regulation of a proteolytic product of talin is essential for cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 2012. **197**(6): p. 819-36.

115. Pavlyk, I., et al., *Rapid and dynamic arginylation of the leading edge beta-actin is required for cell migration*. Traffic, 2018. **19**(4): p. 263-272.
116. Karakozova, M., et al., *Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility*. Science, 2006. **313**(5784): p. 192-6.
117. Saha, S., et al., *Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(8): p. 1350-61.
118. Palandri, A., et al., *Ablation of arginyl-tRNA-protein transferase in oligodendrocytes impairs central nervous system myelination*. Glia, 2022. **70**(2): p. 303-320.
119. Wang, J., et al., *Arginyltransferase ATE1 is targeted to the neuronal growth cones and regulates neurite outgrowth during brain development*. Dev Biol, 2017. **430**(1): p. 41-51.
120. Decca, M.B., et al., *Protein arginylation in rat brain cytosol: a proteomic analysis*. Neurochem Res, 2006. **31**(3): p. 401-9.
121. Carpio, M.A., et al., *Calreticulin-dimerization induced by post-translational arginylation is critical for stress granules scaffolding*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(7): p. 1223-35.
122. Comba, A., et al., *Arginylated Calreticulin Increases Apoptotic Response Induced by Bortezomib in Glioma Cells*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 1653-1664.
123. Goitea, V.E. and M.E. Hallak, *Calreticulin and Arginylated Calreticulin Have Different Susceptibilities to Proteasomal Degradation*. J Biol Chem, 2015. **290**(26): p. 16403-14.
124. Kwon, Y.T., et al., *An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development*. Science, 2002. **297**(5578): p. 96-9.
125. Rai, R., et al., *Arginyltransferase regulates alpha cardiac actin function, myofibril formation and contractility during heart development*. Development, 2008. **135**(23): p. 3881-9.
126. Kim, E., et al., *Ablation of Arg-tRNA-protein transferases results in defective neural tube development*. BMB Rep, 2016. **49**(8): p. 443-8.
127. Brower, C.S. and A. Varshavsky, *Ablation of arginylation in the mouse N-end rule pathway: loss of fat, higher metabolic rate, damaged spermatogenesis, and neurological perturbations*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7757.
128. Kurosaka, S., et al., *Arginylation regulates myofibrils to maintain heart function and prevent dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(3): p. 333-41.
129. Cornachione, A.S., et al., *Arginylation of myosin heavy chain regulates skeletal muscle strength*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 470-6.
130. Lian, L., et al., *Loss of ATE1-mediated arginylation leads to impaired platelet myosin phosphorylation, clot retraction, and in vivo thrombosis formation*. Haematologica, 2014. **99**(3): p. 554-60.
131. Singh, A., et al., *Arginylation regulates adipogenesis by regulating expression of PPARgamma at transcript and protein level*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019. **1864**(4): p. 596-607.
132. Leu, N.A., S. Kurosaka, and A. Kashina, *Conditional Tek promoter-driven deletion of arginyltransferase in the germ line causes defects in gametogenesis and early embryonic lethality in mice*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7734.
133. Kurosaka, S., et al., *Arginylation-dependent neural crest cell migration is essential for mouse development*. PLoS Genet, 2010. **6**(3): p. e1000878.
134. Bongiovanni, G., et al., *The post-translational incorporation of arginine into a beta-amyloid peptide increases the probability of alpha-helix formation*. Neuroreport, 1995. **7**(1): p. 326-8.

135. Brower, C.S., K.I. Piatkov, and A. Varshavsky, *Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway*. Mol Cell, 2013. **50**(2): p. 161-71.
136. Shyne-Athwal, S., et al., *Protein modification by amino acid addition is increased in crushed sciatic but not optic nerves*. Science, 1986. **231**(4738): p. 603-5.
137. Chakraborty, G. and N.A. Ingoglia, *N-terminal arginylation and ubiquitin-mediated proteolysis in nerve regeneration*. Brain Res Bull, 1993. **30**(3-4): p. 439-45.
138. Wang, Y.M. and N.A. Ingoglia, *N-terminal arginylation of sciatic nerve and brain proteins following injury*. Neurochem Res, 1997. **22**(12): p. 1453-9.
139. Gomez-Sanchez, J.A., et al., *Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves*. J Cell Biol, 2015. **210**(1): p. 153-68.
140. Jang, S.Y., et al., *Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination*. Glia, 2016. **64**(5): p. 730-42.
141. Masdehors, P., et al., *Ubiquitin-dependent protein processing controls radiation-induced apoptosis through the N-end rule pathway*. Exp Cell Res, 2000. **257**(1): p. 48-57.
142. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
143. Panaretakis, T., et al., *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 578-90.
144. Rai, R., et al., *Arginyltransferase suppresses cell tumorigenic potential and inversely correlates with metastases in human cancers*. Oncogene, 2016. **35**(31): p. 4058-68.
145. Birnbaum, M.D., et al., *Reduced Arginyltransferase 1 is a driver and a potential prognostic indicator of prostate cancer metastasis*. Oncogene, 2019. **38**(6): p. 838-851.
146. Kwon, Y.T., et al., *Construction and analysis of mouse strains lacking the ubiquitin ligase UBR1 (E3alpha) of the N-end rule pathway*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8007-21.
147. Tasaki, T., et al., *A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 7120-36.
148. Sriram, S.M., et al., *Multivalency-assisted control of intracellular signaling pathways: application for ubiquitin-dependent N-end rule pathway*. Chem Biol, 2009. **16**(2): p. 121-31.
149. Ji, C.H., et al., *Regulation of reticulophagy by the N-degron pathway*. Autophagy, 2020. **16**(2): p. 373-375.
150. Latonen, L., et al., *Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability*. Oncogene, 2011. **30**(7): p. 790-805.
151. Fortun, J., et al., *Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells*. J Neurosci, 2003. **23**(33): p. 10672-80.
152. Janen, S.B., H. Chaachouay, and C. Richter-Landsberg, *Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes*. Glia, 2010. **58**(14): p. 1766-74.
153. Cha-Molstad, H., et al., *p62/SQSTM1/Sequestosome-1 is an N-recognin of the N-end rule pathway which modulates autophagosome biogenesis*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 102.
154. Chen, W., J.M. Smeekens, and R. Wu, *Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells*. Chem Sci, 2016. **7**(2): p. 1393-1400.
155. Wigley, W.C., et al., *Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 481-90.

156. Wilde, I.B., et al., *Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system*. J Proteome Res, 2011. **10**(3): p. 1062-72.
157. Kageyama, S., et al., *Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway*. J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 24944-55.
158. Matsumoto, G., et al., *Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 279-89.
159. Rogov, V., et al., *Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy*. Mol Cell, 2014. **53**(2): p. 167-78.
160. Lim, J., et al., *Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates*. PLoS Genet, 2015. **11**(2): p. e1004987.
161. Yoo, Y.D., et al., *N-terminal arginylation generates a bimodal degron that modulates autophagic proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(12): p. E2716-E2724.
162. Albert, S., et al., *Direct visualization of degradation microcompartments at the ER membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(2): p. 1069-1080.
163. An, S., et al., *Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 12872-6.
164. Castellana, M., et al., *Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(10): p. 1011-8.
165. Wheeldon, I., et al., *Substrate channelling as an approach to cascade reactions*. Nat Chem, 2016. **8**(4): p. 299-309.
166. Sathyanarayanan, N., et al., *Molecular basis for metabolite channeling in a ring opening enzyme of the phenylacetate degradation pathway*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4127.
167. Plaza-Zabala, A., V. Sierra-Torre, and A. Sierra, *Assessing Autophagy in Microglia: A Two-Step Model to Determine Autophagosome Formation, Degradation, and Net Turnover*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 620602.
168. Jeon, S.M., *Regulation and function of AMPK in physiology and diseases*. Exp Mol Med, 2016. **48**(7): p. e245.
169. Wang, Y., et al., *Label-free Single-Molecule Quantification of Rapamycin-induced FKBP-FRB Dimerization for Direct Control of Cellular Mechanotransduction*. Nano Lett, 2019. **19**(10): p. 7514-7525.
170. Lopez Sambrooks, C., M.A. Carpio, and M.E. Hallak, *Arginylated calreticulin at plasma membrane increases susceptibility of cells to apoptosis*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 22043-54.
171. Cha-Molstad, H., et al., *Regulation of autophagic proteolysis by the N-recognin SQSTM1/p62 of the N-end rule pathway*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 359-361.
172. Zhang, Y., et al., *ZZ-dependent regulation of p62/SQSTM1 in autophagy*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4373.
173. Ji, C.H., et al., *The N-Degrone Pathway Mediates ER-phagy*. Mol Cell, 2019. **75**(5): p. 1058-1072 e9.
174. Watanabe-Asano, T., A. Kuma, and N. Mizushima, *Cycloheximide inhibits starvation-induced autophagy through mTORC1 activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **445**(2): p. 334-9.
175. Kuusisto, E., A. Salminen, and I. Alafuzoff, *Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies*. Neuroreport, 2001. **12**(10): p. 2085-90.

176. Kuusisto, E., A. Salminen, and I. Alafuzoff, *Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2002. **28**(3): p. 228-37.
177. Zatloukal, K., et al., *p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(1): p. 255-63.
178. Braak, H., D.R. Thal, and K. Del Tredici, *Nerve cells immunoreactive for p62 in select hypothalamic and brainstem nuclei of controls and Parkinson's disease cases*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2011. **118**(5): p. 809-19.
179. Geetha, T., et al., *Sequestosome 1/p62: across diseases*. *Biomarkers*, 2012. **17**(2): p. 99-103.
180. Salminen, A., et al., *Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Prog Neurobiol*, 2012. **96**(1): p. 87-95.
181. Kuusisto, E., T. Suuronen, and A. Salminen, *Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(1): p. 223-8.
182. Viiri, J., et al., *Autophagy activation clears ELAVL1/HuR-mediated accumulation of SQSTM1/p62 during proteasomal inhibition in human retinal pigment epithelial cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69563.
183. Sha, Z., et al., *Rapid induction of p62 and GABARAPL1 upon proteasome inhibition promotes survival before autophagy activation*. *J Cell Biol*, 2018. **217**(5): p. 1757-1776.
184. Dossou, A.S. and A. Basu, *The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(10).
185. Kovacs, A.L. and P.O. Seglen, *Inhibition of hepatocytic protein degradation by methylaminopurines and inhibitors of protein synthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **676**(2): p. 213-20.
186. Samari, H.R. and P.O. Seglen, *Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(37): p. 23758-63.
187. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. *Cell Metab*, 2007. **6**(6): p. 458-71.
188. Rodgers, J.T., et al., *Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(1): p. 46-53.
189. Chiacchiera, F., et al., *p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(9): p. 1203-14.
190. Liu, H.Y., et al., *Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(45): p. 31484-92.
191. Behrends, C., et al., *Network organization of the human autophagy system*. *Nature*, 2010. **466**(7302): p. 68-76.
192. Mihaylova, M.M., et al., *Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis*. *Cell*, 2011. **145**(4): p. 607-21.
193. Pfisterer, S.G., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase (CaMK) signaling via CaMKI and AMP-activated protein kinase contributes to the regulation of WIPI-1 at the onset of autophagy*. *Mol Pharmacol*, 2011. **80**(6): p. 1066-75.
194. Sanchez, A.M., et al., *AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(2): p. 695-710.
195. Manifava, M., et al., *Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids*. *Elife*, 2016. **5**.

196. Han, J.M., et al., *Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway*. Cell, 2012. **149**(2): p. 410-24.
197. Wang, T., et al., *Identification and characterization of essential genes in the human genome*. Science, 2015. **350**(6264): p. 1096-101.
198. Chantranupong, L., et al., *The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway*. Cell, 2016. **165**(1): p. 153-164.
199. Wolfson, R.L., et al., *Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway*. Science, 2016. **351**(6268): p. 43-8.
200. Gu, X., et al., *SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway*. Science, 2017. **358**(6364): p. 813-818.
201. Wyant, G.A., et al., *mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient*. Cell, 2017. **171**(3): p. 642-654 e12.
202. Son, S.M., et al., *Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A*. Cell Metab, 2019. **29**(1): p. 192-201 e7.
203. Nave, B.T., et al., *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. Biochem J, 1999. **344 Pt 2**: p. 427-31.
204. Flores, A.I., et al., *Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS*. J Neurosci, 2008. **28**(28): p. 7174-83.
205. Narayanan, S.P., et al., *Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination*. J Neurosci, 2009. **29**(21): p. 6860-70.
206. Tyler, W.A., et al., *Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation*. J Neurosci, 2009. **29**(19): p. 6367-78.
207. Kim, L.C., R.S. Cook, and J. Chen, *mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment*. Oncogene, 2017. **36**(16): p. 2191-2201.
208. Heckmann, B.L., et al., *LC3-Associated Endocytosis Facilitates beta-Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease*. Cell, 2020. **183**(6): p. 1733-1734.
209. Petris, G., et al., *Efficient detection of proteins retro-translocated from the ER to the cytosol by in vivo biotinylation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23712.
210. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
211. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
212. Ahmed, Z., et al., *The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2012. **38**(1): p. 4-24.
213. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.

PUBLICACIONES

Artículos científicos publicados durante el desarrollo de la tesis doctoral:

- **Ablation of Arginyl-tRNA-protein transferase in oligodendrocytes impairs central nervous system myelination.** Palandri A, **Bonnet LV**, Farias MG, Hallak ME, Galiano MR. *Glia*. 2021. [doi](#).
- **Arginylated calreticulin increases apoptotic response induced by Bortezomib in glioma cells.** Comba A*, **Bonnet LV***, Goitea VE, Hallak ME, Galiano MR. * **Equal contribution.** *Mol Neurobiol*. 2019. [doi](#).
- **Dynamic association of rpt5 to cold-stable microtubules in glial cells exposed to low temperatures.** Flores-Martín J, **Bonnet LV**, Palandri A, Hallak MH and Galiano MR. *FEBS Lett*. 2022. [doi](#).
- **A simple strategy to prepare hybrid coating on titanium (Ti6Al4V).** Laura E. Valenti, **Laura V. Bonnet**, Mauricio R. Galiano, Carla E. Giacomelli. *Surface & Coatings Technology*. 2022. [doi](#).
- **Synthetic and biological identities of layered double hydroxides nanocarriers functionalized with risedronate.** Vasti C*, Dariana Aristizabal Bedoya*, **Laura V. Bonnet**, Ernesto Ambroggio, Carla E. Giacomelli, Ricardo Rojas. *Applied Clay Science*. 2020. [doi](#). *Equal contribution
- **Relevance of protein-protein interactions on the biological identity of nanoparticles.** Vasti C, **Bonnet LV**, Galiano MR, Rojas R, Giacomelli CE. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018. [doi](#).

Artículos científicos en preparación:

- **Ate1 modulates mTOR-dependent autophagic flux.** **Bonnet LV**, Palandri A, Flores-Martin JB, Hallak ME.
- **Correlation between colloidal stability of magnetic nanoparticles and autophagic response.** Solange Selzer, **Laura V Bonnet**, Raquel Vico, Nancy Ferreyra.

Imagen de la portada: El modelo de célula humana más detallado hasta el momento. Se obtuvo usando rayos X, resonancia magnética nuclear y conjuntos de datos de microscopía crioelectrónica.

Créditos: Evan Ingersoll & Gael McGill