

expresa en el esporozoíto y en estados de esquizonte tardío durante el ciclo de vida de *Plasmodium*, lo cual sugiere que esta proteína puede ser específica de procesos en Apicomplexa.

2.2.14. Enzimas DUBs en Parásitos Protozoarios

Los parásitos protozoarios tienen homólogos para cuatro de las cinco clases de enzimas DUBs y además poseen ejemplos de homólogos de una peptidasa con plegamiento papaína permutado, propias de virus ARN de doble cadena (*permuted papain fold peptidases of double-stranded-PPPDEs*) (Ponder y Bogoy 2007). La primera enzima DUB activa en parásitos protozoarios fue identificada en *P. falciparum* (PfUCH54) y *T. gondii* (homóloga a UCHL3 de mamíferos) por Artavanis-Tsakonas y colaboradores (2006) y Frickel y colaboradores (2007) respectivamente, empleando una metodología de sondas basadas en actividad, las cuales contienen la ubiquitina humana completa y su residuo glicina carboxilo terminal es reemplazado por un grupo funcional reactivo que se une de manera irreversible a la cisteína del sitio activo de la enzima DUB. Por otro lado, análisis genéticos de variantes de *Plasmodium chabaudi* resistente a la cloroquina y artesunato identificaron dos mutaciones independientes en el gen que codifica una enzima DUB (UBP1) con una alta relación a la resistencia al medicamento (Hunt et al, 2007).

Homólogos de DUBs de la clase MJD (Ataxina-3) han sido identificados en *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Cryptosporidium spp.* Dichos homólogos en parásitos son 19.9 a 29.4% conservados comparándolos con la Ataxina-3 humana (Vernet y Pittman 2005). Algunos investigadores consideran que estos parásitos protozoarios son modelos potenciales para estudiar la función normal de Ataxina-3 (Ponder y Bogoy 2007). Finalmente, Iyer y colaboradores (2004) identificaron enzimas DUBs de la clase PPPDE, cuyo prototipo es una proteína hipotética de *Cryptosporidium parvum*.

2.2.15. Dominios de Unión a Ubiquitina (*Ubiquitin-binding domains-UBDs*)

Los UBDs son un grupo de dominios proteicos modulares que se unen de forma no covalente a la ubiquitina. Estos motivos interpretan y transmiten información conferida por la ubiquitinación de proteínas para controlar y regular varios procesos celulares (Hicke et al, 2005).

Las proteínas de unión a ubiquitina generalmente tienen pequeños UBDs, de 20 a 150 residuos de aminoácidos, los cuales están plegados de forma independiente y que pueden interactuar directamente con cadenas de poliubiquitina o proteínas monoubiquitinadas. Los UBDs pueden encontrarse en enzimas que catalizan la ubiquitinación o en receptores de ubiquitina que reconocen e interpretan las señales de conjugación de ubiquitina en una proteína sustrato. Los UBDs son estructuralmente diversos y así mismo se encuentran en proteínas que contienen diferentes características estructurales y diversas funciones biológicas. La presencia de UBDs en una proteína indican que esta puede interactuar con ubiquitina o proteínas ubiquitinadas y puede ser regulada por ubiquitinación (Hicke et al, 2005).

Para varios UBDs se ha calculado la constante de disociación (K_d), encontrando que la unión es de moderada a débil. Las interacciones débiles UBD-ubiquitina pueden deberse a que su función es reversible y transitoria. De esta manera la modificación de una proteína con ubiquitina funciona como un interruptor que es reconocido por UBDs y que controla y regula el ensamblaje de una red de interacciones. Además, muchas proteínas poseen múltiples copias de un UBD y varios tipos de UBDs pueden encontrarse en una misma proteína lo cual diversifica las posibilidades de interacción y por tanto las posibilidades funcionales (Hicke et al, 2005). Las interacciones débiles entre dominios individuales y monoubiquitina son potenciados a interacciones de alta afinidad de relevancia fisiológica mediante varios mecanismos: polimerización de ubiquitina, multiplicidad de modificaciones, oligomerización de proteínas ubiquitinadas y de proteínas de unión a ubiquitina, dominios de unión a ubiquitina en tándem, dominios de unión con múltiples sitios de unión a ubiquitina y cooperación entre dominios de unión a ubiquitina y otros dominios de unión a fosfolípidos y proteínas G pequeñas (Hurley et al, 2006).

2.2.16. Métodos para la Purificación de Proteínas Ubiquitinadas

Para entender en detalle la participación del sistema ubiquitina proteosoma en cualquier modelo se requieren técnicas que permitan la purificación de los diferentes conjugados ubiquitina-proteína, para su posterior identificación y caracterización. Inicialmente la caracterización de proteínas ubiquitinadas se vio obstaculizada debido a que la mayoría de los blancos de ubiquitinación tienen una alta velocidad de recambio y la modificación es muy lábil, dada la

presencia de las enzimas DUBs. Esto hace difícil preservar un alto nivel de conjugados ubiquitina-proteína, suficientes para su purificación y análisis (Tomlinson et al, 2007).

Las técnicas comúnmente empleadas son:

2.2.16.1. Columnas de afinidad con ubiquitina marcada: los epitopes de marcaje pueden actuar como sitios de unión inmunológica a anticuerpos o sitios de unión por afinidad a resinas específicas. Ubiquitina marcada con hemaglutinina (HA) y myc forman conjugados *in vivo* e *in vitro* y los epitopes son reconocidos por anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente (Ellison y Hochstrassern 1991). Además, se han empleado, biotina y polihistidina conjugadas a ubiquitina para elaborar columnas de afinidad, la biotinilación puede alterar la producción de cadenas de poliubiquitina y por esto no es recomendable para ensayos de ubiquitinación *in vivo*. Actualmente, los métodos más exitosos para purificar sustratos ubiquitinados emplean conjugados de histidina bajo condiciones denaturantes ya que reducen la unión no específica de proteínas y presentan una menor interacción proteína-proteína (Xu y Peng 2006). La ubiquitina con conjugado de polihistidina, puede ser expresada y purificada en *Escherichia coli* para reacciones de conjugación *in vitro* y también puede ser expresada en células eucariotas y conjugada a proteínas *in situ*. Este tipo de proteínas con conjugados de polihistidina son purificadas por cromatografía de afinidad (revisado por Tomlinson et al, 2007). Recientemente, Meierhofer y colaboradores (2008) desarrollaron una estrategia que utiliza una línea celular transfectada que expresa de forma estable ubiquitina conjugada en tándem con un motivo doble de 6xHis y un dominio biotina para la purificación del proteoma ubiquitinado bajo condiciones totalmente denaturantes, esta metodología fue combinada con espectrometría de masas cuantitativa usando SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) para una detección sensible de cambios globales en los perfiles de ubiquitinación en respuesta a la inhibición del proteosoma. Otra estrategia fue desarrollada por Jeon y colaboradores (2007) con la obtención de un ratón transgénico que expresa un conjugado de 8xHis-FLAG unido a ubiquitina y que les permitió identificar 120 proteínas modificadas por ubiquitina en el corazón.

2.2.16.2. Uso de anticuerpos antiubiquitina: Vasilescu y colaboradores (2005) describieron un nuevo método para purificar proteínas ubiquitinadas usando anticuerpos antiubiquitina acoplados a perlas de agarosa. Los lisados celulares son tratados con inhibidores del proteosoma toda la noche para enriquecer el *pool* de conjugados ubiquitina-proteína y

entonces son incubados en columnas cromatográficas que contienen las perlas acopladas al anticuerpo antiubiquitina (Fig. 7). Después de varios lavados, el material unido es eluido y separado por SDS-PAGE y las bandas resultantes son cortadas, tripsinizadas y analizadas por LC-MS/MS. Esta técnica ofrece ventajas como el estudio de proteínas ubiquitinadas endógenas. Una modificación a esta metodología es la cromatografía de inmunoafinidad a ubiquitina para purificar conjugados ubiquitina-proteína y proteínas asociadas a ubiquitina bajo condiciones nativas y denaturantes (Matsumoto et al, 2005).

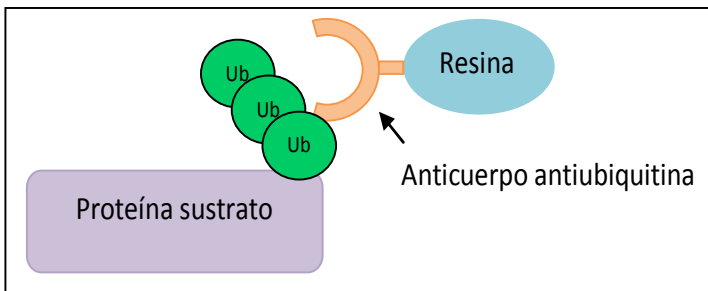


Figura 7. Método para la purificación de proteínas ubiquitinadas empleando anticuerpos. Anticuepo anti-ubiquitina inmovilizado (por ejemplo con resina de proteína G-agarosa) se emplea para ensayos de inmunoafinidad de mezclas de proteínas ubiquitinadas, previamente acumuladas por la acción de inhibidores del proteosoma.

2.2.16.3. Uso de proteínas de unión a ubiquitina: tomando ventaja de la afinidad de unión por cadenas de poliubiquitina de la subunidad S5a de la partícula regulatoria 19S/PA700 algunos investigadores diseñaron una cromatografía de afinidad con S5a. Layfield y colaboradores (2001) indujeron la ubiquitinación *in vitro* y así una mezcla compleja de proteínas poliubiquitinadas fue purificada del extracto de cerebro de cerdo usando una columna de Sefarosa acoplada a GST-S5a (Fig. 8). Posteriormente, este método ha sido empleado con éxito en la purificación e identificación de proteínas ubiquitinadas en células humanas (Weekes et al, 2003; Ehlers, 2003). El principal inconveniente de esta técnica es que además de proteínas conjugadas a ubiquitina se pueden obtener proteínas con dominios de unión a ubiquitina como es el caso de hHR23B (Fujiwara et al, 2004) y la proteína p62 (Seibenhener et al, 2004). También se han empleado combinación de técnicas, un ejemplo es el uso de proteínas de unión a ubiquitina y un conjugado de histidina para el aislamiento de componentes ubiquitinados en levadura (Mayor et al, 2005).

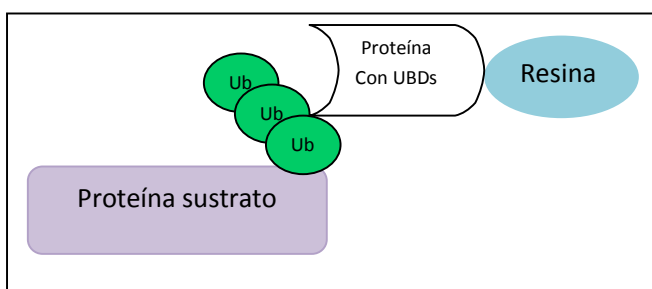


Figura 8. Método para la purificación de proteínas ubiquitinadas empleando proteínas de unión a ubiquitina o UBDs. Proteínas con dominios de unión a ubiquitina como S5a o UBDs aislados de proteínas de unión a ubiquitina se emplean para cromatografías de afinidad por ubiquitina.

2.2.16.4. Uso de Dominios de Unión a Ubiquitina: el aislamiento de UBDs de proteínas de unión a ubiquitina y el estudio detallado de sus propiedades son consideradas la nueva generación de técnicas para caracterizar el “ubiquitinoma”, definido como el complejo de proteínas ubiquitinadas. Los UBDs puros pueden en algunos casos, tener una mayor afinidad de unión a ubiquitina comparado con las proteínas de unión a ubiquitina y además tienen la habilidad de ser usados para la purificación directa de proteínas ubiquitinadas presentes en extractos tisulares (Tomlinson et al, 2007). Los UBDs como se describió previamente (ver dominios de unión a ubiquitina) tiene propiedades de unión variables hacia monoubiquitina y poliubiquitina, las cuales deben ser consideradas al emplear esta metodología. Los UBDs más frecuentemente usados son el dominio UBA p62 y el dominio UIM S5a, sin embargo hay muchas alternativas de dominios UBA, los cuales pueden constituir herramientas excelentes para la purificación de proteínas modificadas por ubiquitina (revisado por Hjerpe y Rodríguez 2008).

2.2.17. Análisis e Identificación de Proteínas Ubiquitinadas

La espectrometría de masas (MS) ha emergido como una herramienta indispensable en la caracterización detallada de la ubiquitinación de proteínas. Las proteínas ubiquitinadas usualmente son enriquecidas por cromatografías de afinidad y posteriormente analizadas por espectrometría de masas para su identificación y cuantificación. Los aminoácidos conjugados a ubiquitina pueden ser determinados por cambios característicos de masa causados por la modificación. Además, la estructura compleja de la cadena de poliubiquitina sobre el sustrato puede ser identificada por aproximaciones de *bottom-up and middle-down*, revelando así funciones potenciales y novedosas de las conjugaciones poliubiquitina (Xu y Peng, 2006; Peng, 2008).

Independientemente del tipo de matriz de afinidad seleccionada para la purificación, hay un problema recurrente y es que algunos contaminantes que no son conjugados a ubiquitina son copurificados en este proceso y entonces identificados por espectrometría de masas. Aunque la concentración de contaminantes puede ser reducida a un nivel bajo, el número de contaminantes puede ser grande especialmente cuando la espectrometría de masas es altamente sensible en

detectar pequeñas cantidades de proteína. Teóricamente hay dos clases de contaminantes cuando se emplean técnicas de afinidad en la purificación de proteínas ubiquitinadas: 1) contaminantes asociados a la matriz, como por ejemplo, proteínas ricas en histidina durante la purificación con resinas de níquel y 2) contaminantes asociados a ubiquitina que interactúan con los conjugados ubiquitina-proteína que se han unido a la matriz. Los contaminantes asociados a la matriz pueden ser identificados usando en los experimentos controles negativos (lisados celulares sin el conjugado de ubiquitina). Para el caso de los contaminantes asociados a ubiquitina son mucho más difíciles de identificar, pero pueden ser reducidos en gran medida con condiciones denaturantes, en las cuales el desplegamiento de las proteínas limita las interacciones proteína-proteína (Peng 2008). En cualquier caso, es esencial validar si las proteínas identificadas por MS son realmente conjugados proteína-ubiquitina antes de iniciar análisis funcionales. Esta validación se puede hacer por mapeo directo de los sitios de ubiquitinación a través de MS/MS o por *western blot* de proteínas individuales (Peng et al, 2003). Sin embargo, el mapeo completo de los sitios modificados requiere la inclusión de casi el 100% de los péptidos secuenciados por MS/MS, lo cual no es posible en proteómica. Con *western blot*, los conjugados ubiquitina-proteína inmunoprecipitados son confirmados por dos principios: 1) la ubiquitinación causa un incremento dramático en el peso molecular aparente, una proteína ubiquitinada mostrará un incremento en aproximadamente 8 kDa si esta monoubiquitinada y mucho más si es poliubiquitinada y 2) la ubiquitinación a menudo genera sustratos modificados heterólogos que son observados como una escalera en el *western blot*. Sin embargo la inmunoprecipitación y el *western-blot* no son prácticos para la validación de estudios a gran escala (Peng 2008).

2.2.18. El Proteosoma

El proteosoma 26S, es una proteasa multicatalítica dependiente de ATP (2000 kDa) que degrada proteínas poliubiquitinadas en pequeños péptidos y se expresa en el núcleo y citoplasma de todas las células eucariotas (Adams 2003). Esta enzima está compuesta de dos subcomplejos: la partícula central 20S (CP) que porta la actividad catalítica y una partícula regulatoria 19S (RP), también conocida como PA700 (Coux et al, 1996; DeMartino y Gillete 2007). La CP 20S tiene una estructura de 700 kDa que comprende 28 subunidades, las cuales poseen una masa molecular similar (20 a 35 kDa), pero un amplio rango de puntos isoeléctricos (4,5 a 8,7) (Paugam et al, 2003). La partícula regulatoria 19S/PA700 se une a uno o a los dos extremos del proteosoma 20S latente para formar un proteosoma enzimáticamente activo. El coeficiente de sedimentación

aparente del proteosoma activo, determinado por centrifugación en gradientes de densidad es 26S y de acuerdo a esto el complejo es usualmente llamado proteosoma 26S. Sin embargo, análisis fisicoquímicos han revelado que el coeficiente de sedimentación correcto es de aproximadamente 30S (Yoshimura et al, 1993). La diferencia de tamaño se debe probablemente a la unión de un PA700 (RP) al proteosoma 20S para formar el llamado 26S, mientras la molécula 30S puede incluir un par de PA700 adheridos de forma simétrica a cada extremo de la CP 20S (Fig. 9).

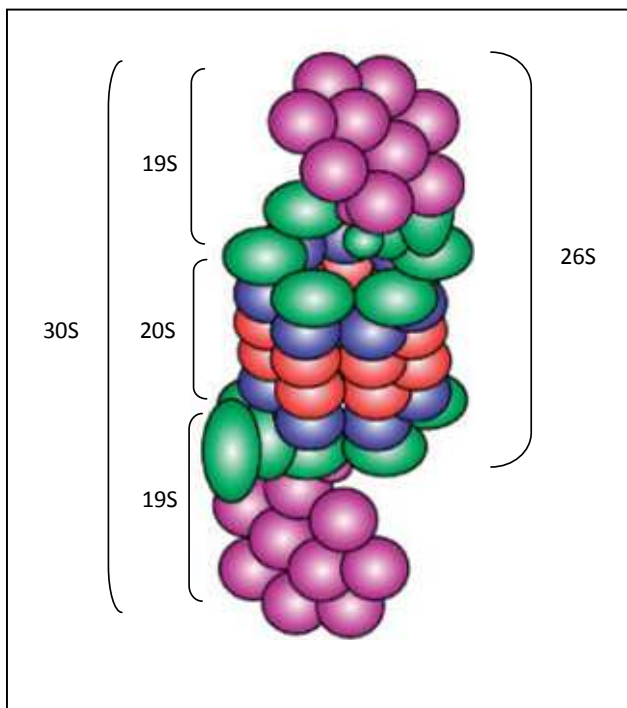


Figura 9. Esquema de proteosoma eucariota con sus subcomplejos. Partícula central (CP) o 20S proteosoma. Partícula regulatoria (RP) o 19S proteosoma. La RP 19S/PA700 se une a uno o a los dos extremos del proteosoma 20S latente para formar un proteosoma enzimáticamente activo. El coeficiente de sedimentación aparente del proteosoma activo es 26S. La molécula 30S incluye un par de RP 19S simétricamente adheridos a cada extremo de la CP 20S. Esquema tomado y modificado de Tanaka, 2009.

2.2.18.1. Partícula Central (CP): es una estructura en forma de barril compuesta de cuatro anillos apilados, dos anillos α exteriores y dos anillos β interiores idénticos. Cada anillo está compuesto de siete subunidades distintas dando como resultado un complejo 20S de estructura general α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7. En los proteosomas de organismos eucariotas al menos 3 pares de las 14 subunidades β tienen sitios funcionales activos. Estas tres subunidades tipo β de cada uno de los anillos internos contienen residuos treonina catalíticamente activos en su amino terminal y poseen una actividad N-terminal nucleófilo hidrolasa (Ntn), localizada en el interior de la CP, lo que clasifica al proteosoma como una proteasa treonina. Todas las unidades catalíticas son sintetizadas como precursores, por lo que en el curso del ensamblaje de la CP sufren un

procesamiento autocatalítico para la liberación de su treonina activa (Thr1). Las subunidades catalíticas son $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ y están asociadas con actividad similar a caspasa (*caspase-like-CL*), actividad similar a tripsina (*trypsin-like-TL*) y actividad similar a quimotripsina (*chymotrypsin-like-CTI*) respectivamente (Dick et al, 1998; Kisselev et al, 2003). Se ha establecido una jerarquía, con una clara dominancia de la función proteolítica de la subunidad $\beta 5$, seguida por la actividad proteolítica de $\beta 2$ finalizando con $\beta 1$. Esta jerarquía es consistente con los hallazgos de experimentos de doble mutación de subunidades catalíticas, en los cuales las células con mutación doble de $\beta 5/\beta 1$ y $\beta 2/\beta 1$ son viables, pero las mutantes $\beta 5/\beta 2$ no (Heinemeyer et al, 1997; Jäger et al, 1999). Además se ha encontrado que la mayoría de los inhibidores naturales del proteosoma se unen preferencialmente a la subunidad $\beta 5$ (Bogyo y Wang 2002). Sin embargo debe considerarse que la mayoría de las investigaciones que sustentan esta jerarquización han sido realizadas en células de mamíferos.

Estudios de caracterización estructural del 20S proteosoma han revelado que el barril conformado por la CP mide 15 nm de longitud y 11 nm de diámetro y su arquitectura $\alpha 1-7$, $\beta 1-7$, $\beta 1-7$, $\alpha 1-7$ conduce a la formación de tres cámaras: la cámara catalítica de aproximadamente 84 nm³ formada por los anillos β y las dos antecámaras formadas por los anillos α de los extremos con aproximadamente 59 nm³ (Löwe et al, 1995; Groll et al, 1997; revisado por Wolf y Hilt 2004) (Fig. 10). A los sitios activos de la cámara catalítica solo se puede llegar a través de dos poros angostos de aproximadamente 2 nm, presentes en el centro de los anillos α (Baumeister et al, 1998). El tamaño de estos poros asegura que solo proteínas desplegadas puedan penetrar. Además, los extremos amino terminal de las subunidades α forman una barrera física adicional para acceder a la cámara catalítica (Bochtler et al, 1999; Bajorek y Glickman 2004). Los mecanismos que controlan la apertura y cierre de los anillos α no son aún completamente entendidos, pero se piensa que son inducidos por el acoplamiento de partículas regulatorias, el PA700/19S o el PA28/11S (DeMartino et al, 1994; DeMartino y Gillette 2007; Hill et al, 2002).

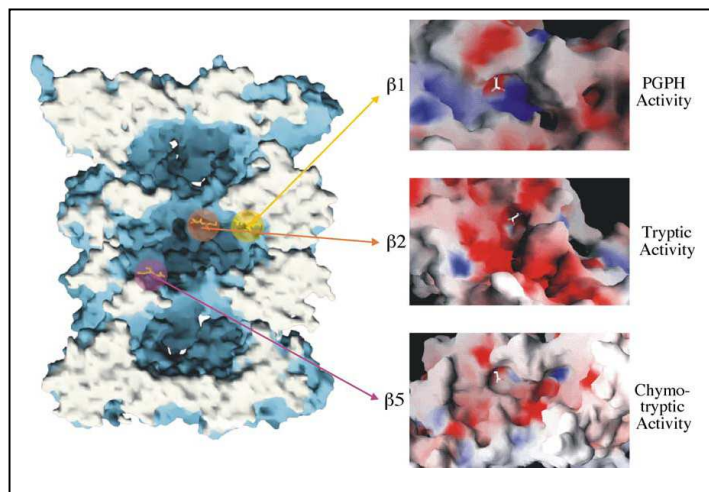


Figura 10. Representación del 20S proteosoma de levadura cristalizado. Los diversos sitios activos son marcados con un color diferente: amarillo, subunidad $\beta 1$; rojo, subunidad $\beta 2$ y magenta, subunidad $\beta 5$. Sus actividades líticas similar a caspasa (también conocida como *peptidyl glutamyl peptide hydrolase-PGPH*), similar a tripsina y similar a quimotripsina son ampliadas e ilustradas a la derecha. Tomado de Groll y Huber 2004.

Después del ingreso a la cámara catalítica, el proteosoma 20S degrada las proteínas generando oligopéptidos con una longitud de 3 a 25 residuos de aminoácidos, en promedio 7-8 residuos (Wenzel et al, 1994; Dick et al, 1998; Kisselev et al, 1999). Se han propuesto varios modelos para explicar esta longitud de polipéptidos, por un lado se habla de que el acoplamiento de los sustratos ocurre a epítopes específicos de las subunidades catalíticamente activas, los cuales presentan sitios de unión para péptidos en el rango de 7-9 aminoácidos y que la máxima probabilidad de clivar un sustrato depende del tiempo medio de permanencia en el sitio proteolítico, así el patrón de clivaje del producto está directamente relacionado con la afinidad individual de unión de cada sustrato (Dick et al, 1998; Nussbaum et al, 1998; Voges et al, 1999). Consistente con esto, las subunidades activas en eucariotas difieren principalmente en sus bolsillos de unión teniendo así diferentes especificidades en el clivaje (Groll y Clause 2003). Por su parte Kisselev y colaboradores (1999), afirman que las especificidades y las distancias entre los diferentes sitios activos no son los determinantes del tamaño del producto y que en cambio lo más probable es que el clivaje de los enlaces peptídicos se realice aleatoriamente hasta que los péptidos son lo suficientemente pequeños para escapar a una hidrólisis adicional y pueden de esta manera difundirse fuera de la cámara catalítica.

El proceso de degradación en la CP es procesivo de tal manera que una proteína es completamente hidrolizada dentro del proteosoma antes de que ingrese un nuevo sustrato (Kisselev et al, 1999). Los péptidos productos de esta degradación tienen una vida media corta y

no se acumulan en la célula. La mayoría de estos oligopéptidos son rápidamente degradados por oligopeptidasas y/o carboxipeptidasas como THIMET, Tricorn, Multicorn, TTPII y TOP (Osmulski y Gaczyncka 1998; Tamura et al, 1998; Glas et al, 1998; Silva et al, 1999; Tanaka 2009).

2.2.18.2. Partícula Regulatoria (19S RP o PA700): tiene varias funciones regulatorias sobre la actividad del proteosoma: reconoce y selecciona las proteínas sustrato marcadas con cadenas de poliubiquitina, prepara estas proteínas para la degradación (remoción de las cadenas de poliubiquitina, desplegamiento de las proteínas), regula la apertura y translocación del sustrato a la CP y probablemente también tiene influencia sobre la naturaleza de los productos generados por la CP (revisado por Glickman y Ciechanover, 2002 y Tanaka 2009). La composición de la RP de diferentes especies es muy similar. En general la 19S RP es una proteína compleja de 700 kDa y comprende 20 subunidades diferentes que se agrupan en dos clases: 1) Subunidades de partícula regulatoria triple ATPasa (Rpt) y 2) Subunidades de partícula regulatoria no ATPasa (Rpn). Cada clase tiene múltiples proteínas con masas moleculares en un rango de 10 a 110 kDa (Glickman et al, 1998; DeMartino y Gillete 2007; Hanna y Finley 2007). La arquitectura general de la RP ha sido bien establecida a través de estudios bioquímicos y de imagen (Ferrel et al, 2000) y se sabe que comprende dos subcomplejos: la tapa y la base (Fig. 11).

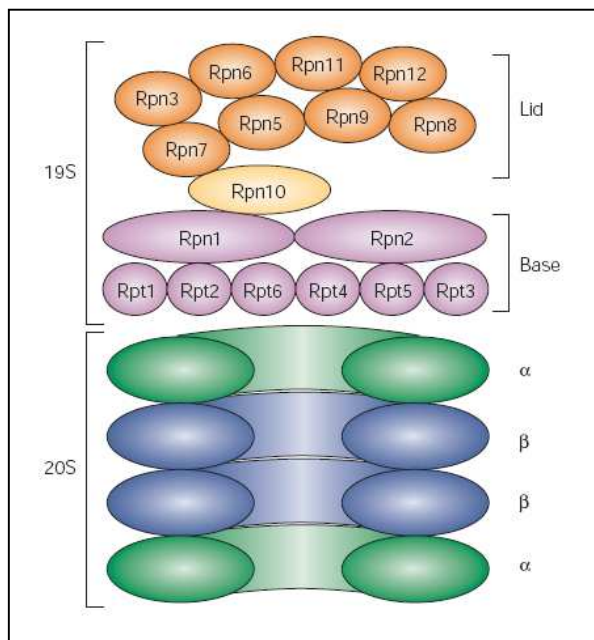


Figura 11. Composición de la RP de *Saccharomyces cerevisiae*. Se incluye un diagrama de los anillos α y β de la CP, que indica como la RP se acopla a la CP. La posición de las subunidades individuales en esta figura no necesariamente refleja la estructura cuaternaria de los subcomplejos tapa y base de la RP. **Rpn:** Subunidad de RP no ATPasa y **Rpt:** subunidad de RP ATPasa. Tomado de Pickart y Cohen, 2004.

- *La Tapa de la RP*: el complejo de la tapa está compuesto por al menos nueve subunidades no-ATPasa: Rpn3, Rpn 5, Rpn6, Rpn 7, Rpn 8, Rpn 9, Rpn 11, Rpn 12 y Rpn 15 (Fig. 11). Todas estas subunidades contienen uno de dos dominios estructurales: el dominio PCI y el dominio MPN (Glickman et al, 1998; Hofmann y Bucher 1998). La función principal de este subcomplejo es deubiquitar los sustratos capturados, proceso en el cual la metaloisopeptidasa Rpn11 trabaja en el reciclaje de las moléculas de ubiquitina (Verma et al, 2002). Sin embargo las funciones específicas de las demás subunidades de la tapa aún son desconocidas (Tanaka 2009).
- *La base de la RP*: el complejo de la base está compuesto por seis subunidades AAA-ATPasa, (Rpt1-Rpt6) y cuatro subunidades no ATPasa (Rpn1, Rpn2, Rpn10 y Rpn13). Se presume que las subunidades Rpts se ensamblan en un anillo de seis miembros de forma similar a las proteasas dependientes de ATP, ClpAP y HslVU (Kessel et al, 1995; Rohrwild et al, 1997) Las funciones principales de este subcomplejo son: capturar las proteínas sustrato a través del reconocimiento de las cadenas de poliubiquitina, desplegar el sustrato y abrir el canal en la CP. Recientemente, se ha propuesto una nueva función que involucra a las subunidades Rpn1 y Rpn2, en la cual Rpn2 interactúa con 20S, mientras Rpn1 reposa sobre Rpn2, sirviendo como un sitio de anclaje para un factor de reclutamiento de sustratos (Rosenzweig et al, 2008). Tanto Rpn1 como Rpn2 y las subunidades Rpt se requieren para la translocación del sustrato y la apertura del poro en la CP. Las subunidades Rpn10 y Rpn13 funcionan como receptores integrales de ubiquitina y atrapan eficientemente sustratos poliubiquitinados. Rpn10 tiene un UIM en su carboxilo terminal (Deveraux et al, 1995) y Rpn13 tiene en su amino terminal un dominio Pru (*pleckstrin-like receptor for ubiquitin*), el cual tiene una alta afinidad por diubiquitina y en su carboxilo terminal tiene actividad DUB, que puede facilitar su actividad de proteólisis (Schreiner et al, 2008; Husjak et al, 2008; Saeki y Tanaka 2008). La subunidad Rpn10 tiene además la función de estabilizar las interacciones entre la tapa y la base.

2.2.18.3. Moléculas Adaptadoras: recientemente, factores adicionales implicados en el reconocimiento y translocación de sustratos al proteosoma se han identificado. Existen moléculas adaptadoras o “pescadores” de sustratos poliubiquitinados. Estas proteínas incluyen Rad23 (hPlic-1, hPlic-2 y hHR23A, hHR23B en células de mamíferos), Dsk2, Ddi1, el complejo p97/cdc48^{Ufp1/Npl4} y p62. Estas proteínas contienen uno o más UBDs (por ejemplo un dominio UBA), estos dominios

son importantes para su interacción con las proteínas poliubiquitinadas y en el amino terminal poseen dominios Ubl que se unen de manera reversible a la subunidad Rpn10 de la base de la RP (Revisiones en Elsasser y Finley 2005; DeMartino y Gillete, 2007; Tanaka, 2009). Las células que carecen de Rad23 presentan degradación anormal de algunas, pero no todas las proteínas y Rad23 es esencial para la degradación de ciertas proteínas poliubiquitinadas por el 26S proteosoma en sistemas *in vitro*. Cuando se hace delección genética de Rpn10 y Rad23 se afecta de forma importante la degradación global de proteínas. Estos resultados indican que las proteínas de las células son reclutadas al proteosoma por múltiples rutas y que una misma proteína puede usar las vías clásicas o las vías alternas (Madura 2004). Las reglas que gobiernan la distinción entre rutas no son completamente conocidas pero representan un importante y complejo elemento de la regulación proteosomal (DeMartino y Gillete 2007).

2.2.18.4. Activación del Proteosoma: el proteosoma 20S libre está en un estado autoinhibido (latente), en el cual los extremos amino terminal de las subunidades α forman una puerta que bloquea el ingreso del sustrato. Así la activación del proteosoma ocurre después de la apertura de esta puerta por algún activador del proteosoma (Saeki y Tanaka 2007). Existe amplia evidencia experimental que sustenta la afirmación de que el proteosoma 20S puede ser estimulado por una gran variedad de tratamientos (Chu-Ping et al, 1994; Hofmann y Rechsteiner, 1994; DeMartino y Slaughter 1999; Whitby et al, 2000; Glickman et al, 1998; Groll et al, 2000; Köhler et al, 2001): 1) se presenta activación cuando la CP interactúa con la RP y forman el 26S proteosoma; 2) igualmente la interacción del 20S proteosoma con algunos reguladores endógenos como: el complejo inducido por interferón PA28 (regulador 11S/PA26) (DeMartino y Slaughter 1999; Rechsteiner et al, 2000; Yao et al, 1999), PA200 (Ustrell et al, 2002) y PAN en Archaea (Wilson et al, 2000) y 3) Tratamientos químicos leves, como exposición a bajos niveles de SDS (Coux et al, 1996). (Fig. 12)

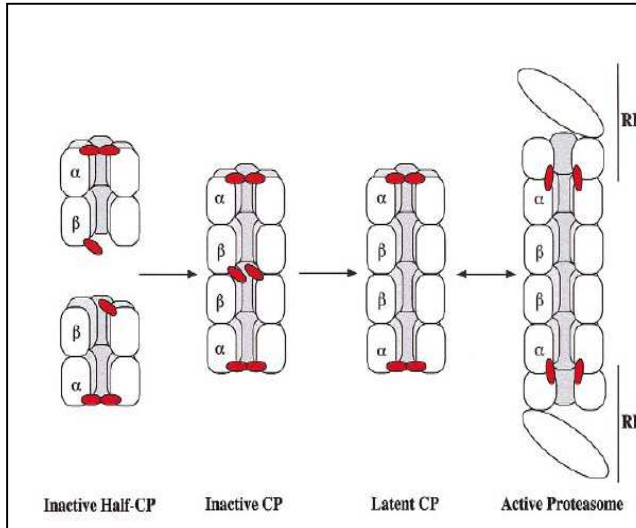


Figura 12. Modelo de regulación acoplada de activación e inhibición del proteosoma. Se esquematiza el proceso final de ensamblaje del proteosoma. Las secuencias amino terminal inhibitorias de las subunidades α y β están en rojo. En la mitad de (Partícula Central) CP inactiva, la inhibición se debe a los propéptidos de las subunidades β (los cuales directamente bloquean los sitios activos). La inhibición por las colas de las subunidades α se hace efectiva solo cuando las dos mitades de CP se condensan para formar la cámara cerrada. La CP se convierte en una partícula latente después de la autólisis de los propéptidos β . El paso final es la formación de la enzima activa, después de la unión de la (Partícula

- *El complejo PA28:* está compuesto de tres miembros estructuralmente relacionados, llamados: PA28 α , PA28 β y PA28 γ , su estructura primaria tiene una homología de ~ 50%. Mientras el PA28 α y el PA28 β se ensamblan en complejos hetero-oligoméricos con subunidades α y β alternantes, el PA28 γ parece formar complejos homo-poliméricos (Tanahashi et al, 1997). Genes para PA28 α y PA28 β solo se han encontrado en organismos con sistema inmune adaptativo (Kohda et al, 1998), mientras que genes para PA28 γ están más ampliamente distribuidos (Tanahashi et al, 1997). El PA28 estimula todas las actividades peptidasa del 20S proteosoma sin afectar la proteólisis de proteínas sustrato grandes, así su efecto estimulador es sobre la degradación de polipéptidos de tamaño intermedio (Tanaka 2009). El mecanismo mediado por PA28 para la apertura de la puerta en 20S está bien establecido. PA26 de *Trypanosoma brucei*, el cual es similar a PA28, es un complejo homoheptamérico y la unión de PA26 al 20S proteosoma se realiza por inserción de sus extremos carboxilo terminal en el bolsillo presente entre subunidades α adyacentes (Forster et al, 2005). Además, PA26 tiene un dominio conocido como “loop de activación” el cual estabiliza la conformación de puerta abierta.

- *PAN y RP 19S*: La activación del proteosoma 20S por PAN, el complejo ATPasa homoheptamérico de Archaea, el cual está muy relacionado con la RP 19S de eucariotas, también requiere los residuos del carboxilo terminal de PAN. Esta ATPasa y tres de las subunidades ATPasas de 19S (Rpt2, Rpt3 y Rpt5) tienen un motivo conservado carboxilo terminal tirosina hidrofóbico-X (HbYX) que es necesario para la apertura de la puerta en 20S. El carboxilo terminal de las moléculas de PAN se insertan en los bolsillos de 20S para inducir la apertura de la puerta a través de un mecanismo que recuerda una llave y una cerradura (Smith et al, 2007). En el caso de la RP 19S los múltiples motivos HbYX presentes en las tres subunidades ATPasas, específicamente facilitan la apertura de la puerta en 20S. De esta manera, se sabe que solo un subgrupo de extremos carboxilo terminal de las subunidades ATPasa se insertan en los bolsillos de 20S lo cual ocurre secuencialmente para estabilizar la conformación de puerta abierta a través de un aparente “bamboleo” (*wobbling*) de las ATPasas sobre el 20S proteosoma. Además, el uso de ATP puede diferir entre subgrupos de subunidades ATPasa: por ejemplo Rpt2 y Rpt5 pueden estar siempre en una forma unida al ATP y estabilizar la conformación de puerta abierta, mientras las restantes subunidades ATPasa pueden participar en un ciclo ATPasa dinámico para el desplegamiento de proteínas (Saeki y Tanaka, 2007).
- *PA200*: El complejo PA200-CP-RP se ha encontrado con frecuencia en células eucariotas. PA200 (Blm10) tiene una estructura altamente elongada y curva y se acopla a la CP 20S, donde se posiciona para activar el auto inhibido 20S (Schmidt et al, 2005). PA200 hace contacto con todas las subunidades α , excepto la subunidad $\alpha 7$ y esta interacción induce la apertura del canal axial en las subunidades α , lo cual indica que el mecanismo de activación de PA200 se logra a través de sus efectos alostéricos sobre la CP 20S (Tanaka, 2009). Recientemente se ha observado que la unión de un solo complejo PA200 al 20S representa una CP con proteólisis activa, pero la unión a cada de extremo de CP de complejos PA200 suprime la actividad peptidasa, sugiriendo entonces que PA200 ejerce regulación de la activación de CP 20S (Lehmann et al, 2008).

2.2.18.5. Otras Funciones del Proteosoma

- *Degradación de proteínas no ubiquitinadas*: el proteosoma 26S puede catalizar degradación de proteínas de una forma independiente de ubiquitina, cuando el papel de

marcador de esta última es remplazado por otra proteína o por una señal de degradación en la secuencia de la proteína blanco y tales activaciones parecen ser dependientes de la interacción o incremento en la accesibilidad de estos sustratos a la cámara catalítica del proteosoma (Orlowski y Wilk 2003). La ornitina decarboxilasa (OCD) fue la primera proteína que se descubrió es degradada por el proteosoma 26S sin previa ubiquitinación, su degradación es dependiente de la presencia de ATP y antizima (AZ) (Murakami et al, 1992). Un dominio carboxilo terminal de AZ promueve su unión a ODC y un dominio amino terminal estimula su degradación por el proteosoma. La degradación de ODC libera AZ intacta y reciclable (Murakami et al, 2000). Existen varias proteínas que son degradadas independientemente de la poliubiquitinación, algunos ejemplos son: c-Jun (Jariel-Encontre et al, 1995), calmodulina (Tarcza et al, 2000), troponina C (Benaroudj et al, 2001), el inhibidor quinasa dependiente de ciclina p21Cip1 (Sheaff et al, 2000), y la proteína supresora de tumores p53 (Asher et al, 2002). Existe información que sugiere que p21Cip1 puede ser degradada por el proteosoma 26S tanto de una manera dependiente de ubiquitina como independiente de su conjugación a esta y también es susceptible a degradación directa por el 20S (Sheaff et al, 2000). Para el caso de la proteína p53 está bien documentada su degradación a través de la vía ubiquitina proteosoma, pero también se ha encontrado que puede ser degradada por un mecanismo independiente de ubiquitina que es regulado por quinona oxidoreductasa 1 NAD(P)H (Asher et al, 2002; Asher y Shaul 2006). Para el caso de varias proteínas nativas y oxidadas que son degradadas *in vitro* por el 20S proteosoma (calmodulina, caseína, hemoglobina, superóxido dismutasa, albumina sérica e histonas oxidadas), se sabe que un incremento en la hidrofobicidad que es inducida por la oxidación de la proteína es el mecanismo que permite su degradación por el proteosoma (Davies 2001; Shringarpure et al, 2003).

El proteosoma 20S libre constituye una porción importante de la cantidad de proteosomas presentes en las células. La concentración de proteosoma 20S en células *Hella* se calcula en aproximadamente dos veces la cantidad de 26S o 20S-PA28 (Tanahashi et al, 2000). Proteínas desplegadas naturalmente, algunas proteínas regulatorias de vida media corta y algunas de vida media larga y proteínas dañadas, mutadas o mal plegadas son susceptibles de la degradación por la CP 20S (Baugh et al, 2009). La mayoría de los estudios de degradación por el 20S proteosoma se han realizado sobre la enzima aislada y es posible que los cambios estructurales durante los procesos de purificación produzcan activación de la partícula (Orlowski y Wilk 2003).

- *Procesamiento de sustratos:* el procesamiento de un sustrato por el proteosoma puede servir como una herramienta regulatoria para transformar una proteína de una forma en otra, alterando su actividad celular (Glickman y Ciechanover 2002). El ejemplo mejor estudiado es el procesamiento de p105, precursor de p50, el cual es un componente del factor de transcripción NF- κ B. Después de que p105 es ubiquitinado en su carboxilo terminal, este dominio C-terminal es hidrolizado por el proteosoma y la región amino terminal de 50 kDa es liberada como una proteína estable y activa. En el caso de p105 el sitio de procesamiento es determinado en parte por una región rica en glicina presente en la mitad de la proteína (Palombella et al, 1994; Orian et al, 1999; revisado por Chen 2005). Estudios posteriores demostraron que el 20S proteosoma bajo ciertas condiciones puede realizar el procesamiento de p105 sin previa ubiquitinación, pero siempre es necesaria la presencia de la región rica en glicina para impedir la degradación completa de la proteína (Moorthy et al, 2006). De igual manera el precursor de p52, p100, componente de NF- κ B2 es procesado por el proteosoma después de una región rica en glicina (Heish et al, 1999). Otro ejemplo de procesamiento es la proteína de 155 kDa, *Cubitus interruptus* (Ci), la cual es un activador de transcripción en la vía de señalización Hedgehog. Hay evidencia de que después de la ubiquitinación de su extremo carboxilo terminal esta proteína es hidrolizada por el proteosoma y el dominio amino terminal de 75 kDa es liberado y sirve como represor de esta vía (Wang et al, 1999).
- *Funciones no-proteolíticas:* además de su función como proteasa, el proteosoma tiene funciones no proteolíticas en una variedad de procesos celulares incluyendo transducción, reparación del ADN y remodelación de la cromatina. La base para esta afirmación es la recurrente identificación de subunidades ATPasa de la RP 19S como mediadores de actividades similares a chaperona (DeMartino y Gillette 2007). Hace algún tiempo, estudios en levadura identificaron mutantes específicos de alelos de Rpt como supresores de un mutante transactivador Gal4. Posteriores análisis demostraron al menos dos actividades no proteolíticas y genéticamente distintas de la RP 19S en la iniciación transcripcional y en la elongación. La localización de ATPasas de la RP 19S de manera dependiente de la transcripción en promotores Gal y el hallazgo de que la asociación estable de un transactivador con el complejo histona acetiltransferasa SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase*) es controlado por la actividad de RP 19S ha sugerido aún más su papel como cotransactivador (Baker y Grant 2005; Collins y Tansey 2006).

La RP19S también participa en el proceso de reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*-NER) (Reed y Gillette 2007). La inhibición de proteólisis dependiente del proteosoma no tiene efecto sobre la actividad NER *in vitro*, mientras que la inhibición de la actividad ATPasa de la RP 19S inhibe esta actividad de una manera dependiente de Rad23. La remodelación de la cromatina es otra función no proteolítica del la RP 19S, con implicación tanto en transcripción como en reparación del ADN. Las ATPasas de RP 19S median silenciamiento de genes en los telómeros por mecanismos que involucran la regulación de la modificación de la histona nucleosomal (Collins y Tansey 2006). Específicamente, las subunidades ATPasa de RP 19S controlan la metilación de la histona H3 en respuesta a la ubiquitinación de la histona H2B.

Es probable que los procesos proteolíticos y no proteolíticos puedan estar separados espacial y temporalmente por el ensamblaje y des ensamblaje regulado del proteosoma en lugares específicos durante la reparación del ADN y la transcripción. Con estos hallazgos, el proteosoma es considerado como un mediador multifacético de muchos procesos celulares a través de mecanismos proteolíticos y no proteolíticos y su composición dinámica y modular permiten que participe en un amplio rango de funciones fisiológicas (DeMartino y Gillette, 2007).

2.2.18.6. Homología y Similaridad del Proteosoma con Otros Complejos Celulares:

la estructura cuaternaria del 20S proteosoma es conservada de bacteria, incluyendo a Archaea y hasta mamíferos y los sitios activos siempre están presentes en el interior de la CP para la degradación (Voges et al, 1999; Pickart y Cohen 2004). Los proteosomas de Archaea han servido como prototipo de todas las secuencias de las diferentes subunidades del proteosoma. En realidad, la definición de subunidades α y β también se basa en la similaridad a las subunidades α y β del proteosoma de *Thermoplasma acidophilum* y con frecuencia el proteosoma de este Archaea es llamado "Urproteosoma" o "proteosoma ancestral" (Nandi et al, 2006). Hay una evolución progresiva en la complejidad estructural del proteosoma. Entonces, todas las subunidades en un anillo del proteosoma de Archaea son idénticas, mientras que en eucariotas cada anillo está compuesto de 7 subunidades diferentes, aunque cada subunidad por anillo pertenece al mismo tipo (α o β). Funcionalmente, los proteosomas de *T. acidophilum* son indispensables solo durante choque térmico (Ruepp et al, 1998). Sin embargo, 13 de las 14

subunidades del proteosoma de *S. cerevisiae*, son esenciales para la viabilidad de este eucariota (Velichutina et al, 2004). Una característica interesante es que no hay grandes diferencias en el tamaño de los péptidos generados después de la hidrólisis de proteínas entre el proteosoma de *T. acidophilum*, el cual tiene 14 sitios activos, frente al proteosoma humano que solo tiene 6 (Nussbaum et al, 1998). La forma más simple del proteosoma es la proteasa HslUV (*heat shock locus v* o ClpQY) la cual ha sido identificada en eubacterias (Missiakas et al, 1996) y eucariotas primitivos (Couvreur et al, 2002). Esta consta de dos anillos hexaméricos apilados compuestos de subunidades proteolíticas (HslV), en los extremos del cual se asocian anillos de ATPasas (*heat shock locus u*- HslU-) pertenecientes a la superfamilia de triple A (AAA) (Neuwald et al, 1999; De Mot et al, 1999). Proteosomas más elaborados se encuentran en Actinomicetos gran positivos (Zwickl y Baumeister, 1999). Varios genomas de eubacteriales (actinomicetos) tienen genes simples que codifican para subunidades α y β del proteosoma (Lupas et al, 1994). Para algunos actinomicetos el 20S proteosoma no es esencial, es el caso de *Mycobacterium smegmatis* (Knipfer y Shrader 1997), pero para algunos es indispensable, *Mycobacterium tuberculosis* (Sasseti et al, 2003).

Hay también un incremento en la complejidad de bacterias a eucariotas, de las ATPasas y otras proteasas regulatorias que se asocian al proteosoma. La HslU que se une a HslV, es un anillo hexamérico ATPasa y está relacionada con ClpX, que es la ATPasa de la proteasa ClpP, mientras que las ATPasas que se asocian al 20S proteosoma de eucariotas están relacionadas con el dominio ATPasa de la proteasa FtsH. Además para HslU todas las seis ATPasas que la conforman son codificadas por un solo gen (Zwickl et al, 1999; Darwin et al, 2005). El homólogo de esta estructura es mucho más complejo en eucariotas y corresponde la partícula regulatoria 19S (descrita previamente). Adicionalmente, los eucariotas tienen otras partículas que se pueden asociar al 20S proteosoma como son PA28, PA26 y PA200, entre otros.

También existe una evidente progresión en complejidad de los sistemas de marcaje de sustratos blanco para su reconocimiento y degradación por el proteosoma o sus equivalentes. En eucariotas la mayoría de las proteínas son marcadas por su conjugación a moléculas de ubiquitina (Glickman y Ciechanover 2002) con algunas excepciones (Orlowski y Wilk 2003). Este tipo de marcaje al parecer no está presente en procariotas. Sin embargo, recientemente se han descrito vías de conjugación a sustratos blanco de degradación que son consideradas análogas a la ubiquitinación (Iyer et al, 2008; DeMartino 2009). Algunas proteínas tienen un conjugado en su amino terminal, como la proteína ARC, la cual marca sustratos para su degradación por HslV (Burton et al, 2005).

Gille y colaboradores (2003) analizaron la evolución de los proteosomas mediante la evaluación de 61 genomas completos y 60 genomas incompletos y encontraron que varios protistas poseen tanto HsIV como un proteosoma 20S. Algunas actinobacterias tienen proteosomas con distintas subunidades α y β . Además hay muchas bacterias que no poseen un homólogo del proteosoma o una HsIV, así que es probable que tengan otro tipo de proteasas en su lugar. Finalmente ellos reportan que dos bacterias, *Magnetospirillum magnetotacticum* y *Enterococcus faecium*, tiene dos copias de HsIV. Con la información que se posee hasta el momento los proteosomas de actinobacterias parecen ser los ancestros de los proteosomas de Archaea y eucariotas (Valas y Bourne 2007).

2.2.18.7. Inhibición del Proteosoma: se han descrito numerosos medicamentos y sustancias químicas que inhiben el proteosoma, muchas de las cuales interfieren directamente con la actividad proteolítica de la CP 20S. Estos inhibidores se unen tanto reversible como irreversiblemente a los sitios activos de CP 20S y existen varios niveles de especificidad para el 26S proteosoma. Dentro de las sustancias inhibitorias más comúnmente empleadas se encuentran péptidos aldehídos: MG132, PSI, lactacistina, NLVS y epoxomicina y los péptidos ácidos borónicos los cuales son 1000 veces más potentes que sus análogos aldehídos y son muy selectivos por el proteosoma, el más ampliamente estudiado es el Bortezomib (Adams 2003). La inhibición del proteosoma produce numerosos efectos en diferentes células eucariotas, innumerables investigaciones se han realizado para evaluar su potencial como blanco terapéutico en enfermedades como cáncer (Lightcap et al, 2000) y en algunos casos para evaluar la necesidad del proteosoma en el ciclo de vida de algunos microorganismos (González et al, 1996; Gantt 1998; González et al, 1999).

La identificación y uso de inhibidores biológicos y sintéticos selectivos para las diferentes actividades proteolíticas del proteosoma han contribuido a la identificación de las funciones esenciales del 26S proteosoma en varios procesos y vías de señalización en células eucariotas (Naujokat et al, 2007). La inhibición del proteosoma induce apoptosis preferencialmente en células de rápida proliferación y células neoplásicas (Drexler 1997; Chen et al, 2000), por lo cual el uso de inhibidores del proteosoma en la terapia del cáncer se ha incrementado (Rajkumar et al, 2005; McConkey y Zhu 2008).

- *Inhibidores que se unen de forma covalente:*
 - o *N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (Ac-LLnL-al)*: también conocido como inhibidor de calpaina I fue el primer inhibidor del proteosoma descubierto. A pesar de no ser específico, este inhibidor fue usado ampliamente para el análisis de las funciones del proteosoma *in vivo* (Vinitsky et al, 1994). Este inhibidor se une covalentemente a los grupos hidroxilo de las Thr1 de todas las subunidades β activas de la CP formando enlaces hemiacetal, de esta manera bloquea la actividad CTL y disminuye la actividad TL y la actividad CL. El grupo Ac-LLN-al forma un enlace covalente hemiacetal con el Thr1O^Y de todas las subunidades activas de la CP (Borissenko y Groll 2007).
 - o *Lactacistina*: producida por *Streptomyces sp.*, fue el primer inhibidor natural del proteosoma identificado. Lactacistina se une primordialmente a la subunidad β 5 del proteosoma (Fenteany et al, 1995), inhibiendo entonces, de forma efectiva e irreversible la actividad CTL. Las actividades TL y CL también son bloqueadas, aunque en mucho menor grado. En condiciones acuosas y a pH 8,0 lactacistina es hidrolizada espontáneamente a Clasto-lactacistina β -lactona, la cual penetra las células e inhibe la CP (Dick et al, 1997). La unión covalente de lactacistina al Thr1O^Y amino terminal mediante la formación de un enlace éster en el sitio activo de la subunidad β 5 causa una inhibición irreversible (Groll y Huber 2004; Borissenko y Groll, 2007). Sin embargo se ha encontrado que lactacistina también inhibe las serina proteasas lisosomales: Catepsina A (Ostrowska et al, 1997) y la tripeptidil peptidasa II citosólica (Geier et al, 1999).
 - o *Epoxomicina*: es una $\alpha'\beta'$ epoxicetona de origen natural (actinomiceto cepa Q996-17) que inhibe de forma eficiente e irreversible la CP (Meng et al, 1999). A diferencia de otros inhibidores del proteosoma la epoxomicina es altamente específica y no inhibe otras proteasas como calpaina, tripsina, quimotripsina, papaína o catepsinas (Groll y Huber 2004). La base molecular de su selectividad debe a la formación de un morfolino entre la treonina amino terminal de las subunidades catalíticas de la CP y la epoxomicina. La formación del morfolino derivado se lleva a cabo en dos pasos: 1) La activación de ThrO^Y ocurre porque su grupo amino terminal actúa como una base directamente o por vecindad con una molécula de agua. Luego del ataque nucleofílico de ThrO^Y sobre el átomo de

carbono carboxilo de la epoxicetona, se produce un hemiacetal. 2) Para completar la formación del anillo morfolino el amino terminal de Thr1 abre el anillo epóxido por un desplazamiento intramolecular con la consecuente inversión del átomo de carbono C2 (Fig. 13). La especificidad se explica entonces por la necesidad del grupo amino terminal libre y la cadena nucleófilo lateral para la formación del aducto con la epoxicetona. De esta manera la epoxomicina solo interactúa con Ntn-hidrolasas, siendo un inhibidor muy específico que bloquea todas las subunidades activas de la CP (Groll et al, 2000; Groll y Huber 2004). Ensayos enzimáticos en proteosoma purificado a partir de bovino revelaron que este componente afecta primariamente la actividad CTL, las actividades TL y CL son inhibidas en tasas más bajas de 100 y 1000 respectivamente (Kim et al, 1999).

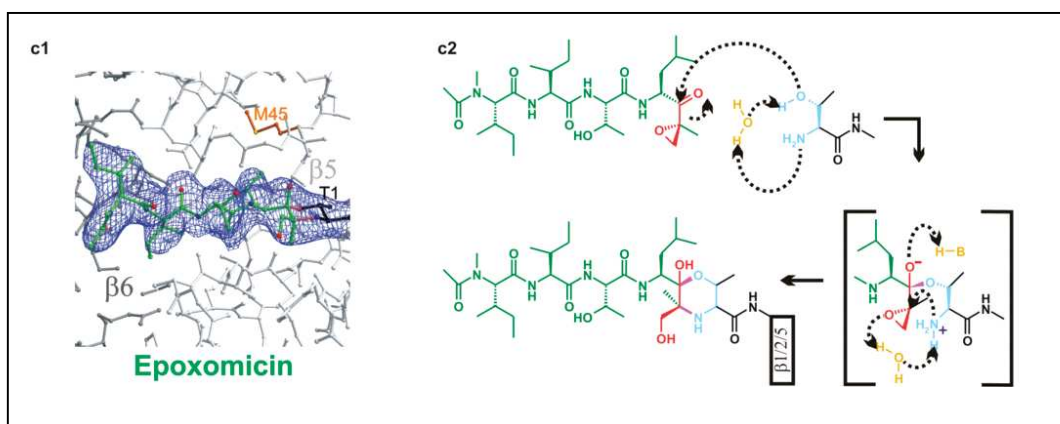


Figura 13. Subunidades catalíticas del proteosoma de levadura en complejo con epoxomicina. Las subunidades que forman los sitios activos y sus vecinos son blancas y grises respectivamente; la epoxomicina esta en verde y los grupos funcionales en rojo. Los enlaces covalentes del inhibidor con el proteosoma aparecen en magenta. **c1:** Mapa de densidad electrónica de la epoxomicina unida a la subunidad $\beta 5$. **c2:** Representación esquemática del mecanismo de formación del aducto derivado morfolino. La unión de epoxomicina al proteosoma resulta en la formación de un aducto morfolino entre el farmacóforo y el sitio activo amino terminal Thr1. El ataque nucleofílico por ThrO^y sobre la epoxomicina resulta en la formación de un hemiacetal seguido por la ciclización de Thr1N sobre el epóxido, formando el aducto morfolino. Tomado de Groll y Huber 2004.

- *Péptidos que poseen vinil sulfona:* estos componentes se unen a la CP de forma irreversible, pero son menos reactivos que los péptidos aldehídos y no son altamente específicos ya que inhiben cisteína proteasas intracelulares (catepsinas). Su mecanismo de acción se basa en la unión covalente de ThrO^y de todas las

subunidades activas de la CP al átomo de carbono β del grupo vinil sulfona (Groll et al, 2002).

- *Péptidos con grupos aldehído*: generalmente los inhibidores aldehído entran rápidamente a la célula y su efecto es reversible pues tienen tasas de disociación altas, siendo rápidamente oxidados en ácidos carbónicos y transportados fuera de la célula. Por lo anterior, el efecto de estos inhibidores puede ser rápidamente revertido por la remoción del compuesto. Un ejemplo de esta clase de inhibidores es el MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), este inhibidor es más potente contra el proteosoma que el inhibidor de calpaina I y mucho más selectivo, uniéndose de forma específica a la subunidad $\beta 5$ de la CP a través de la formación de un enlace hemiacetal (Fig. 14) (Borissenko y Groll 2007). Este inhibidor penetra rápidamente las células eucariotas y su actividad inhibitoria es reversible. Este compuesto tiene actividad inhibitoria sobre otras enzimas celulares como calpainas y catepsinas lisosomales, sin embargo esta actividad se presenta en concentraciones 10 veces superiores a las empleadas para inhibir el proteosoma (Tsubuki et al, 1996).

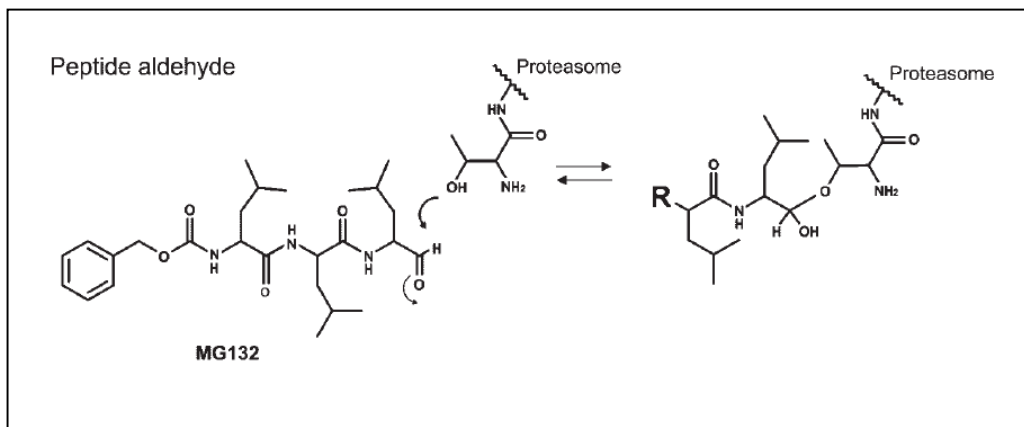


Figura 14. Mecanismo de inhibición del proteosoma por MG132. La estructura química completa de MG132 esta a la izquierda y es reemplazada por una R en el esquema de la derecha. MG132 forma un aducto tetrahedral con el sitio activo treonina la CP. Tomado de Meiners 2007

- *Inhibidores con Unión No Covalente:*

- *TMC-95s (TMC-95 A, B, C y D)*: es un producto natural de *Apiospora montagnei*. Este producto bloquea selectivamente y de forma competitiva la actividad de la CP (Koguchi et al, 2000). Estos componentes constan de un sistema de anillo heterocíclico compuesto de aminoácidos modificados. El inhibidor se une a todos

los sitios activos de forma no covalente sin modificar las treoninas amino terminal. Una apretada red de enlaces de hidrógeno conectan a TMC-95A con la proteína estabilizando su posición. Todas las interacciones se realizan con átomos de cadena principal y residuos estrictamente conservados de la CP, teniendo un modo común de inhibición entre diferentes especies. Los componentes del tipo TMC-95 no inhiben otras proteasas como calpaina, catepsina y tripsina (Kohno et al, 2000).

2.2.18.8. Efectos Biológicos de la Inhibición del Proteosoma: la disponibilidad de inhibidores del proteosoma con alta especificidad y potencia han permitido el conocimiento del papel que desempeña el sistema ubiquitina proteosoma en muchos procesos biológicos (Borissenko y Groll 2007). Cuando estos inhibidores se utilizan en células, los efectos biológicos son diversos dependiendo del proceso que afecten primordialmente. El efecto final de los inhibidores del proteosoma depende de varios parámetros como son: tipo de célula, capacidad de proliferación, naturaleza, dosis y tiempo de exposición al inhibidor (Lin et al, 1998). Por lo anterior, la estimación del efecto general del tratamiento con un inhibidor debe realizarse considerando todos estos parámetros, además de tener en cuenta que muchos de los compuestos que inhiben el proteosoma no son totalmente específicos y pueden inhibir otras proteasas citosólicas (Groll y Huber 2004). Otro aspecto importante que debe considerarse al analizar los efectos divergentes de las células a los inhibidores del proteosoma es la dosis (revisado por Meiners et al, 2007). Estudios recientes han reportado efectos celulares diferentes después del tratamiento con inhibidores del proteosoma a diferentes dosis, así se encuentran dosis protectivas y dosis proapoptóticas o letales y estos efectos se asocian a un patrón distinto de inhibición de los tres sitios activos del proteosoma. Las dosis altas (proapoptóticas) causan una inhibición sostenida de más del 90% de la actividad CTL y una inhibición mayor al 50% de la actividad CL. En contraste las dosis bajas (protectivas) inhiben parcialmente el proteosoma con un 80% de reducción en la actividad CTL, pero con poco o ningún efecto sobre las otras dos actividades proteolíticas (Meiners et al, 2006). Estos datos coinciden con el estudio de Kisselev y colaboradores (2006), según el cual la inhibición eficiente de la actividad proteolítica del proteosoma solo puede lograrse por la inhibición sostenida y simultánea de la actividad CTL y un segundo sitio activo, ya sea TL o CL. La conclusión es que la inhibición sostenida de múltiples sitios activos del proteosoma es citotóxica, mientras la inhibición parcial de su actividad CTL puede resultar en protección de las células tratadas (Meiners et al, 2007).

- *Efectos sobre el control del ciclo celular:* el proteosoma está involucrado en la degradación de numerosas proteínas regulatorias del ciclo celular (G1, ciclinas mitóticas, inhibidores CDK, p53, etc.). Existen varios reportes que afirman que la inhibición del proteosoma afecta el ciclo celular en diferentes fases: arresto de la mitosis en G1/S y G2/transición (Sherwood et al, 1993; Wojcik et al, 1999). El tratamiento de oocitos con inhibidores como lactacistina y MG132 afecta el proceso de meiosis, alterando la organización normal del huso en la profase y la segregación de cromosomas en la anafase (Josefsberg et al, 2000; Tan et al, 2005).

- *Efectos sobre la apoptosis:* el uso de inhibidores del proteosoma ha demostrado que el sistema ubiquitina proteosoma tiene un efecto decisivo sobre la muerte y la supervivencia celular. Los efectos de inhibidores específicos del proteosoma sobre apoptosis dependen en gran medida del estado de proliferación de la célula y el tipo celular. Algunos sustratos de la vía ubiquitina proteosoma (p53, E2F, c-myc, c-jun, NF-κB) son proteínas de vida media corta que tienen papeles críticos en la regulación de la transcripción, progresión del ciclo celular y en regulación de la muerte celular programada. Los inhibidores del proteosoma con frecuencia disparan la apoptosis en células con alta proliferación (Orlowski et al, 1998). Sin embargo, en algunos casos, el efecto de los inhibidores sobre células que no proliferan es la protección celular al proceso de apoptosis (Grimm et al, 1996). Los efectos pro o anti apoptóticos de los inhibidores del proteosoma parecen ser específicos del tipo de célula, siendo más propensas a efectos proapoptóticos las células de división rápida (Lopes et al, 1997). Se sabe que la acumulación de proteínas mal plegadas, no degradadas después del tratamiento con inhibidores del proteosoma, conduce a la activación del amino terminal de la quinasa c-Jun (JNK), la cual activa la cascada apoptótica (Meriin et al, 1998).

- *Inducción de la respuesta de choque térmico:* Lin y colaboradores (1998) encontraron que en concentraciones que no inducen apoptosis, los inhibidores del proteosoma pueden proteger la célula de apoptosis inducida por otros factores. Este efecto parece estar relacionado con la inducción de la producción de proteínas de choque término (*heat-shock proteins*-hsp) (Bush et al, 1997). Además, la inducción de hsp estimula en las células la termoestabilidad, por lo que el uso de inhibidores del proteosoma puede tener aplicación en protección tisular a daño por incremento en la temperatura, estrés y apoptosis (Lee y Goldberg 1998).

2.2.18.9. Adaptación del Proteosoma a Inhibición: la identificación y uso de inhibidores del proteosoma de origen natural y sintético ha contribuido a determinar las funciones esenciales del 26S proteosoma en varios procesos y vías de las células eucariotas (Naujokat y Hoffman 2002; Dalton 2004). Con los estudios previos no hay duda del papel esencial del proteosoma en la proteólisis celular, pero hay evidencia que denota la existencia de vías proteolíticas alternas al SUP. Esta evidencia se basa en reportes de varios sustratos cuya degradación es resistente a diferentes inhibidores del proteosoma y en la mayoría de los casos se desconoce la actividad proteolítica responsable (Vigoroux et al, 2003; Anton y Villasevil 2008). Algunos ejemplos de proteasas que han sido sugeridas como actores en estos procesos de proteólisis son:

- *Calpains*: implicadas en la degradación regulada de β -catenina de forma independiente del proteosoma (Bennetti et al, 2005). La calpaina 3 cliva ciclina A, removiendo la caja de destrucción amino terminal y previniendo su degradación (Welm et al, 2002).

- *Caspasas*: desempeñan un papel importante en la degradación de Mcl-1 inducida por el factor de necrosis tumoral α (*tumour necrosis factor α -TNF α*) en neutrófilos (Cross et al, 2008).

- *Tripeptidil peptidasa II (TPP II)*: estudios recientes han demostrado mecanismos complejos de modificación adaptativa del sistema ubiquitina proteosoma y de la proteasa extralisosomal TPP II en respuesta a estrés celular, que incluye inhibición de las actividades proteosomales. Dependiendo del inhibidor del proteosoma y el tipo de célula usado, estos estudios tienen resultados diferentes y en algunos casos controversiales. Se ha encontrado tanto un incremento como una disminución de la actividad proteosomal, esta última acompañada por un incremento en la expresión y actividad de TPP II, como un mecanismo compensatorio (Geier et al, 1999; Wang et al 2000; Naujokat et al, 2007).

TPP II (TPP II; E.C. 3.4.14.10.) fue descubierta en 1983 en la búsqueda de una peptidasa específica para péptidos fosforilados. La caracterización de la enzima demostró que es una aminopeptidasa que remueve tripéptidos secuencialmente de un amino terminal libre de péptidos grandes (Tomkinson 2004). La forma predominante de TPP II es extralisosomal, pero también existe una forma asociada a membrana (Rose et al, 1996). TPP II tiene un amplio rango de especificidad de sustratos, considerando que hay poca similaridad en la secuencia entre los

péptidos removidos. Sin embargo su actividad no es indiscriminada, ya que la tasa de clivaje varía más de 100 veces dependiendo de la secuencia del sustrato. La enzima parece tener alguna preferencia por clivar después de residuos hidrofóbicos y no puede clivar antes o después de residuos prolina (Tomkinson y Lindas 2005). A pesar de su predominante actividad exopeptidasa, TPP II también tiene una baja actividad endopeptidasa, clivando preferencialmente después de residuos lisina (Geier et al, 1999; Seifert et al, 2003). Al parecer su función fisiológica es participar en la degradación citosólica de proteínas junto con diferentes endopeptidasas (Tomkinson 1999; Tomkinson y Lindas, 2005) y el proteosoma (Seifert et al, 2003; Reits et al, 2004; Kloetzel 2004; Anton y Villasevil 2008). Sin embargo, la tarea específica y función de TPP II en células eucariotas no se ha determinado completamente, pero su funcionalidad asociada al proteosoma es cada vez más estrecha. El estudio de Glas y colaboradores (1998) la relacionó con el sistema que compensa la pérdida de la función del proteosoma. Además, existen reportes acerca de que TPP II, en células EL-4, compensa las funciones básicas y específicas del proteosoma, como son la degradación de proteínas poliubiquitinadas y generación de péptidos del MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de la clase I. Esta función compensatoria se observó también en células EL-4 con actividad TPP II incrementada debido a la adaptación al inhibidor del proteosoma NLVS (Wang et al, 2000).

Estudios de microscopía electrónica de TPP II mostraron que es una enzima grande en complejos oligoméricos con un peso molecular de aproximadamente 4 MDa los cuales se forman por subunidades de 138 kDa (Tomkinson 2004). Estos complejos son requeridos para una completa actividad enzimática y la asociación y disociación pueden ser una forma de regulación de la actividad de esta enzima (Tomkinson 2000).

2.2.18.10. Inhibición del Proteosoma en Parásitos Protozoarios: el uso de diversos inhibidores del proteosoma, MG132, lactacistina, epoxomicina, glioxina etc., ha contribuido a definir el papel que desempeñan los proteosomas en varios procesos de parásitos protozoarios como replicación y transformación durante los ciclos de vida (Paugam et al, 2003). Estudios recientes han sugerido que el proteosoma puede representar un promisorio blanco terapéutico en enfermedades como cáncer y muy probablemente en enfermedades parasitarias como malaria y la enfermedad del sueño (Paugam et al, 2003; Kreidenweiss et al, 2008). En la Tabla 1 se resumen los diferentes estudios de inhibición del proteosoma en parásitos protozoarios.

Tabla 1. Efecto de Inhibidores de Proteosoma Sobre Parásitos Protozoarios

Parásito	Inhibidor	Efectos	Referencia
<i>Entamoeba invadens</i>	- Lactacistina y MG132	- Bloquean el crecimiento del parásito e inhiben la enquistación, no efecto sobre el proceso de exquistación.	González et al, 1999; Makioka et al, 2002
<i>Entamoeba histolytica</i>	- Lactacistina y MG132	- Bloquean el crecimiento del parásito e inhiben la enquistación	Makioka et al, 2002
<i>Trypanosoma cruzi</i>	- MG132 y Lactacistina	Bloquean la transformación de tripomastigote a amastigote. No efecto sobre la invasión.	González et al, 1996; deDiego et al, 2001
<i>Trypanosoma brucei</i>	- Lactacistina	- Bloquea la progresión del ciclo celular, pero no afecta la transformación de la forma sanguínea a la forma procíclica.	Nkemgu-Njinkeng et al, 2002
<i>Plasmodium falciparum</i>	- EPOXOMICINA	- Inhibe el crecimiento del parásito. - Bloquea la replicación del parásito.	- Kreidenweiss et al, 2008 - Certad et al, 1999
<i>Plasmodium bergeri</i>	- Lactacistina	- Bloquea la replicación pero no inhibe el ingreso del parásito al eritrocito.	- Gantt et al, 1998
<i>Toxoplasma gondii</i>	- MG132 y lactacistina. - Gliotoxina.	- Bloquean la replicación sin afectar el ingreso del parásito a la célula. - Bloquea la replicación sin afectar el ingreso del parásito a la célula	-Shaw et al, 2000 -Paugam et al, 2002
<i>Leishmania mexicana</i>	- MG132 - ALLN - Lactacistina	- Bloquea el crecimiento del parásito. - Bloquea el crecimiento del parásito. - No efecto, no penetración.	Robertson 1999
<i>Leishmania chagasi</i>	- Lactacistina	- Bloquea el crecimiento, no afecta el ingreso a la célula pero reduce la viabilidad.	Silva-Jardim et al, 2004

2.2.19. Sistema Ubiquitina-Proteosoma en *Giardia intestinalis*

La Ubiquitina es una proteína altamente conservada, en *Giardia intestinalis* se describió en 1994 la presencia de un único gen que codifica para esta proteína (Krebber et al, 1994). Sin embargo, en nuestro laboratorio en 2007, Gallego y colaboradores identificaron por bioinformática un gen adicional de ubiquitina que se encuentra fusionado al gen de una subunidad ribosomal; similar a lo que se ha descrito en otros eucariotas. Actualmente se sabe que los genes de Ubiquitina se expresan como tres precursores, una unidad idéntica concatenada (poliubiquitina), y dos (UbL40 y UbS27) que están fusionados a polipéptidos ribosomales L40 y S27 (Catic y Ploegh 2005). Recientemente Catic y colaboradores (2007) mostraron que efectivamente *Giardia intestinalis* presenta otro gen de ubiquitina y este se encuentra fusionado a la proteína ribosomal S27.

En cuanto al sistema de ubiquitinación se han identificado parcialmente algunos de los componentes en *G. intestinalis*. Gallego y colaboradores (2007) identificaron por bioinformática y analizaron la expresión de genes homólogos a una Enzima activadora (E1), una Enzima conjugadora (E2), una Enzima ligadora de ubiquitina con dominio HECT y la ligasa E3-alfa (involucrada en la vía del N-terminal). Además identificaron *in-silico* otras tres enzimas E2, dos E3 ligasas (una de ellas con dominio RING) y cuatro homólogos de proteínas deubiquitinadoras (Gallego et al, 2007). En un estudio reciente Castellanos (2009) empleando como metodología bioinformática el Modelo Oculto de Marcov (HMM) reportaron dos genes que codifican proteínas MoeB y se postulan como enzimas activadoras E1 ancestrales en bacterias. Además, encontraron 80 secuencias para enzimas E3 y 12 genes de DUBs (3 no reportados previamente). Estos resultados muestran que *G. intestinalis* presenta las enzimas necesarias para la ubiquitinación de proteínas. Hasta la fecha solo se ha identificado un sustrato ubiquitinado en *Giardia*, la Glucosalina-6-fosfato isomerasa, esta enzima cataliza el primer paso en la biosíntesis de N-Acetilgalactosamina, el componente que forma el polímero de la pared del quiste, sin embargo en dicho trabajo solo se mostró que la proteína tiene ubiquitina conjugada pero no se analizó ni discutió su significado biológico (Lopez et al, 2002).

En cuanto al proteosoma de *Giardia intestinalis*, este fue purificado por Emmerlich y colaboradores (1999). Por medio de gradientes de glicerol y cromatografía se purificó el proteosoma 20S de 700kDa y la micrografía electrónica mostró la forma típica de barril para la partícula central 20S. El análisis SDS-PAGE bidimensional evidenció 14 subunidades proteicas entre 23 y 33 kDa, es decir

igual número de subunidades que otros proteosomas 20S (7 subunidades α y 7 subunidades β). El proteosoma 20S purificado no mostró actividad frente a los péptidos fluorogénicos habitualmente empleados como sustratos del 20S, los autores atribuyen esto a daño del 20S durante la purificación (Emmerlich et al, 1999).

Por otro lado Stephanic y colaboradores (2006) evaluaron el efecto de varios inhibidores del proteosoma sobre el proceso de enquistación y encontraron que diferentes concentraciones de inhibidores no generan cambios en el número de quistes producidos comparado con los controles. En este trabajo también se reporta que el proteosoma se localiza en las membranas del RE que contienen las CWPs en la fase temprana de la enquistación (2 horas post-estímulo), posteriormente co-localiza con las ESVs (*Encysting-Specific Vesicles*) completamente formadas (6 horas post-estímulo) y en la fase tardía del proceso de enquistación (14 horas post-estímulo), se pierde la asociación proteosoma-VSPs y el proteosoma se distribuye en el citoplasma, en un patrón similar al del estadio de trofozoíto.

Como es evidente, la información acerca del SUP en este protozoario es mínima y son necesarios estudios adicionales para realizar la caracterización bioquímica y fisiológica de este sistema durante el ciclo de vida de este interesante protozoario.

3. JUSTIFICACIÓN

La degradación intracelular de proteínas constituye un componente integral en la regulación de las funciones celulares tanto para procariotas como para eucariotas. Numerosos avances se han hecho desde el descubrimiento del sistema proteolítico no lisosomal y dependiente de ATP o Sistema Ubiquitina-Proteosoma (SUP), algunos componentes del sistema se han descrito en varios organismos eucariotas (Hershko y Ciechanover 1982; Vierstra et al, 1985; Orłowski 1990; Krebber et al, 1994; Wöstmann et al, 1996; González et al, 1999). El estudio de este sistema en parásitos protozoarios se ha realizado con dos propósitos principales, primero la búsqueda de un blanco terapéutico para enfermedades como la malaria (*Plasmodium falciparum*) y la amebiasis (*Entamoeba histolytica*) (Gantt et al, 1998; González et al, 1999); y segundo, como sistemas modelo para el estudio de la evolución de la degradación proteolítica no lisosomal (*Giardia intestinalis*) (Krebber et al, 1994, Emmerlich et al, 1999; Gallego et al, 2007).

Los parásitos protozoarios sufren eventos de diferenciación para adaptarse a sus hospedadores y a las diversas condiciones medio ambientales que pueden encontrar a lo largo de su ciclo de vida. Para el caso específico de *G. intestinalis*, un parásito protozoario que habita el intestino delgado de mamíferos superiores, se ha evidenciado que presenta dos procesos de diferenciación: la enquistación y la exquistación, los cuales están asociados a la expresión preferencial de determinados genes. Habrá síntesis y degradación de proteínas unas porque deben estar disponibles y funcionales y otras porque dejarán de funcionar y deben silenciarse. En los procesos de degradación específica y regulada de proteínas es muy probable que esté involucrado el SUP y existen algunas evidencias preliminares que así lo sugieren: 1) *G. intestinalis* posee dos tipos de genes que codifican para ubiquitina, el gen de ubiquitina y genes que codifican para ubiquitina unida a proteínas ribosomales (Krebber et al, 1994; Gallego et al, 2007; Catic et al, 2007). 2) Se han identificado parcialmente varios componentes de la vía de ubiquitinación por Gallego y colaboradores (2007); y recientemente, Castellanos (2009) han identificado por bioinformática genes homólogos a Enzimas activadoras (E1), 2 proteínas MoeB, 11 Enzimas conjugadoras (E2), 80 enzimas E3 y 12 genes DUBs. 3) Se ha identificado un sustrato ubiquitinado en *Giardia*, la Glucosamina-6-fosfato isomerasa, sin embargo, se desconoce el significado biológico de este hecho (Lopez et al, 2002). 4) El proteosoma 20S de *G. intestinalis* fue purificado por Emmerlich y colaboradores (1999) y este estudio evidenció la presencia de una partícula central con forma de barril, compuesta por 14 subunidades (7α y 7β), conformación típica del proteosoma eucariota. Sin

embargo, no existen datos que demuestren su actividad frente a los péptidos fluorogénicos habitualmente empleados como sustratos del 20S. 5) El genoma de *G. intestinalis* posee genes que codifican para subunidades de la partícula reguladora 19S o PA700, lo cual sugiere que este protozooario posee un proteosoma 26S (Emmerlich et al, 2001; Castellanos (2009) y 6) Recientemente, Stefanic y colaboradores (2006) establecieron la asociación del proteosoma 26S de *G. intestinalis* a las ESVs (*Encysting-Specific Vesicles*), en la fase temprana de este proceso de diferenciación. Además, reportaron la ausencia de efecto de varios inhibidores del proteosoma sobre el número de quistes producidos durante ensayos de enquistación. Reuniendo estos datos preliminares, es evidente la ausencia de información con respecto a la funcionalidad y participación del SUP durante los procesos de diferenciación de *G. intestinalis*, por lo cual, en este trabajo de tesis nos dedicamos a evaluar varios parámetros bioquímicos y funcionales del proceso de ubiquitinación y de la actividad del proteosoma durante el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación. Esta información enriquece la comprensión de los procesos de biosíntesis y degradación de proteínas intracelulares en este protozooario y constituye la base que direccionará posteriores investigaciones en este campo.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General*

Estudiar la funcionalidad de la vía de ubiquitinación de proteínas y el requerimiento de la actividad de proteólisis específica del proteosoma durante el ciclo de vida de *Giardia intestinalis*.

4.2. **Objetivos Específicos**

4.2.1. Estudiar los patrones de ubiquitinación de proteínas en los estadios de trofozoíto y quiste.

4.2.2. Estudiar los patrones de ubiquitinación de proteínas durante el proceso de enquistación de *G. intestinalis*.

4.2.3. Estudiar el efecto de la inhibición selectiva del proteosoma sobre los patrones de ubiquitinación y durante el proceso de enquistación de *G. intestinalis*.

4.2.4. Empleando los patrones de ubiquitinación, identificar alguna(s) proteína(s) blanco de ubiquitinación en *G. intestinalis*.

4.2.5. Evaluar el efecto de la inhibición de la enzima activadora de ubiquitina (E1) de *Giardia intestinalis* mediante el empleo de un inhibidor específico de la enzima.

4.2.6. Evaluación del efecto de inhibición selectiva de la actividad enzimática tripeptidil peptidasa, en el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación.

4.2.7. Evaluación del efecto de inhibición conjunta del proteosoma y la actividad tripeptidil peptidasa, en el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación de *Giardia intestinalis*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Cultivo de *Giardia intestinalis*

Los trofozoítos de *G. intestinalis* (WB, Clon C6) fueron cultivado en medio Diamond TYI-S-33 pH 7,0, suplementado con 10% de suero bovino (Gibco. Invitrogen Corp. NY) y 0,5 mg/mL de bilis bovina (Sigma, St Louis, MO) a 37 °C en tubos de bo rosilicato (BD Falcon, Biosciences, CA), los tubos se emplearon llenos para obtener una atmosfera anaeróbica y se mantuvieron con una inclinación de 45 grados. (Keister 1983). Para la enquistación *in vitro*, los trofozoítos fueron cultivados en medio TYI-S-33 pH 7,8 suplementado con 10 mg/mL de bilis bovina. (Kane et al, 1991). Además, los medios de cultivo fueron adicionados con 1.000 IU/mL de penicilina (Sigma, St Louis, MO) y 1.000 g/mL de estreptomocina (Sigma, St Louis, MO) y el pH se ajustó con una solución de NaOH 5 N antes de la esterilización por filtración con membranas de 0.45 µm de tamaño de poro. Se colectaron muestras en diferentes periodos de tiempo durante la enquistación: 0 horas (antes del estímulo), 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h post-estímulo. El número de quistes y eficiencia de enquistación se calcularon por recuento de células en un hemocitómetro.

5.2. Obtención de Extracto Proteico de *G. intestinalis* Para Purificación de Ubiquitina.

Para analizar la vía de ubiquitinación inicialmente se propuso el desarrollo y optimización de un sistema de detección y estudio de los productos ubiquitinados. Los instrumentos primarios para tal propósito son ubiquitina pura y un anticuerpo específico para conjugados ubiquitina-proteína. Por lo tanto inicialmente se realizó la purificación de la ubiquitina a partir de extractos proteicos de *Giardia intestinalis*, esta ubiquitina posteriormente fue empleada para la producción de un anticuerpo específico. El extracto se obtuvo a partir de cultivos a gran escala (5 L) de trofozoítos de la cepa de referencia WB clon C6 cultivados como se describió en el numeral 5.1. Las células de 3 días de cultivo, se colocaron en hielo por 15 minutos para desprender los parásitos adheridos a la superficie del tubo de cultivo, a continuación se centrifugaron a 900 g por 15 min. Para retirar el medio de cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ (Dibásico) y 14,7 mM KH₂PO₄ (Monobásico) pH 7,4] frío y estéril, al final de cada lavado se centrifugó 900 g por 15 min. Después del tercer lavado, las células se resuspendieron

en 1 mL de PBS y se realizó el conteo celular haciendo diluciones 1:1.000 en PBS. Los parásitos se contaron dos veces en un hemocitómetro y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. El número de células se calculó como: $N=C*f*10^4$, donde N, número de células en 1 mL; C, promedio de células y f, factor de dilución.

Se colectaron 10×10^9 trofozoítos de *G. intestinalis*, este *pellet* celular de ~ 20 mL fue tratado con 80 mL de *buffer* de extracción (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5% NP40, 10 mM β -mercaptoetanol, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA). Esta suspensión se mantuvo en agitación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora y posteriormente se centrifugaron a $35.000\text{ }g$ por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 500 μl de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma, St Louis, MO), la concentración final de inhibidores fue de 2 mM AEBSF (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 2,8 μM E64, 3 μM pepstatin A, 8 μM bestatin, 0,6 μM leupeptin, 4 μM aprotinin). La cuantificación del extracto se realizó por el método de Bradford (1976), obteniéndose una concentración de 9,38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.3. Electroforesis de Proteínas Empleando Geles Tricina-SDS-PAGE.

La electroforesis discontinua de proteínas con geles Tricina-SDS-PAGE (*Tricina-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis*) se utiliza para separar proteínas pequeñas de 1-100 kDa. La tricina (pK 8,15) es usada como el ión que permite la resolución de pequeñas proteínas a concentraciones de acrilamida más bajas ($\sim 12,5$) que las utilizadas en los sistemas Glicina-SDS-PAGE. Además, la tricina facilita la entrada de las proteínas de bajo peso molecular en el gel separador, debido a que migra mucho más rápido que la glicina en el gel concentrador. Con estos geles se obtiene una mayor resolución, especialmente para proteínas entre 5-20 kDa. Este sistema requiere de un *buffer* ánodo (20 mM Tris-HCl, pH 8,9) y un *buffer* cátodo (10 mM Tris-HCl, 10 mM tricina y 0,1% (w/v) SDS). En el *buffer* muestra 2X (0,1 M Tris-HCl, 24% (v/v) glicerol, 8% (w/v) SDS, 0,2 M DTT, 0,02% (w/v) azul de Coomassie G-250), se utiliza azul de coomassie como colorante en lugar de azul de bromofenol, porque este se mueve delante de los péptidos pequeños. Las corridas se realizaron a 30 V por 30 min. seguidas de 116 V por aproximadamente 2 h.

5.4. Purificación de Ubiquitina.

Se utilizó una modificación al método propuesto por Sparkman y colaboradores (1991). Brevemente, 100 mL de extracto proteico de trofozoítos fue calentado a 85 °C por 20 min. en agitación constante. Ubiquitina es una proteína termoestable y permaneció soluble en el sobrenadante, posteriormente se centrifugó a 30.000 g por 1 h. El sobrenadante fue precipitado con ácido perclórico a una concentración final de 5% (v/v), en agitación constante a 4 °C por 1 h, nuevamente se centrifugó a 30.000 g por 1h, se recuperó el sobrenadante, el cual fue concentrado mediante precipitación con TCA (ácido tricloroacético) en una concentración final de 10% (v/v), el precipitado se centrifugó como en el paso anterior, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 2 mL de agua desionizada estéril. El seguimiento del proceso de purificación se realizó mediante electroforesis vertical en gel tricina-dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE), como se describe en el numeral 5.3. Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) a 25 V toda la noche, en *buffer* de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 10% (v/v), pH 8,3). Para el ensayo de inmunodetección *western blot* se siguió el protocolo que se describe a continuación: a) Bloqueo de la membrana por 1 h con *buffer* TBST-L (*Tris-buffered saline*-Tween-Leche: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,1% tween 20; 5% (w/v) leche descremada). b) Incubación durante 1 hora con el anticuerpo primario anti-ubiquitina policlonal en conejo en TBST-L (1:2.000). c) Incubación por 1 una hora con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado de conejo (Invitrogen) en TBST-L (1:3.000). d) Incubación durante 30 min. con estreptavidina-fosfatasa alcalina (Promega) en TBST (1:3.000). Después de cada incubación se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min. con el respectivo *buffer* de incubación y ubiquitina fue detectada con los sustratos cromogénicos BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) y NBT (Nitroazul tetrazolium) (Promega, Madison, WI) para la fosfatasa alcalina en el *buffer* sustrato (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM).

Finalmente, a la ubiquitina parcialmente purificada se le realizó una extracción preparativa desde geles de poliácridamida siguiendo la metodología propuesta por Scheer y Ryan (2001). Brevemente, se realizaron electroforesis preparativas en condiciones denaturantes en geles Tricina-SDS-PAGE, sembrando 250 µL de muestra en *buffer* muestra 2X (0,1 M Tris-HCl, 24% (v/v) glicerol, 8% (w/v) SDS, 0,2 M DTT, 0,02% (w/v) azul de Coomassie G-250). Para visualizar la banda y la posición de la proteína se cortó un extremo del gel, que contenía ubiquitina patrón y parte de la muestra parcialmente purificada y se tiñó con tinción de azul de coomassie [0,025%

(w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 10% de ácido acético]. De acuerdo con el patrón electroforético se cortó la banda correspondiente, se trituró mediante el paso sucesivo por una jeringa de 2 cc y se realizó la extracción de la proteína con la menor cantidad de agua desionizada posible, manteniendo la muestra en agitación a 37 °C por 12 h. Finalmente, la pureza de la ubiquitina se verificó por Tricina-SDS-PAGE. La proteína fue visualizada usando tinción con plata con el kit Silver Stain Plus (BioRad. Hercules, CA) y se cuantificó por el método de Bradford (1976).

5.5. Producción de anticuerpos policlonales.

4.5.1. Preparación del antígeno: se produjeron dos anticuerpos uno empleando ubiquitina pura de *G. intestinalis* y otro empleando ubiquitina comercial de origen bovino (Sigma, St Louis, MO). El antígeno se preparó según el método propuesto por Hershko y colaboradores (1982). Ubiquitina es una proteína pequeña (8,5 kDa) y es necesario acoplarla a un inmunógeno más grande para lograr generar respuesta inmune, entonces ubiquitina fue conjugada a γ -globulina bovina empleando glutaraldehído al 3% y la ubiquitina comercial además fue denaturada con SDS. Brevemente, γ -globulina bovina (8 mg) y ubiquitina bovina o ubiquitina purificada de *G. intestinalis* (5 mg) se disolvieron en 600 μ L de *buffer* fosfato de potasio (0,1 M, pH 7,2). La conjugación de ubiquitina a γ -globulina bovina se realizó por la adición de 80 μ L de glutaraldehído al 3% (v/v) en alícuotas de 20 μ L con intervalos de 10 minutos y en agitación constante. La reacción procedió a temperatura ambiente por un periodo adicional de 90 min., después de la última adición de glutaraldehído. Las muestras se dializaron toda la noche contra 2 L de PBS pH 7,4 a 4 °C, empleando membranas de límite de exclusión 3.500 Da. La muestra de ubiquitina comercial conjugada fue ajustada a 2% de SDS y hervida por 10 min., con el fin de denaturarla. La ubiquitina de *G. intestinalis* fue denaturada en su paso final de purificación. La denaturación del antígeno es esencial para obtener un anticuerpo antiubiquitina con capacidad para reconocer conjugados ubiquitina-proteína (Hershko et al, 1982).

5.5.2. Esquema de inoculación con el antígeno: Los anticuerpos policlonales se generaron en conejas de raza New Zealand de dos meses de edad, las conejas fueron mantenidas y manipuladas bajo supervisión de un médico veterinario durante todo el proceso de inoculación, para garantizar el manejo ético de los animales. Cada animal fue inoculado por vía subcutánea con la correspondiente ubiquitina conjugada. Se siguió el esquema de inoculación

propuesto por Hershko y colaboradores (1982). Brevemente, el día cero se colectó 2 mL de sangre periférica de la oreja para tener suero preinmune. Posteriormente se inoculó una coneja por cada antígeno, se utilizaron 100 µg de ubiquitina en solución y emulsionada en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma, St Louis, MO). Se realizaron cuatro inoculaciones sucesivas con los correspondientes antígenos a los 15, 30, 45 y 60 días después de la primera inoculación. Para esto nuevamente se utilizaron 100 µg de ubiquitina en solución y emulsionada en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (Sigma, St Louis, MO). Entre cada inoculación se tomaron muestras de 2 mL de sangre periférica de la oreja de cada coneja con el propósito de obtener los correspondientes sueros. La sangre se coaguló y se recuperó el suero por centrifugación a 5.000 g por 10 min. (Harlow y Lane 1988).

5.5.3. Seguimiento de producción de anticuerpos: A partir de la segunda inoculación se evaluó la generación de anticuerpos contra ubiquitina empleando ensayos de *western blot*, se utilizaron como antígenos, ubiquitina pura de *G. intestinalis* y ubiquitina comercial de origen bovino. 75 días después de la inoculación inicial, las conejas fueron anestesiadas (xylazine 1 mg/kg y ketamina 35 mg/kg, por vía intramuscular) y se procedió a la exanguinación, la sangre del animal post-coagulación (4 h a 4 °C) fue centrifugada a 5.000 g durante 10 min. Se colectaron 20 mL de suero por coneja. El suero fue dividido en alícuotas y almacenado a – 80 °C en glicerol al 10% (v/v) para su conservación. El anticuerpo obtenido contra ubiquitina de *G. intestinalis* fue llamado Anti-UbGi y el anticuerpo contra ubiquitina comercial bovina, Anti-UbBo.

5.5.4. Inmunodetección de conjugados ubiquitina-proteína, ensayos western blot: Para la detección de ubiquitina y evaluación de los patrones de ubiquitinación de los diferentes estadios del parásito (trofozoítos y en proceso de enquistación), se emplearon extractos proteicos y parásitos completos y se estandarizaron las condiciones adecuadas para el ensayo de inmunodetección *western blot*. Entre estas se encuentran: título óptimo de los anticuerpos policlonales producidos y cantidad de extracto o parásitos adecuado para la detección específica de ubiquitina y/o proteínas ubiquitinadas. La dilución óptima de los anticuerpos se estableció con el límite de detección que presentaron frente a ubiquitina bovina comercial y en extractos proteicos del parásito. La metodología para la electroforesis y el ensayo de inmunodetección fue la misma descrita anteriormente (numeral 5.4.).

5.6. Inhibición de la Enzima Activadora de Ubiquitina E1.

La enzima activadora de ubiquitina, E1, constituye el primer paso en el proceso de ubiquitinación, de esta manera su inhibición selectiva afectará la funcionalidad del sistema ubiquitina proteosoma y permitirá evaluar de forma preliminar los efectos biológicos de la ausencia de ubiquitinación en las células tratadas. Existen numerosos reportes de aislamiento y síntesis de inhibidores de E1, algunos han sido probados en ensayos *in vitro* (Lei et al, 2003; Matsuzawa et al, 2006). Sin embargo, su capacidad de inhibición *in vivo* no ha sido demostrada. El primer y único inhibidor de E1 permeable en células eucariotas y disponible comercialmente es 4[4-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-3,5-dioxo-pyrazolidin-1-yl]- ácido benzoico etil éster. Este es un derivado pirazono llamado PYR-41 o UBEI-41 (Biogenova, Corp. USA). La concentración inhibitoria 50% (IC50%) para la formación de enlaces tio-éster en células eucariotas es de 5 μ M. Nosotros evaluamos el efecto de UBEI-41 sobre el crecimiento de trofozoítos. Se tomaron cultivos de trofozoítos en fase temprana de crecimiento logarítmico (con 24 h de establecimiento) y fueron incubados durante 48 h con dos concentraciones del inhibidor (20 μ M y 50 μ M). Se colectaron tubos de cultivo por duplicado a las 3 h y 24 h post-inhibición. Los parásitos fueron cosechados como se describe en el numeral 5.2. En cada punto se realizó conteo celular y la viabilidad de los parásitos fue evaluada mediante la observación del movimiento flagelar. Los resultados fueron analizados como porcentaje de inhibición del crecimiento de los parásitos tratados versus los controles, la fórmula empleada fue: Porcentaje de inhibición del crecimiento= [(Número de células control en el tiempo indicado–Número de células tratadas en el tiempo indicado)/Número de células control en el tiempo indicado]*100%. Además, en cada punto analizado se evaluó la morfología de los parásitos y se determinó el número de duplicación celular, mediante la siguiente fórmula: $\text{Log} [\text{Número de células en el tiempo final}/\text{Número de células en el tiempo inicial}] / \text{Log } 2$. Finalmente, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y *western blot* para evaluar el efecto sobre los patrones de ubiquitinación. Cada experimento fue realizado mínimo dos veces.

5.7. Inhibición del Proteosoma durante el estadio de trofozoíto.

Para analizar la funcionalidad del sistema ubiquitina-proteosoma en *Giardia intestinalis* se planteó el uso de inhibidores específicos del proteosoma, con el fin de evaluar la necesidad del sistema de degradación de proteínas mediado por esta enzima, durante el estadio de trofozoíto y posteriormente determinar los efectos sobre la acumulación de proteínas ubiquitinadas. Para

evaluar el efecto de varios inhibidores del proteosoma sobre el crecimiento de *G. intestinalis* se tomaron cultivos de trofozoítos en fase temprana de crecimiento logarítmico (con 24 h de establecimiento) y fueron incubados durante 48 h con diferentes concentraciones de cada inhibidor. Los inhibidores empleados y su concentración final en cultivo fueron: Clasto lactacistina β -lactona (Bostonbiochem, Cambridge, MA), 20 μ M y 50 μ M, lactacistina (Calbiochem, La Jolla, CA), 10 μ M, epoxomicina (Calbiochem, La Jolla, CA), 1 μ M y carbobenzoxyl-leucinylleucinylleucinal-H (MG132) (Calbiochem, La Jolla, CA), 50 μ M. Estos inhibidores fueron previamente diluidos en DMSO en soluciones base de 1 a 10 mM. En cada ensayo se incluyeron controles negativos tratados con DMSO. Se colectaron por triplicado tubos de cultivo de trofozoítos a las 6 h, 24 h y 48 h post-inhibición, estos fueron colectados como se describió en 5.2. Las células se resuspendieron en 1 mL de PBS y se realizó el conteo celular en un hemocitómetro con diluciones 1:100 en PBS. La viabilidad de los parásitos, el porcentaje de inhibición del crecimiento y número de duplicaciones se calcularon como en 5.6. Cada experimento fue realizado mínimo dos veces.

5.8. Inhibición del Proteosoma durante el proceso de enquistación.

Para los ensayos de inhibición del proteosoma durante el proceso de enquistación, se cultivaron trofozoítos hasta alcanzar una confluencia superior al 70% en los tubos de cultivo (72 h), entonces el medio de cultivo fue remplazado por el medio de enquistación: TYI-S-33 pH 7,8, suplementado con 10% de suero bovino y 10 mg/mL de bilis bovina. Inmediatamente se adicionaron los inhibidores del proteosoma: clasto lactacistina β -lactona 50 μ M, MG132 50 μ M, epoxomicina 1 μ M y DMSO para los controles negativos y se incubaron a 37 °C por 24 h, en este momento se realizó cambio de medio de cultivo por el tradicional TYI-S-33 pH 7,0 y se incubaron nuevamente a 37 °C por 24 h más. Entonces se colectaron tres o cuatro tubos de cultivo por cada ensayo y se prepararon de la misma forma descrita en 5.2. Se determinó el número de trofozoítos y el número de quistes. A continuación se realizó la lisis hipotónica incubando las células con agua destilada por 24 h a 4 °C, para destruir los trofozoítos que no enquistaron y se procedió a la colección y conteo de quistes. El porcentaje de enquistación se calculó así: $(\text{Número de quistes obtenidos} \times 100\%) / (\text{Número inicial de células inducidas a enquistar})$. Se evaluó la viabilidad de los quistes obtenidos luego del tratamiento con MG132 50 μ M, empleando tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), este compuesto es hidrolizado por proteasas que son activas únicamente en los quistes viables. La metodología utilizada fue una modificación del método descrito por Smith y Smith (1989). Brevemente, se preparó una solución

base de FDA (10 mg/mL) en acetona y se almacenó a 4 °C en oscuridad. A partir de la solución base e inmediatamente antes de cada uso se preparó una dilución 1:500 de FDA en PBS y esta se llamó, solución de trabajo. Posteriormente, 400.000 quistes de *G. intestinalis* producidos como se describió previamente fueron incubados por 10 min. en oscuridad y a temperatura ambiente con 10 µL de la solución de trabajo. Luego se adicionó 1 mL de PBS y la muestra se centrifugó a 900 g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* fue diluido en 50 µL de PBS, se tomaron 10 µL de esta solución y se observaron por microscopia de fluorescencia con un filtro de 450--490 nm en un microscopio Zeiss Axiophot Carl (Oberkochen, Germany) empleando un hemocitómetro para calcular el número de quistes viables. Todos los experimentos se realizaron mínimo dos veces y en cada uno se incluyeron triplicados.

5.9. Evaluación de los Patrones de Ubiquitinación Después de la Inhibición del Proteosoma.

Trofozoítos de *G. intestinalis* de cultivos con 24 h de establecimiento fueron incubados con tres inhibidores del proteosoma: epoxomicina 1 µM, MG132 50 µM y lactacistina 10 µM, se colectaron tres tubos de cultivo por cada inhibidor 1 h, 3 h y 6 h post inhibición para el posterior análisis de conjugados ubiquitina-proteína empleando SDS-PAGE y *western blot*. Por cada punto analizado se incluyeron controles incubados con DMSO. Para la colección de los parásitos, los tubos de cultivo fueron colocados en hielo por 15 min. para desprender las células adheridas a la superficie, a continuación se centrifugaron a 900 g por 15 min. Para retirar el medio de cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS frío y estéril, al final de cada lavado se centrifugó 900 g por 15 min. Después del tercer lavado, las células se resuspendieron en 250 µL de PBS y se realizó el conteo celular en un hemocitómetro con diluciones 1:10 en PBS, luego del recuento se normalizó la concentración celular de cada muestra a 50.000 células/µL, mediante la dilución en *buffer* muestra SDS 1X (15 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,05% (w/v) SDS, 0,002%(w/v) azul de bromofenol y 0,5% (v/v) glicerol, 89 mM β-mercaptoetanol), posteriormente las muestras fueron calentadas a 95 °C por 5 min. Para las electroforesis SDS-PAGE se utilizaron un gel concentrador de 3%T y 2,6%C y un gel separador de 15%T y 2,6%C. Se mantuvo una diferencia de potencial de 130 V y se visualizaron las bandas por tinción con solución de Coomassie (0,05% Coomassie brilliant blue 250, 25% (v/v) isopropanol, 11% (v/v) ácido acético). Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a la técnica descrita por Mimnaugh y Neckers (2005). Brevemente, la membrana de nitrocelulosa fue hidratada en buffer de transferencia 1X (25

mM Tris-HCl, pH 8,8, 192 mM glicina y 20% (v/v) metanol) por 1 h. Esta hidratación previa ayuda a maximizar la eficiencia de unión de las proteínas poliubiquitinadas a la membrana. La electrotransferencia se realizó en buffer de transferencia 1X a 25 V y en cuarto frío a 4 °C durante toda la noche. La eficiencia de este proceso también fue muy buena con transferencias a 100 V, 4 °C por 1 h. Posteriormente se realizó el bloqueo de la membrana incubándola toda la noche y a 4 °C con el *buffer* TBS-Tween-20 (TBS-T) (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) con 5% de leche descremada (Bio-Rad, Hercules, CA). El anticuerpo anti-Ubiquitina de *G. intestinalis* (Anti-UbGi) se usó como anticuerpo primario en una dilución 1:1.000 en TBS-T y se incubó durante 1 h con la membrana. Después de tres lavados con la solución de bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Fc) conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Promega, Madison WI) en una dilución 1:2.000 en TBS-T por 1 h. Luego de tres lavados con TBS-T, las membranas fueron reveladas usando el sustrato NBT/BCIP (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Todos los experimentos se realizaron dos veces con triplicados por cada punto analizado.

5.10. Identificación de Proteínas Blanco de Ubiquitinación.

Para la identificación de proteínas blanco de ubiquitinación en *G. intestinalis*, inicialmente se prepararon extractos de proteína de trofozoítos previamente inhibidos con MG132 50 µM como se describió en el numeral 5.7, el tiempo de inhibición para este experimento fue de 12 h. Los extractos se prepararon por el uso de ultrasonido en *buffer* A (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol y 10% glicerol, metodología que se describirá en el numeral 5.11). Con estos extractos inhibidos se buscaba acumular los conjugados ubiquitina-proteína para facilitar su purificación. Entonces, se realizaron ensayos de inmunoafinidad en *batch* empleando el anticuerpo Anti-UbGi. Brevemente, 100 µL de proteína A-agarosa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) fue diluida en 1 mL de PBS pH 7,4 y se centrifugó a 5.000 g por 5 minutos, posteriormente la proteína A-agarosa fue equilibrada en el *buffer* A y 50 µL de esta proteína se emplearon para acoplar con 10 µL de Anti-UbGi y los 50 µL restantes fueron acoplados a 10 µL de suero preinmune, este proceso se realizó a 4 °C en agitación constante por 4 h. Antes de cada inmunoprecipitación los lisados celulares fueron limpiados a través de incubación con proteína A-agarosa sin conjugar en agitación constante por 30 min a 4 °C. A los extractos obtenidos de este procedimiento se les realizaron tres veces lavados durante 10 min con *buffer* A y se procedió a realizar la inmunoprecipitación así: 50 µL de la proteína A-agarosa acoplada con Anti-UbGi fueron

incubados en agitación constante a 4 °C por 12 h con 300 µL de extracto proteico inhibido. Como controles se incluyeron en paralelo proteína A-agarosa acoplada con suero preimmune y proteína A-agarosa no acoplada con anticuerpo. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 min con *buffer* A y el material conjugado a la proteína A-agarosa fue eluido con 50 µL de *buffer* muestra SDS 1X (15mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,05% (w/v) SDS, 0,002%(w/v) azul de bromofenol y 0,5% (v/v) glicerol, 89 mM β-mercaptoetanol), luego las muestras fueron calentadas a 95 °C por 10 min. y el sobrenadante fue separado y evaluado mediante geles SDS-PAGE con un gel concentrador de 3%T y 2,6%C y un gel separador de 8%T y 2,6%C. Se mantuvo una diferencia de potencial de 130 V y se visualizaron las bandas por tinción con plata usando en kit Silver Stain Plus (BioRad. Hercules, CA). Los ensayos de *western blot* se realizaron con el anticuerpo Anti-UbGi como se describió en 5.9.

La segunda aproximación metodológica empleada fue sobre parásitos completos. Cultivos de trofozoítos con 24 h de establecimiento fueron tratados con inhibidores del proteosoma toda la noche (12h) para enriquecer el *pool* de conjugados ubiquitina-proteína y entonces los parásitos fueron colectados como en 5.2 y su concentración ajustada a 50.000 células/µL en *buffer* muestra 1X (15 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,05% (w/v) SDS, 0,002%(w/v) azul de bromofenol y 0,5% (v/v) glicerol, 89 mM β-mercaptoetanol) y son evaluados por SDS-PAGE (geles de 8%T, 2.6%C, para resolver la región de alto peso molecular) y *western blot* (protocolo descrito en 5.9.). A partir de los patrones de ubiquitinación se identificaron proteínas reconocidas por el anticuerpo antiubiquitina específico. Se cortó una banda muy evidente entre 45 kDa y 66 kDa y fue remitida al Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba en España (colaboración de la Profesora Eva Amanda Gallego), para identificación mediante espectrometría de masas, la técnica utilizada fue MS+MS/MS.

5.11. Obtención de Extractos Proteicos de G. intestinalis Para Evaluación de la Actividad Peptidasa y Purificación del Proteosoma.

Se realizaron cultivos a gran escala de trofozoítos de *G. intestinalis* (5—10 L), el método de cultivo y colección de los parásitos fue el mismo descrito en los numerales 5.1 y 5.2. Para la obtención del extracto proteico apto para la evaluación de la actividad peptidasa del proteosoma y su posterior purificación se ensayaron varias metodologías y se probaron diferentes clases de *buffers*. Finalmente se obtuvo un protocolo que permitió realizar los ensayos de actividad *in vitro* y

purificar sin inconvenientes el proteosoma 20S de *G. intestinalis*. Los *pellets* de células colectadas fueron resuspendidos en tres volúmenes de *buffer A* (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol y 10% glicerol). Entonces las células son lisadas mediante tratamientos con ultrasonido, empleando un sonicador Branson (Danbury, CT, USA), las condiciones de sonicado fueron: 100 W, 20 kHz a 4 °C durante 10 periodos de 5 a 10 segundos, con periodos de descanso de 1 min. Después de cada tratamiento se realizó observación microscópica de las células, realizando tratamientos hasta que los parásitos fueron completamente desintegrados. Posteriormente, el lisado celular fue centrifugado a 35.000 g por 15 min. a 4 °C y los sobrenadantes fueron colectados. Una alícuota fresca de cada extracto obtenido fue empleada para ensayos de actividad y el restante fue almacenado a – 80 °C hasta su uso. Se produjeron al menos dos extractos independientes para cada experimento. La concentración de proteína fue estimada por el método de Bradford (1976) empleando albumina sérica bovina como estándar.

5.12. Electroforesis de Proteínas Empleando Geles Glicina-SDS-PAGE.

Muestras de extractos proteicos de las diferentes fases del proceso de purificación del proteosoma fueron analizadas por SDS-PAGE de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970) empleando un sistema discontinuo con un gel concentrador 4%T y 2,6%C (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,2% y un gel separador de 12,5%T y 2,6%C (Tris-HCl 0,35M, SDS 0,01% pH 8,8, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,03%) en un buffer de electroforesis (25 mM Tris-base, 192 mM glicina y 0,1% (w/v) SDS). El proteosoma 20S purificado de bovino (m52 20S, purificado en el laboratorio del Dr. George DeMartino) fue incluido como control positivo. Las proteínas fueron visualizadas con tinción con plata empleando el kit silver stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5.13. Ensayos de Actividad Enzimática.

Desde 1983 cuando el proteosoma 20S fue descubierto por Wilk y Orłowski, los sustratos a base de péptidos fluorogénicos han sido empleados para medir la actividad del proteosoma y representan una herramienta sencilla y muy sensible para monitorear la actividad del proteosoma en extractos proteicos durante procesos de purificación o ensayos de inhibición (Kisselev y Goldberg 2005). Estos sustratos son péptidos que constan de tres o cuatro residuos de

aminoácidos con un grupo reportero fluorogénico en su extremo carboxilo terminal. Así el proteosoma cliva un enlace amida entre un aminoácido y el grupo reportero, resultando en la liberación de un producto altamente fluorescente. En este trabajo se utilizaron los sustratos fluorogénicos Suc-LLVY-AMC (Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin) y Z-LLE-AMC (Z-Leu-Leu-Glu-7-amino-4-methylcoumarin) ambos de Bachem (King of Prussia, PA). Para cuantificar la actividad similar a quimotripsina (*chymotrypsin-like activity*-CTL) y la actividad similar a caspasa (*caspase-like activity*-CL), respectivamente (Rodgers y Dean 2003). Los extractos proteicos de *G. intestinalis* y las fracciones del proceso de purificación del proteosoma fueron analizadas en un *buffer* de reacción A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM β -mercaptoethanol) con 50 μ M de cada uno de los sustratos fluorogénicos preincubados a 37 °C. Las soluciones base de los sustratos fluorogénicos se prepararon en DMSO a una concentración de 100 mM y permanecieron almacenadas a - 20 °C en oscuridad y en pequeñas alícuotas hasta su uso. Los ensayos de actividad se realizaron en placas oscuras de 96 pozos con un volumen final de reacción de 200 μ L. El clivaje de los péptidos sustratos fue monitoreado continuamente usando un lector de fluorescencia para microplacas FL600 (BioTek Instruments, Winooski, VT), este equipo permitió cuantificar la fluorescencia producida por la actividad proteolítica del proteosoma presente en cada muestra. Los ensayos se programaron por un periodo de 21 min. a 37 °C y la fluorescencia del AMC liberado fue medida usando una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm. La velocidad de clivaje del sustrato o velocidad de liberación de AMC fluorescente fue monitoreada una vez por minuto y los resultados analizados con un software cinético (KC4). La actividad se expresó como unidades fluorescentes arbitrarias producidas por minuto. Se toma como punto de partida la pendiente de la curva de reacción obtenida durante el periodo de 21 min. Para los ensayos en los que se incluyeron inhibidores del proteosoma, el porcentaje de inhibición se definió como el porcentaje en el que se redujo la tasa de hidrólisis del sustrato en presencia del inhibidor. Todas las muestras fueron evaluadas como mínimo con duplicado y además en cada ensayo se incluyeron, un control positivo con proteosoma 20S (m52 20S) y un blanco con el *buffer* de reacción.

5.14. Fraccionamiento de Extractos de Proteína y Evaluación de la Actividad del Proteosoma en el Estadio de Trofozoíto y Durante el Proceso de Enquistación.

Se prepararon extractos de proteína de trofozoítos como se describió en 5.11. y fueron analizados para la presencia de actividad CTL y CL. Además estos extractos fueron fraccionados por centrifugación en gradientes de densidad empleando un gradiente lineal de glicerol del 10 al 40% (Las soluciones empleadas fueron: 10,0%; 12,5%; 15,0%; 17,5%; 20,0%; 22,5%; 25,0%; 27,5%; 30,0%; 32,5%; 35,0%; 37,5%; 40,0%). Los gradientes se prepararon en *buffer* A (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoethanol y glicerol según el gradiente), se utilizaron tubos de 2 mL (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Se separaron 150 µL de cada muestra con duplicado y se realizó centrifugación a 100.000 g por 3 h en una ultracentrífuga Beckman Optima TL usando un rotor TLS55 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Se colectaron fracciones de 100 µL de la superficie al fondo, las cuales fueron analizadas para actividad proteosomal como se describió en 5.13.

Se realizó un ensayo de enquistación a gran escala (5 L de cultivo). La enquistación fue inducida como se describió en 5.1 y se tomaron muestras a diferentes tiempos post-inducción: 6 h, 12 h, 24 h y 48 h. Se prepararon extractos de proteínas de cada punto como se describió en 5.11. Estos extractos crudos fueron evaluados para actividad CTL y actividad CL como se describió en 5.13 y para normalizar las condiciones del ensayo las muestras fueron ajustadas por concentración de proteína a 20 µg de proteína total por punto. Además, se fraccionaron los extractos de proteína correspondientes a 0 h y 24 h, siguiendo el protocolo de centrifugación en gradientes de glicerol descrito previamente. Este procedimiento completo fue repetido y dentro de cada experimento se analizó cada muestra mínimo por duplicado.

5.15. Ensayos de Actividad en Gel (Overlay assays).

El ensayo de actividad en gel es menos sensible que el ensayo en placa con lector fluorescente. Los geles nativos han sido usados para analizar la composición ensamblaje, actividad y características de unión del proteosoma (Elsasser et al, 2005). Esta metodología constituye una muy buena alternativa que puede emplearse cuando se carece de un lector de placas. En este

trabajo se seleccionaron algunas fracciones del proceso de purificación del 20S proteosoma y fueron separadas en un gel continuo no denaturante del 4% de poliacrilamida en *buffer* B (90 mM Tris-borato pH 8,3, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol). El *buffer* de electroforesis fue el *buffer* Tris-borato pH 8,3 (90 mM Tris-base y 80 mM ácido bórico) y la corrida se realizó a 70 V por periodos de 2 a 4 h a 4 °C, según la muestra a evaluar. Posteriormente los geles fueron incubados por 20 min. a 37 °C en oscuridad con 15 mL de una solución que contenía 50 μM del sustrato fluorogénico (Suc-LLVY-AMC o Z-LLE-AMC) en el *buffer* de reacción A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM β-mercaptoetanol). Para algunos experimentos en los que se evaluó la actividad tripeptidil peptidasa de extractos proteicos crudos o fracciones seleccionadas, se usó el sustrato AAF-AMC (H-Ala-Ala-Phe-7-amino-4-methylcoumarin) (Bachem. King of Prussia, PA) en una concentración 100 μM en diferentes *buffers* de reacción: *buffer* de reacción A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM β-mercaptoetanol), *buffer* de reacción B (50 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mM MgCl₂), *buffer* de reacción C (15 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM MgCl₂) y *buffer* de reacción D (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM β-mercaptoetanol, 2 mM ATP). Los periodos de incubación fueron de 30 min. a 37 °C en oscuridad. El Proteosoma 20S de bovino (m52 20S) fue incluido como control positivo. Las bandas con actividad fueron visualizadas y fotografiadas empleando un transiluminador UV (360 nm) (Gel Doc XR, Bio-Rad, Hercules, CA). Finalmente, algunos geles fueron lavados con agua destilada desionizada por 20 min. y las proteínas visualizadas usando tinción con plata con el kit Silver stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5.16. Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa in vivo e in vitro.

Luego de experimentos preliminares con los extractos proteicos de *G. intestinalis* se observó la presencia de una actividad peptidasa con características de sedimentación e inhibición diferentes al proteosoma 20S y con algunos patrones que permiten relacionarla con la enzima tripeptidil peptidasa, por lo que se realizaron algunos experimentos para determinar de forma preliminar la posible presencia de este tipo de enzima en este protozoario. Primero, para evaluar el efecto de la inhibición de la actividad tripeptidil peptidasa sobre el crecimiento de *G. intestinalis*, se usó el inhibidor H-Ala-Ala-Phe-CH₂Cl (H-Ala-Ala-Phe-chloromethylketone.TFA) (Bachem. King of Prussia, PA). Se tomaron cultivos de trofozoítos en fase temprana de crecimiento logarítmico (24 h de establecimiento) y fueron incubados durante 24 h con diferentes concentraciones del inhibidor: 10 μM, 20 μM y 50 μM. Se partió de una solución base de 100 mM de H-Ala-Ala-Phe-CH₂Cl en DMSO. En cada experimento se incluyeron controles negativos incubados con DMSO. Se tomaron

muestras por duplicado de tubos de cultivo de trofozoítos a las 3 h y 24 h post inhibición y los parásitos fueron colectados, contados y sus características de viabilidad, morfología y número de duplicaciones fueron evaluadas como se describió en 5.7. Cada experimento fue realizado mínimo dos veces.

Para los ensayos de inhibición de la actividad tripeptidil peptidasa durante el proceso de enquistación, se indujo la enquistación como se describió en 5.8. Junto con el medio de enquistación se adicionó el inhibidor H-Ala-Ala-Phe-CH₂Cl (AAF₂CMK) para alcanzar una concentración final de 50 μ M, se incluyeron en paralelo controles negativos adicionados con DMSO y los parásitos inducidos se incubaron a 37 $^{\circ}$ C for 24 h, tiempo en el cual se realizó cambio de medio de cultivo por el medio fresco TYI-S-33 pH 7,0 y se continuó con un periodo de incubación a 37 $^{\circ}$ C por 24 h más. Se colectaron dos tubos de cultivo en diferentes tiempos durante la enquistación: 0 h, 3 h, 6 h, 12h, 24 h y 48 h. En cada punto se determinó el número de trofozoítos, el número de quistes y se conservaron muestras para SDS-PAGE. A las muestras del punto final 48 h se les realizó lisis hipotónica incubando las células con agua destilada por 24 h a 4 $^{\circ}$ C, para destruir los trofozoítos que no enquistaron y se procedió a la colección, conteo de quistes y evaluación de viabilidad como se describió previamente en 5.8. Todos los experimentos se realizaron mínimo dos veces.

La inhibición de la actividad tripeptidil peptidasa *in vitro* se hizo sobre extractos proteicos, empleando geles nativos y los ensayos de actividad sobre estos. Se ensayó una concentración final del sustrato AAF-AMC de 100 μ M y una concentración final del inhibidor H-Ala-Ala-Phe-CH₂Cl de 50 μ M para cada experimento. Las muestras de extractos proteicos del proceso de enquistación fueron ajustadas por concentración de proteína a 50 μ g de proteína total por punto evaluado y las muestras de extractos de proteína de trofozoítos se ajustaron a 20 μ g de proteína total. Los extractos proteicos fueron incubados a 37 $^{\circ}$ C por 30 min. con el inhibidor y luego se procedió a realizar la electroforesis nativa y el ensayo de actividad sobre gel. Se incluyeron controles sin adición del inhibidor y el proteosoma 20S de bovino (m52 20S) con y sin inhibición con MG132 50 μ M. Las bandas con actividad fueron visualizadas y fotografiadas empleando un transiluminador UV (360 nm) (Gel Doc XR, Bio-Rad, Hercules, CA).

5.17. Inhibición Conjunta del Proteosoma y de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en Cultivo de Trofozoítos y en la Enquistación.

Siguiendo la metodología descrita en 5.16. se realizó la evaluación del efecto de inhibición conjunta del proteosoma y la actividad tripeptidil peptidasa sobre cultivo de trofozoítos y en la eficiencia en la enquistación. Los inhibidores del proteosoma ensayados fueron epoxomicina 1 μM y MG132 50 μM y el inhibidor de tripeptidil peptidasa fue, H-Ala-Ala-Phe-CH₂Cl 50 μM . Así los cultivos fueron incubados con un inhibidor del proteosoma y el inhibidor de la tripeptidil peptidasa y los efectos sobre viabilidad, morfología y crecimiento evaluados. Cada experimento fue realizado dos veces, incluyendo duplicados cada vez. Los controles negativos fueron adicionados con DMSO.

5.18. Purificación Parcial del Proteosoma de *G. intestinalis*.

A partir de extractos proteicos de ~ 20 mL cada uno, obtenidos como se describió en 5.11. se purificó parcialmente el proteosoma 20S de *G. intestinalis* siguiendo este protocolo:

Primero, el extracto de proteína fue fraccionado por medio de precipitación con sulfato de amonio con un porcentaje de saturación del 40% (w/v), la precipitación se realizó por 1 h a 4 °C y la muestra fue separada en *pellet* y sobrenadante mediante centrifugación a 45.000 g por 30 min, a 4 °C. Las dos fracciones fueron analizadas para concentración de proteína y actividad CTL y CL con y sin epoxomicina 1 μM . La fracción que mostró mayor actividad específica de proteosoma fue el *pellet*. El *pellet* fue disuelto en 5 mL de buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β -mercaptoetanol y 10% glicerol) y dializado contra 6 L de buffer A, con dos cambios de buffer de 2 L cada hora y finalmente 2 L toda la noche, en cuarto frío a 4 °C.

Segundo, el *pellet* dializado (6 mL) fue fraccionado mediante centrifugación en un gradiente continuo de glicerol del 12,5 al 38%, las soluciones del gradiente se prepararon en buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β -mercaptoetanol y glicerol según el gradiente, dos soluciones 12,5% y 38%) se emplearon tubos de 40 mL (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), el gradiente lineal fue preparado empleando un mezclador de gradientes de 100 mL (Sigma, Aldrich, CA). Por tubo se fraccionaron 2 mL del *pellet*. Después de centrifugar a

100.000 g por 17 h a 4 °C, el gradiente fue eluido de la superficie al fondo, obteniendo 38 fracciones de 1 mL. Las fracciones fueron analizadas para concentración de proteína, SDS-PAGE y actividad CTL y CL. Las fracciones activas fueron incubadas con epoxomicina 1µM y su actividad peptidasa evaluada. Todos los experimentos se realizaron a 4 °C. Las fracciones con características de actividad, inhibición y perfil electroforético que corresponden con el proteosoma fueron colectadas en una sola muestra.

Tercero, la muestra con actividad y características de proteosoma (fracciones 12—21 para el primer experimento y fracciones 13—29 para el segundo experimento, ~ 50 mL volumen total cada vez) fue separada empleando una cromatografía de intercambio iónico, con el gel DEAE Affi-Gel Blue (Bio-Rad, Hercules, CA). La columna fue empacada con una dimensión de 10 cm de alto * 2,5 cm de ancho, lavada con 500 mL de agua destilada desionizada y equilibrada con 500 mL del *buffer* de equilibrio (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,1mM ATP y 20 mM NaCl). Se mantuvo un volumen de cabeza de 10 mL con el *buffer* de equilibrio y posteriormente se adicionó la muestra, se programó su paso a través de la columna a una velocidad de 18 gotas/mL, la solución no unida se colectó en *batch* en un solo tubo. Luego se inició el lavado con 500 mL de *buffer* de equilibrio, se colectaron de 16-20 fracciones de 5 mL del lavado, el restante fue descartado basado en el seguimiento de concentración de proteína por el método de Bradford. La elusión de las proteínas unidas se hizo mediante un gradiente de NaCl (20—400 mM) preparado en el *buffer* de elusión (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,1mM ATP), para generar un gradiente lineal se utilizó un mezclador de gradientes (Gradient mixer GM-1, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upps, SW). Las condiciones de la cromatografía fueron: volumen total 300 mL (150 mL de cada solución del gradiente de NaCl), 18 gotas/mL, fracciones de 5 mL (90 gotas), 3—5 segundos/gota, colección en tubos de vidrio de 16 mL, en cuarto frío a 4 °C. Cada fracción colectada fue analizada para concentración de proteína, SDS-PAGE y actividad peptidasa. Las fracciones activas y con características electroforéticas de proteosoma 20S (fracciones 29—40, primer experimento y fracciones 31—43, segundo experimento) fueron mezcladas y dializadas toda la noche contra 8 L de una solución de *buffer* B (6,5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol y 5 mM KPO₄), se realizaron 4 cambios de *buffer* B cada cambio con 2 L.

Cuarto, La muestra del paso anterior dializada (~ 50 mL, volumen total) fue adicionalmente separada empleando una columna de hidroxapatita (HAP) (Calbiochem, San Diego, CA), se

empacó 1 g. con una dimensión de 5 cm de alto * 1 cm de ancho, la columna fue lavada con 200 mL de agua destilada desionizada, equilibrada con 200 mL de buffer B (6,5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol y 5 mM KPO₄), se dejó un volumen de cabeza de 1 mL con el *buffer* B y posteriormente se adicionó la muestra, se programó su paso a través de la columna a una velocidad de 10 gotas/mL, la solución no unida se colectó en *batch* en un solo tubo y se procedió al lavado con 200 mL de buffer B, se colectaron de 20—23 fracciones 1,5 mL, las demás fueron descartadas, con base en el contenido de proteína. La elusión de las proteínas unidas se hizo mediante un gradiente de KPO₄ (5—200 mM) preparado en el *buffer* B. Para generar el gradiente lineal se utilizó un mezclador de gradientes (Gradient mixer 100mL, Sigma-Aldrich, CA). Las condiciones de la cromatografía fueron: volumen total 100 mL (50 mL de cada solución del gradiente de KPO₄), 18 gotas/mL, fracciones de 1,5 mL (27 gotas), 5 segundos/gota, colección en tubos de vidrio de 16 mL, en cuarto frío a 4 °C. Cada fracción colectada fue analizada para concentración de proteína, SDS-PAGE y actividad peptidasa. Se identificaron las fracciones activas con perfil electroforético de 20S proteosoma (fracciones 8—10, primer experimento y fracciones 3—7, segundo experimento), se mezclaron y esta solución fue dializada contra 6 L de buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol) se realizaron 3 cambios de buffer cada uno con 2 L.

Quinto, la muestra del paso anterior contenía el 20S de *G. intestinalis* parcialmente puro (8 mL, volumen total) y se procedió a concentrarla usando una columna de Fractogel® DEAE (Merk, Whitehouse Station, N.J.). Se empacó una columna muy pequeña de 1 cm de alto*0,5 cm de ancho, la columna se lavó con 50 mL de agua destilada desionizada y se equilibró con 50 mL de *buffer* A (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol). Se adicionó la muestra que contenía el proteosoma de *G. intestinalis* y se permitió un paso lento (~ 3 gotas/min), la solución no unida fue colectada en *batch* y luego se lavó con 50 mL de buffer A, el lavado fue colectado en fracciones de 5 mL (~ 10). Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas en un solo paso con la adición 5 mL de una solución 400 mM NaCl en buffer A. Se colectaron fracciones de 150 μL y se analizaron para contenido de proteína, SDS-PAGE, electroforesis sobre gel nativo y actividad peptidasa.

El proceso de purificación completo se realizó dos veces, los ensayos de inhibición se hicieron por duplicado y siempre se incluyeron controles negativos y controles positivos con 20S proteosoma de bovino (m52 20S) en cada experimento.