



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The use of activity based protein profiling to study proteasome biology

Paniagua Soriano, Guillem

Citation

Paniagua Soriano, G. (2016, February 11). *The use of activity based protein profiling to study proteasome biology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/37766>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/37766>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37766> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Paniagua Soriano, Guillem

Title: The use of activity based protein profiling to study proteasome biology

Issue Date: 2016-02-11

Resumen

El trabajo descrito en esta tesis se centra en la caracterización de sondas, conocidas como activity-based probes (ABPs), dirigidas hacia el proteasoma y también en los mecanismos de adaptación de líneas celulares derivadas de mieloma múltiple resistentes a la inhibición del proteasoma. El capítulo 1 es una introducción general al sistema ubiquitino proteosómico (UPS) y a las técnicas utilizadas para su estudio. El UPS es la principal ruta intracelular de degradación de proteínas en células eucarióticas. En esta ruta, la ubiquitina marca las proteínas para ser destruidas por el proteasoma, el aparato degradatorio del sistema. La inhibición parcial del proteasoma ha sido aprobada como tratamiento contra dos tipos de cáncer sanguíneos (mieloma múltiple y linfoma de células de manto) pero en la mayoría de los casos los pacientes recaen y se vuelven insensibles a regímenes de inhibición del proteosoma.

El capítulo 2 presenta una revisión literaria que profundiza en el estudio del UPS, su inhibición y la relación que mantiene con la homeostasis redox celular. Los inhibidores del proteasoma (PIs) son usados en medicina para el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas. Éstos inducen estrés de retículo endoplásmico así como estrés redox, disrupción de rutas de señalización, disfunción mitocondrial y finalmente muerte celular o apoptosis. Los PIs designados como candidatos clínicos incluyen derivados de productos naturales así como compuestos desarrollados por diseño racional, lo cual constituye una gran variedad de elementos estructurales. En los últimos años se ha aumentado el conocimiento de los mecanismos moleculares en la apoptosis inducida por PIs, pero aún existen paradojas y controversia en la literatura científica. En este capítulo los avances e incertidumbres en la inducción de apoptosis, con especial interés en su desarrollo en el tiempo, serán discutidos. Se presentarán algunos posibles mecanismos en el desarrollo de resistencia contra PIs y se especulará sobre la diferencia de sensibilidad contra este tratamiento entre células o tipos de cáncer.

La primera parte del capítulo 3 describe diferentes estrategias bio-ortogonales para marcar el proteasoma haciendo uso de two-step activity-based protein profiling (ABPP). El grupo indicador puede alterar las características de la sonda por lo que su sustitución por un compuesto bio-ortogonal permite realizar la unión de la sonda con la enzima primero y posteriormente la incorporación del grupo indicador en una segunda reacción. Compuestos bio-ortogonales son pequeñas entidades químicas inertes en medios biológicos complejos. Las reacciones bio-ortogonales pueden ser llevadas a cabo tanto *in situ* como *in vitro*, de hecho algunas de ellas pueden ser ejecutadas simultáneamente. La

segunda parte del capítulo 3 engloba un estudio técnico sobre la capacidad de las sondas (ABP) de marcar completamente todos los proteasomas activos en líneas celulares humanas y de ratones tanto *in vitro* como *in situ*. Las condiciones óptimas de incubación de las sondas obtenidas son 0.5 μM durante 1 hora *in vitro* y 4 μM durante 4 horas *in situ*. Cabe destacar que estas condiciones de incubación son las mismas en ambas líneas celulares estudiadas, AMO-1 y B3/25. La fracción de proteasomas activos sin ser marcada por la sondas encontrada es bastante pequeña (1-10%) en todos los casos excepto en lisados de ratones donde esta fracción aumenta hasta el 30%.

En el capítulo 4 un cribado de 7 sondas diferentes del proteasoma es llevado a cabo en muestras de ratones y peces cebra. Las sondas utilizadas en este estudio varían desde exclusivas para una sola subunidad del proteasoma hasta pan-reactivas con todas las subunidades. La aplicación de estas sondas en tejidos humanos había sido validada previamente y aquí se demuestra su validez para estudios en ratones o peces cebra, dos especies ampliamente utilizadas en investigación debido a su gran similitud con la biología humana. Todas las sondas mantienen su selectividad hacia las diferentes subunidades del proteasoma en ambos organismos aunque con una pequeña pérdida de potencia, manteniéndose en un bajo rango micro molar (0.1-3 μM).

El capítulo 5 es un estudio sobre la caracterización de dos líneas celulares resistentes a inhibidores del proteasoma utilizando ABPP y análisis proteómicos. El estudio demuestra que la adaptación a la inhibición del proteasoma es independiente del tipo de inhibidor utilizado y de mutaciones puntuales en la subunidad $\beta 5$, mutaciones que han sido anteriormente encontradas en líneas celulares pero no en muestras de pacientes con mieloma refractario. Los cambios significantes en el proteoma de dos subclones de mieloma resistentes a regímenes de inhibición del proteasoma comparados con su línea celular progenitora son caracterizados en este estudio. Al agrupar las proteínas identificadas en grupos dependiendo de su función biológica, se demuestra que las rutas biológicas alteradas son las mismas en ambas líneas celulares resistentes. Esto, sumado al hecho de que alrededor del 50% de las proteínas encontradas en el análisis son comunes en ambos subclones, es indicativo de que un complejo cambio en el funcionamiento interno de las células es necesario para la adaptación contra la toxicidad inducida por la inhibición del proteasoma.