

## LA UBIQUITINACIÓN: UN SISTEMA DE REGULACIÓN DINÁMICO DE LOS ORGANISMOS

José Manuel Zamudio-Arroyo,  
María Teresa Peña-Rangel y \*Juan Rafael Riesgo-Escovar

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de  
Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. Boulevard Juriquilla #3001,  
C.P.76230, Qro., Qro. E-mail: \*riesgo@unam.mx

### RESUMEN

La regulación de la expresión génica ocurre a distintos niveles, desde el control de la transcripción hasta las modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas. Entre estas últimas se encuentra el mecanismo de ubiquitinación, consistente en la adición de una o varias moléculas de ubiquitina, una proteína pequeña, de manera covalente a proteínas blanco en residuos de lisina. Esto ocurre mediante un mecanismo conservado evolutivamente a rasgos generales desde las bacterias y que en eucariontes consta de tres enzimas: E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación. En particular, esta última define en buena medida la especificidad de la reacción, dirigiendo las E2-ubiquitina a las proteínas blanco. Las E3 se dividen en tres clases, dependiendo del dominio activo que posean: RING finger, HECT o U-box. La ubiquitinación puede tener varias consecuencias, aunque la más estudiada es la degradación por el proteasoma 26S de las proteínas marcadas. Estudiar el fenómeno de ubiquitinación en organismos genéticos modelo como la mosca de la fruta confiere muchas ventajas, entre las que se cuenta poder analizar las consecuencias de la función en el organismo completo. Esto permite, entre otras cosas, observar si existen o no relaciones entre células vecinas en el proceso.

**Palabras Clave:** *Drosophila melanogaster*, E3 ligasas, proteasoma, ubiquitinación.

### ABSTRACT

Regulation of genetic expression occurs at different levels, from transcriptional control to post-translational modification of proteins. Ubiquitination is one such late process, where target proteins are labeled covalently on a lysine residue with one or more ubiquitin moieties. Ubiquitin itself is a small protein. This mechanism is evolutionarily conserved, present to some degree in bacteria. In eukaryotes, it is organized around three conserved enzymes: E1, an activation enzyme, E2 a conjugation enzyme, and E3, a ligation enzyme. This last class is by far the most diverse, being the main one conferring specificity by guiding E2-ubiquitin complexes to appropriate targets. Depending on the activation domain they possess, there are three classes of E3 enzymes: RING-finger, HECT, and U-box. Ubiquitination can signal different outcomes, yet the most studied one is protein degradation via the 26S proteasome. Studying ubiquitination in whole organisms, especially genetic model organisms, confers many advantages, chief among them being the possibility of recording responses of neighboring groups of cells, whether directly affected or not, by the process.

**Key Words:** *Drosophila melanogaster*, E3 ligases, proteasome, ubiquitination.

## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos regulan la expresión de sus genes a muchos niveles, desde la expresión del ARN mensajero hasta la modificación y vida media de las proteínas. En particular, en vertebrados e invertebrados las proteínas pueden sufrir una gran variedad de modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones aumentan la diversidad de las especies proteicas presentes en las células. Entre estas modificaciones postraduccionales se cuentan la unión covalente de pequeñas moléculas como ácidos grasos (por ejemplo, la adición de un ácido palmítico, o palmitoilación), la unión de carbohidratos o glicosilación, la fosforilación, la acetilación, la metilación, la ADP ribosilación e incluso la unión de proteínas pequeñas como la ubiquitina y SUMO (*small ubiquitin like modifier*, o pequeña proteína modificadora parecida a la ubiquitina). Estas modificaciones postraduccionales covalentes reversibles, dado que pueden llevarse a cabo en más de una misma proteína, no sólo amplían el espectro de funciones y diversidad de las proteínas, sino que sirven también de mecanismos de regulación.

La ubiquitina es un péptido o proteína pequeña de 76 a.a. altamente conservado en eucariontes, con diversas funciones<sup>1</sup>. Fue descubierto en 1975 y, como su nombre lo indica, es ubicua en las células eucariontes. Esta proteína conservada evolutivamente tiene un dominio característico “ $\beta$ -grasp” consistente en cuatro o cinco dominios de hoja  $\beta$ -plegada junto con un dominio  $\alpha$ -helicoidal<sup>2</sup>. El sistema de ubiquitinación de proteínas fue descrito por el grupo del Dr. Ciechanover, logro que fue merecedor de un premio Nobel. Este grupo caracterizó la función de la ubiquitina como una marca para la subsecuente degradación de las proteínas en el proteasoma, en especial para proteínas de vida media corta. De hecho, normalmente existen dos caminos para la degradación de proteínas celulares: la vía vesicular mediada por los lisosomas y la vía citosólica mediada por la ubiquitinación<sup>3</sup>. Sin embargo, se ha descubierto que la ubiquitinación tiene otras funciones además de la degradación, y que el fenómeno en su conjunto es más complejo. Entre otras funciones, la ubiquitinación participa en la regulación de vías de señalización intercelular. Estas cascadas están involucradas en funciones tan diversas como el control de la apoptosis, la autofagia, el ciclo celular, la regulación transcripcional y la reparación del ADN.

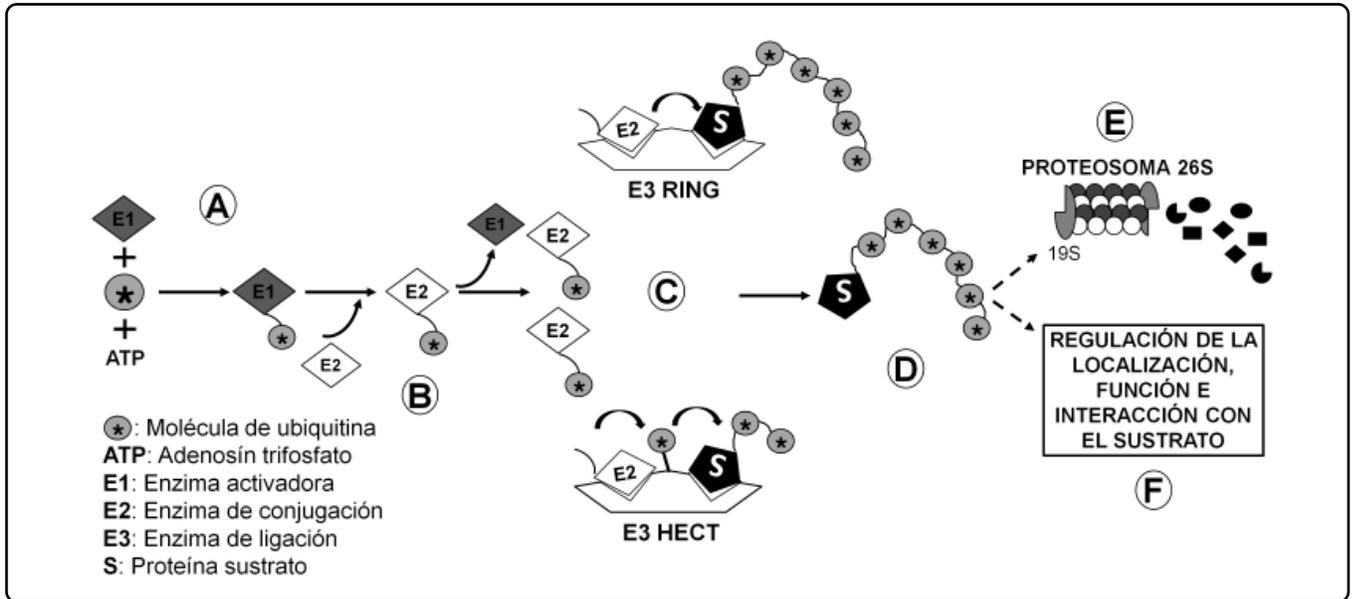
Esta diversidad de funciones se acomoda con la diversidad de procesos de ubiquitinación descritos, pues hay al menos tres variantes: a) monoubiquitinación, b) multi-monoubiquitinación, y c) poliubiquitinación. Molecularmente, el sistema de ubiquitinación está conformado por tres enzimas: la E1 (de activación), la E2 (de conjugación) y la E3 (de ligación). En la monoubiquitinación y multi-monoubiquitinación, una molécula de ubiquitina (Ub) típicamente es activada mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal, en donde existe el motivo Leu-Arg-Gly-Gly.

La glicina final es la que se adenila como parte de la activación en la primera reacción de la vía. Esta reacción requiere de ATP. En seguida la Ub activada se une a un residuo de cisteína de la enzima E1 ubicado en su extremo N-terminal. Después el complejo E1-Ub interactúa con un residuo de cisteína de la enzima E2 para formar un complejo E2-Ub. La enzima E3 ubiquitin ligasa se une a su sustrato e interactúa con el complejo E2-Ub. Finalmente la Ub será ligada al sustrato en uno de sus residuos de lisina<sup>4,5</sup> mediante un enlace isopeptídico (Figura 1). También se han descrito E3 ubiquitin ligasas capaces de ubiquitinar otros residuos (además de la lisina) como serina, treonina o cisteína en el sustrato. En la poliubiquitinación, se forman polímeros de ubiquitina en donde participan las lisinas de la posición 48 o de la posición 63. Sin embargo, utilizando técnicas como espectroscopía de masas se ha determinado que las lisinas de las posiciones 6, 11, 27, 29 y 33 también son susceptibles de formar enlaces isopeptídicos en diferentes porcentajes. Este tipo de ubiquitinación “atípica” parece estar involucrada en respuesta a daño al ADN, daño mitocondrial o como una segunda señal de proteólisis<sup>6</sup>.

Durante mucho tiempo se pensó que este sistema de modificación de proteínas por ubiquitinación era exclusivo de los eucariontes, pero gracias al desarrollo de algoritmos y la secuenciación y análisis de un gran número de genomas de los procariontes, se tienen ahora evidencias de que las arqueobacterias y las eubacterias tienen también sistemas postraduccionales análogos a la ubiquitinación y, por lo tanto, los orígenes y evolución de estos sistemas se remontan a etapas muy antiguas.

De hecho, existen proteínas en procariontes como ThiS y Moad homólogas a la ubiquitina. ThiS está presente en todos los linajes procariontes y contiene el dominio diagnóstico “ $\beta$ -grasp”<sup>7</sup>. En los procariontes las proteínas ThiS y Moad también se adenilan en la glicina de su extremo carboxilo terminal. Los procariontes cuentan asimismo con enzimas como ThiF y MoeB, equivalentes en arquitectura y en función a E1 y responsables de la activación de ThiS y Moad en reacciones dependientes de ATP. Finalmente, las bacterias también poseen enzimas de tipo “E2-like”. Sin embargo, la homología termina aquí, puesto que estas reacciones de adenilación en ThiS y Moad ocurren al inicio de reacciones que no están relacionadas con las funciones típicas de la ubiquitinación, como control de calidad de proteínas o reparación de ADN. Participan, en cambio, en reacciones de asimilación de azufre, al inicio de la ruta de biosíntesis de la tiamina. Esto sugiere que el sistema de ubiquitinación se adaptó de la síntesis de la tiamina a otras funciones en eucariontes.

De las enzimas que conforman al sistema de ubiquitinación en mamíferos, se ha descrito la existencia de genes que codifican para enzimas de tipo E1, mientras que para las enzimas del tipo E2 y E3 existen un mayor número; principalmente existe una gran variedad de enzimas de tipo E3. De hecho son estas enzimas de



**Figura 1. Regulación de proteínas mediado por E3 ligasas RING-finger.** A) La molécula de ubiquitina es activada y transferida a la primera molécula del sistema, la E1-ubiquitín activadora. B) El complejo E1-Ub interacciona con E2 para que E1 transfiera y ligue la molécula de Ub a un residuo de cisteína de E2. C) El complejo E2-Ub interactúa con el complejo E3-ubiquitín ligasa con el sustrato para ligar la Ub al sustrato. La longitud final de la etiqueta de Ub mediará la función en el sustrato. D) Una vez etiquetado el sustrato, E3 se disocia. E) Por último, la degradación del sustrato ocurre vía el proteosoma (para casos de poli-ubiquitinación). F) En otros casos, proteínas variamente ubiquitinadas (sustratos) se regulan de diversas maneras.

tipo E3 las que en buena medida confieren especificidad a las reacciones de ubiquitinación, pues son las que conjuntan a los sustratos con las E2-Ub, a veces participando en la catálisis directamente y uniéndose transitoriamente a la ubiquitina proveniente de E2, pero otras veces sólo sirviendo de punto de enlace entre la E2 y el sustrato a ubiquitinar, sin participar directamente en la catálisis. En estos últimos casos la ubiquitina pasa directamente de la E2 al sustrato. Recientemente se ha descrito una cuarta variedad de enzimas llamadas deubiquitininas (DUB) capaces de retirar la etiqueta de Ub del sustrato<sup>8</sup>, ya que se sabe que la ubiquitinación es un proceso reversible (Figura 2).

Los componentes del sistema de ubiquitinación (E1, E2 y E3), se expresan prácticamente en todos los tejidos. Aunque no parecen estar dentro de organelos subcelulares, hay estrategias que permiten la asociación de E2 y E3 con membranas como las del retículo endoplásmico o mitocondrial externa, o bien, que permiten la importación nuclear.

Es importante mencionar que varias proteínas blanco tienen lisinas que son sitios específicos de ubiquitinación. Si experimentan cambios en estos sitios, se provocan alteraciones en los procesos celulares en los que participan. Sin embargo, también se sabe que varias proteínas blanco tienen lisinas en otras posiciones cercanas que pueden funcionar como sitios alternos aceptores de ubiquitinación. Por ello, los sitios de

ubiquitinación no siempre están evolutivamente conservados, ya que el sistema muchas veces tiene la capacidad de ubiquitinar proteínas blanco o diana en lisinas alternativas, aunque sea con una menor velocidad catalítica<sup>9</sup>.

**TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS E3 UBIQUITÍN LIGASAS**

Las enzimas responsables de interactuar con los sustratos específicos y a su vez que éstos sean etiquetados con la ubiquitina, son las E3 ubiquitín ligasas. Esta clase de enzimas se dividen principalmente en tres grandes grupos de acuerdo al dominio de ubiquitinación presente en ellas. Dichos dominios son: a) el dominio RING (Really Interesting New Gene)-finger, b) el dominio HECT (Homologous to E6-AP Carboxy Terminus) y c) el dominio U-box. Todos estos dominios están altamente conservados en los eucariontes, desde las levaduras hasta los humanos<sup>4,10</sup>.

Las E3 ligasas parecen ser una innovación eucarionte, aunque en los últimos años se ha descubierto que algunas bacterias patógenas secretan proteínas efectoras, importantes en procesos infectivos, con gran similitud en secuencia aminoacídica o en estructura tridimensional a las E3. Sin embargo, parecen haberlas adquirido por transferencia horizontal a partir del huésped. Estas proteínas tienen dominios RING-finger o U-box, actividad de ligasa y sitios de unión a las E2 del huésped. Estas E3 bacterianas ubiquitinan proteínas del huésped de vías de

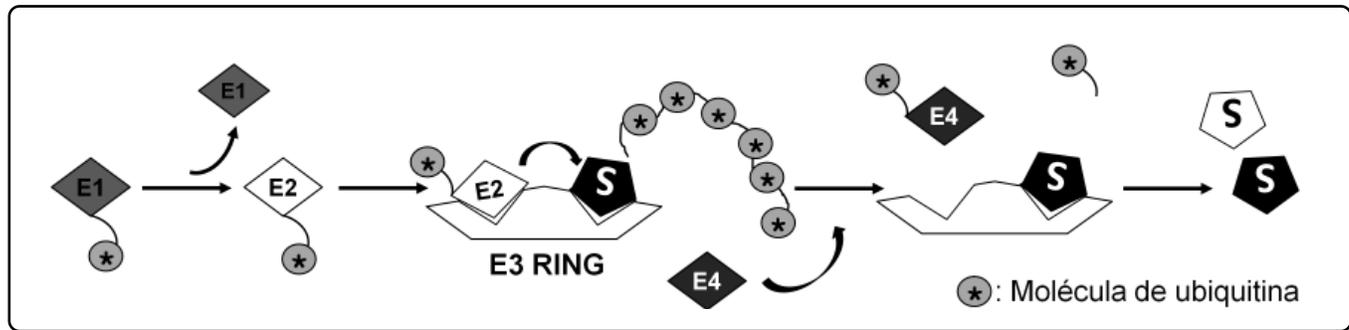


Figura 2. Reacción de deubiquitinación. Una vez poliubiquitinado un sustrato, se puede cambiar su destino mediante la eliminación de la señal de ubiquitinas. Para ello, una cuarta enzima llamada E4 deubiquitina (DUB) interactúa con el complejo E3-sustrato y lleva a cabo la eliminación de moléculas de ubiquitina.

señalización como cinasas involucradas en la respuesta inmune. De esta manera, piratean el sistema de ubiquitinación del huésped para degradar proteínas de defensa del mismo y tener éxito en la infección<sup>11</sup>.

### LAS UBIQUITÍN LIGASAS DE TIPO RING-FINGER

En los eucariontes existe un elevado número de genes que codifican para enzimas de tipo E3 ubiquitín ligasa. En el humano existen alrededor de 617 genes, en el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* 370 genes, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* 129 genes y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 42 genes. El dominio RING-finger está conformado por un motivo consenso de 7 residuos de cisteína y un residuo de histamina (Cys-X2-Cys-X (9-39)-Cys-X (1-3)-His-X (2-3)-Cys-X2-Cys-X (4-48) -Cys-X2-Cys). En este motivo se acomplejan dos átomos de zinc. La estructura tridimensional de este motivo se asemeja a la forma de dos sillas. En este dominio se lleva a cabo la interacción con las enzimas de conjugación E2 y el sustrato a regular. Además del dominio RING-finger las E3 ubiquitín ligasas pueden presentar otros dominios que son importantes para interacciones proteína-proteína como dominios SH2 (homología con Src tipo 2), SH3 (homología con Src tipo 3), FHA (asociado a forkhead) y PDZ (PSD95, DlgA y ZO-1)<sup>4,12-14</sup>. El dominio Ring sirve, al menos parcialmente, para interactuar con la enzima E2. Mediante mutagénesis dirigida de los residuos de Isoleucina 383 y Triptófano 408 dentro del dominio RING-finger, se ha determinado que forman parte del dominio de la E3 que une a la enzima E2<sup>15,16</sup>.

Existen diversos mecanismos de regulación de las E3 ubiquitín ligasas de tipo RING-finger. Dentro de estos mecanismos está la fosforilación, la autoubiquitinación, la interacción con otras proteínas, la unión de pequeños ligandos y aun el orden en que se suceden los sustratos a ubiquitinar<sup>17-21</sup>.

Por otra parte, se ha observado que no necesariamente aquellas proteínas que tienen un dominio RING-finger presentan actividad de ubiquitín ligasa por sí mismas. Tanto HmdX como Hmd2 tienen un dominio RING-finger. Sin embargo, Hmd2 tiene como

blanco al supresor de tumores p53 y para que este último pueda ser ubiquitinado es necesaria la formación de un complejo con HmdX. La formación del complejo promueve la actividad de E3 ubiquitín ligasa de Hmd2 sobre p53, lo que conduce a la degradación de p53; posteriormente, Hmd2 se autoubiquitina en un rizo de autorregulación<sup>22</sup>.

Se ha observado que las enzimas E3 ubiquitín ligasas RING-finger son altamente versátiles. Además, muchas de ellas interactúan con más de un sustrato. La E3 ubiquitín ligasa de tipo RING-finger "Hakai", descrita inicialmente como regulador del complejo de E-cadherina durante la formación de las uniones estrechas entre células, ha sido recientemente descrita también con función de E3 ubiquitín ligasa en la proliferación celular y la oncogénesis<sup>23-25</sup>. Las E3 ubiquitín ligasas pueden expresarse a distintos niveles de manera tejida específica. En salmones del Atlántico los niveles de expresión de la E3 ubiquitín ligasa de tipo RING-finger "MuRF" varían de manera diferenciada en los tejidos en respuesta a condiciones de ayuno e inflamación<sup>26</sup>.

Finalmente, estas enzimas pueden mediar procesos críticos para la homeostasis en humanos. Existen enfermedades neurodegenerativas descritas debidas a la falta de función de E3 ubiquitín ligasas de tipo RING-finger. Mutaciones en la enzima PARK2 (Parkina) conllevan a la enfermedad Autosomal Recesiva de Parkinson Juvenil (AR-JP), una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas con ausencia de cuerpos de Lewy. Lo anterior sugiere que la regulación de los sustratos de esta enzima son críticos para la función de estas neuronas dopaminérgicas<sup>27,28</sup>.

### LAS UBIQUITÍN LIGASAS DE TIPO HECT

La primera E3 ubiquitín ligasa de tipo HECT se describió en el virus del papiloma humano asociado a proteínas del tipo E6 (E6-AP). En el humano hay alrededor de 28 genes con dominios HECT. Este dominio se ubica en el extremo C-terminal y tiene un tamaño de 350 aminoácidos. Este dominio HECT presenta los mismos residuos de cisteína encontrados en los dominios de tipo RING-finger, pero también acompañado de un residuo que

funciona como aceptor de la molécula de ubiquitina. A diferencia de las E3 ubiquitín ligasas de tipo RING-finger, las E3 ubiquitín ligasas HECT son las encargadas de ligar la molécula de ubiquitina al o los sustratos a regular y se unen a la ubiquitina transitoriamente durante el proceso<sup>13,29,30</sup>.

Las enzimas E3 con dominio HECT se dividen a su vez en 3 grupos. El Grupo I son enzimas que presentan un dominio C2, de unión a calcio, importante para la regulación de la actividad de estas enzimas. Entre estas proteínas están la Anexina VIII y múltiples proteínas con dominios WW (los dominios WW son dominios de interacción proteína-proteína)<sup>31,32</sup>. Las proteínas del Grupo II, también llamadas HERC, están involucradas en la remodelación de la cromatina<sup>33</sup>. Por último, en el Grupo III se encuentran enzimas que contienen otros dominios muy diversos<sup>34</sup>.

Existen varios mecanismos de regulación de proteínas con dominio HECT. Uno de ellos es la fosforilación. Por ejemplo, la insulina y la aldosterona inducen la activación de las cinasas AKT1 y SGK1. Éstas, una vez activadas, fosforilan a la E3 de dominio HECT Nedd4L, que ubiquitina subunidades de canales de sodio. Esto resulta, a su vez, en el reclutamiento de una cuarta proteína, la adaptadora 14-3-3, encargada de regular la unión de Nedd4L con su proteína blanco<sup>35,36</sup>. La fosforilación también puede influir en la activación de otras E3 ubiquitín ligasas HECT; por ejemplo, la ubiquitín ligasa ITCH es activada por JNK1<sup>37</sup>.

La interacción entre dominios es otro mecanismo de regulación; por ejemplo, los dominios C2 y HECT de la proteína Smurf2 interactúan entre sí funcionando como un mecanismo de autoinhibición de la propia actividad de la ubiquitín ligasa<sup>38</sup>. Asimismo, otras E3 HECT son objeto de regulación por medio de deubiquitinación, un proceso que se antoja recursivo. Un ejemplo es la deubiquitinación de Rsp5, una ubiquitín ligasa activada por la eliminación de cadenas de ubiquitina a cargo del complejo Ubp2 (deubiquitinasa)/Rup1 (proteína con dominio UBA)<sup>39</sup>.

En el humano las mutaciones en proteínas que codifican para enzimas E3 ubiquitín ligasas HECT pueden generar trastornos físicos importantes. Por ejemplo, las mutaciones en el gen UBE3A, cuyo producto se empieza a expresar en el cigoto por contribución materna, dan lugar al síndrome de Angelman, una enfermedad neurodegenerativa que ocasiona retraso mental, convulsiones, disturbios en el sueño, déficit del habla y trastornos en el movimiento. En *Drosophila melanogaster* mutantes nulas para el gen homólogo de UBE3A exhiben defectos en la locomoción, el ritmo circadiano y en la memoria a largo plazo<sup>40-43</sup>.

### LAS UBIQUITÍN LIGASAS DE TIPO U-BOX

El primer miembro de esta familia fue identificado mediante un tamizaje en levaduras utilizando una proteína fusión de ubiquitina con  $\beta$ -galactosidasa en cepas tratadas con el mutágeno etil metano sulfonato (EMS). En dicho experimento fueron

identificados cinco genes llamados Ufd1-Ufd5 (por ubiquitín fusion degradation). De dichos genes, sólo uno de ellos, Ufd2, presenta el dominio U-box. Este dominio de aproximadamente 70 aminoácidos es crítico para la función de E3 ubiquitín de las U-box. La estructura tridimensional de este dominio es muy parecido al dominio RING y HECT de las otras E3, pero sin los residuos de cisteína<sup>44,45</sup> que coordinan a los dos átomos de zinc de los dominios RING y HECT y, por lo tanto, sin átomos de zinc.

Ufd2 fue caracterizado como un nuevo factor de ubiquitinación (originalmente denominado "E4", ya que se pensó que requería de un complejo E1-E2-E3 activado y que servía para catalizar el alargamiento de cadenas de poliubiquitina en proteínas, ya marcadas por este complejo E1-E2-E3; subsecuentemente, se demostró que UFD2 tenía actividad de E3 clásica, dependiente de E1 y E2). La actividad de algunas enzimas U-box de alargamiento de la cadena de poliubiquitina en proteínas blanco, subsecuente a la actividad del complejo normal de ubiquitinación (E1-E2-E3), se denomina E4<sup>46</sup>.

Ufd2 por sí solo es incapaz de reconocer de manera directa a su sustrato. Ufd2 se activa en ciertas condiciones de estrés y es importante para la degradación de proteínas mal plegadas bajo estas condiciones<sup>47-49</sup>. Ufd2 está conservado evolutivamente contando con un homólogo en organismos como levaduras, nemátodos (*Encephalitozoon cuniculi*, *Caenorhabditis elegans*), hongos (*Dictyostelium discoideum*) y plantas (*Arabidopsis thaliana*). En otros organismos está duplicado, encontrándose dos homólogos en el humano, el ratón y la mosca de la fruta<sup>10</sup>. Recientemente, se han descrito otras enzimas E3 ubiquitín ligasa de tipo U-box: 8 en el humano, 37 en *Arabidopsis thaliana* y 2 en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Debido a que en las plantas se ha encontrado el mayor número de genes que codifican para enzimas E3, U-box es donde se han realizado mayores estudios. En *Arabidopsis thaliana* las proteínas con dominio U-box se han clasificado en 5 grupos, con base en la presencia o no de otros dominios. El Grupo I alberga un gen que presenta una región conservada con homólogos de Ufd2, importante para la interacción con CDC48, una ATPasa de tipo AAA<sup>50, 51</sup>. El Grupo II está conformado por 18 genes que cuentan con una región con repeticiones de tipo ARM, dominio descrito originalmente en el homólogo de la  $\beta$ -catenina en *Drosophila*, proteína denominada Armadillo en este organismo<sup>52</sup>. El Grupo III se conforma por 12 genes con un dominio rico en residuos de leucina. El Grupo IV está conformado por 4 genes que contienen dominios de serina/treonina cinasas. Y, por último, el Grupo V tiene 2 genes sin algún otro dominio más que el U-box<sup>44</sup>.

También se han estudiado los homólogos de proteínas U-box de *S. cerevisiae* en el ratón (UFD2a, UFD2b, CHIP y KIAA0860) y en el humano (CYC4 y PRP19). Se ha determinado su expresión en distintos tejidos y estirpes celulares. En células HeLa, por ejemplo, se localizan en el núcleo y en el citoplasma. UBE4A se

expresa en distintos tejidos como músculo esquelético, hígado y riñón en el humano, además del sistema nervioso. Al igual que en las células HeLa, en este último tejido UBE4A se localiza en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas corticales y oligodendrocitos<sup>53</sup>.

### REGULACIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO VÍA EL PROTEASOMA 26S

El tipo de ubiquitinación (mono o poli) define la naturaleza de la señal de regulación para el sustrato. La monoubiquitinación generalmente tiene como finalidad la regulación de la actividad de proteínas localizadas en la membrana plasmática en respuesta a una señal de endocitosis. Algunos estudios han definido un modelo de poliubiquitinación mostrando que la señal mínima para la degradación del sustrato vía el proteasoma es una cadena conformada por cuatro moléculas de Ub. También se ha observado que la poliubiquitinación no necesariamente funciona como señal de degradación, sino que la señalización es más compleja, pudiendo funcionar como señal de regulación de la localización celular, la función o la interacción de la proteína blanco con sustratos<sup>54</sup>.

El proteasoma 26S, en donde se degradan las proteínas marcadas con poliubiquitina, puede localizarse en el núcleo celular o en el citoplasma. Su localización depende de factores como la densidad celular, el tipo celular y las condiciones de crecimiento<sup>55</sup>.

El proteasoma 26S está conformado por un centro llamado 20S y dos unidades regulatorias 19S. El centro 20S está compuesto por cuatro anillos típicamente heptaméricos compuestos a su vez de varias proteínas, las subunidades  $\alpha$  que son estructurales y las  $\beta$  que son catalíticas. En conjunto, adoptan una forma de barril, con los anillos conformados por subunidades  $\alpha$  en los extremos y los conformados por subunidades  $\beta$  en el medio. Los complejos 19S localizados hacia los extremos del centro 20S son los encargados del reconocimiento y la regulación del sustrato ya etiquetado con Ub.

El proteosoma rompe el sustrato en fragmentos que van de tres a veinte residuos. Estos fragmentos serán degradados después a aminoácidos libres por endo y aminopeptidasas<sup>56</sup>. Esta regulación mediada por degradación sirve para procesos tan diversos como la expresión de genes, regulación de proteínas señalizadoras como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), represores transcripcionales y factores transcripcionales como MyoD<sup>57-59</sup>, el control de calidad y tráfico de proteínas y la regulación de proteínas de membrana y de estructuras proteicas como el citoesqueleto<sup>23,60,61</sup>. El uso de inhibidores del proteosoma como lactacistina provoca la acumulación de sustratos citoplasmáticos y nucleares en la célula<sup>62,63</sup>. Ésto provoca que se acumulen proteínas activas y generan fenotipos de ganancia de función, subrayando la importancia de este sistema de regulación.

### LA MOSCA DE LA FRUTA COMO UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA UBIQUITINACIÓN

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es el eucarionte pluricelular mejor caracterizado en la actualidad y un organismo modelo genético de excelencia. A las múltiples ventajas inherentes al mismo (ciclo de vida corto, gran número de descendientes, talla pequeña, mantenimiento económico, genoma secuenciado y anotado de muy alta calidad<sup>64</sup>, genomas de otras veinte especies del género secuenciadas, etc.), se agrega la posibilidad de realizar experimentos *in vivo*, en el organismo completo, como el caso citado arriba de la ubiquitina UBE3A, que presenta fenotipos de falta de memoria de un día, problemas con la arborización de neuronas dopaminérgicas, defectos de locomoción y de ritmos circádicos<sup>43</sup>.

El hecho de poder examinar al organismo completo o en clones de células homocigóticas mutantes en organismos heterocigóticos, mediante mosaicos genéticos, permite explorar múltiples funciones, así como las consecuencias orgánicas entre los defectos de estas enzimas y el animal o grupos de células en conjunto. Esto permite mapear foci o estructuras en las que se requiere de la acción de estas enzimas. Permite también estudiar las consecuencias en células silvestres de la cercanía con células mutantes en el mismo organismo o, dicho de otra manera, si los fenotipos son células independientes o no. Dado que muchas veces estas enzimas regulan vías y procesos de comunicación intercelular, los defectos en algunas células se ven reflejados en otras. En particular el estudio de las E3 ha sido muy fructífero. Varias de las enzimas caracterizadas en este modelo ilustran claramente los alcances y el poder del análisis a nivel orgánico de éstas. En especial los casos de *neuralized* y *mindbomb1*, como E3 ligasas y de *fat facets*, como enzima deubiquitinadora, han sido muy estudiados.

### NEURALIZED (NEUR) Y MINDBOMB1 (MIB1)

Tanto *neur* como *mib1* funcionan como reguladores de una vía de señalización intercelular muy importante: la vía de Notch. Esta vía de señalización tiene un receptor membranaral, Notch, y ligandos, también membranarales, como Delta y Serrate. Para que la vía se active es necesario que el receptor y los ligandos se internalicen, y pasen a endosomas tempranos, en donde el receptor Notch sufre una proteólisis que libera un fragmento citoplásmico de la membrana del endosoma al citosol. Una vez liberado, este fragmento citoplásmico, merced a una señal de internalización nuclear presente en su secuencia, se trasloca al núcleo, en donde funciona como factor de transcripción, regulando genes de respuesta inmediata de la vía.

Sin embargo, para que esto ocurra es necesaria la internalización de este receptor y para que Notch se internalice al menos una de las proteólisis que sufre este receptor, requiere de eventos de ubiquitinación en sus ligandos. Notch sufre tres eventos distintos de proteólisis: el primero durante la maduración del receptor en el retículo endoplásmico, el segundo como consecuencia de la

unión con uno de sus ligandos, Delta o Serrate, y después de que éstos se marcan con ubiquitina para internalización y degradación; y el tercero, con Notch ya internalizado en la célula receptora, en los endosomas tempranos. De esta forma, las E3 ubiquitín ligasas que tienen como sustratos a los ligandos de Notch, Delta y Serrate (*neuralized* y *mindbomb1*, respectivamente) juegan un papel crítico en la señalización de la vía, regulando el nivel de activación de la misma. Además, como tienen efecto en las células emisoras de la señal, tienen influencia en las células que reciben la señal, que no requieren de estos genes. Es decir, ejercen un efecto sobre las células receptoras. Tanto *neur* como *mib1* son E3 de tipo RING-finger<sup>65</sup>.

### FAT FACETS (FAF)

*fat facets (faf)* codifica para una enzima deubiquitinadora, es decir, una enzima que corta el enlace isopeptídico covalente entre la ubiquitina y la proteína sustrato. En el caso de *faf*, esto ocurre justo antes de que la proteína marcada entre al proteasoma para ser degradada. La falta de función de *faf* provoca acumulación de proteínas marcadas con ubiquitina que no pueden ser degradadas, porque el paso de deubiquitinación es obligado y previo a la degradación de las proteínas marcadas. La consecuencia neta de este defecto es que estas proteínas se acumulan y pueden continuar llevando a cabo su función, volviéndose ahora ectópicos, desregulando así los procesos en los que participan.

Los alelos mutantes de *faf* tienen omatidios con fotorreceptores extra, lo que le da al ojo compuesto del adulto un aspecto rugoso. Estudios de mosaicos genéticos demostraron que *faf* se requiere en células que normalmente no dan origen a los fotorreceptores, en donde presumiblemente la señalización de la vía de las MAPK (quinasas activadas por mitógenos), vía que normalmente se activa para desencadenar la diferenciación de fotorreceptores a partir de células precursoras, se encuentra activa más tiempo o con más fuerza de lo normal. De manera general, la activación de la vía de las MAPK determina el destino de todas las células precursoras del ojo, de modo que los desajustes en los niveles de activación en poblaciones de células precursoras dan como consecuencia cambios de destino, en este caso diferenciación ectópica de fotorreceptores<sup>66,67</sup>.

Existen otras E3 en el genoma de la mosca, muchas de las cuales aún esperan ser estudiadas y caracterizadas. En el laboratorio hemos iniciado el estudio de la E3 ligasa de tipo RING-finger *chem*, enzima que se requiere en el desarrollo embrionario durante un proceso de cambio de forma celular llamado cerrado dorsal. Los embriones homocigotos mutantes para *chem* son letales embrionarios. Éstos mueren con un agujero en el dorso sin completar la embriogénesis. Nuestras investigaciones apuntan a que *chem* regula proteínas del citoesqueleto y definitorias de la polaridad celular, críticas para este proceso.

### CONCLUSIONES

El sistema de ubiquitinación de proteínas, evolutivamente muy antiguo, ha sido adaptado y diversificado de manera importante en los eucariotes, a fin de llevar a cabo una gran cantidad de funciones regulatorias por medio del marcaje con ubiquitinas de proteínas celulares. Tanto las modalidades de marcaje (mono- o poli-, o multi- monoubiquitinación), así como la diversidad y especificidad de E2, pero particularmente de E3 ligasas, han generado una multitud de señales con consecuencias muy diversas, desde cambios de localización dentro de la célula, activación o inactivación, a degradación y catabolismo de proteínas. El estudio en organismos completos de este sistema de señalización/regulación aporta datos más integrales acerca de las funciones, los alcances y las consecuencias del empleo de este sistema en eucariotas pluricelulares.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo de la UNAM (presupuesto del laboratorio), de PAPIIT #IN203110 y CONACYT #81864aJRRE. José Manuel Zamudio-Arroyo está apoyado por una beca de doctorado del CONACYT.

### REFERENCIAS

1. Hershko, A., Ciechanover, A. & Varshavsky, A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat. Med.* **6** (10), 1073-1081 (2000).
2. Burroughs, A.M., Balaji, S., Iyer, L.M. & Aravind, L. Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold. *Biol. Direct* **2**, 2-18 (2007).
3. Ciechanover, A. et al. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (3), 1365-1368 (1980).
4. Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399-434 (2009).
5. Lee, I. & Schindelin, H. Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* **134** (2), 268-278 (2008).
6. Kulathu, Y. & Komander, D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** (8), 508-523 (2012).
7. Hochstrasser, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458** (7237), 422-429 (2009).
8. Amerik, A.Y. & Hochstrasser, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1695** (1-3), 189-207 (2004).
9. Hagai, T., Toth-Petroczy, A., Azia, A. & Levy, Y. The origins and evolution of ubiquitination sites. *Mol. Biosyst.* **8** (7), 1865-1877 (2012).
10. Hatakeyama, S. & Nakayama, K.I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302** (4), 635-645 (2003).
11. Hicks, S.W. & Galan, J.E. Hijacking the host ubiquitin pathway: structural strategies of bacterial E3 ubiquitin ligases. *Curr. Opin. Microbiol.* **13** (1), 1-12 (2010).
12. Freemont, P.S., Hanson, I.M. & Trowsdale, J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **64** (3), 483-484 (1991).
13. Li, W. et al. Genome-wide and functional annotation of human E3

- ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3** (1), e1487 (2008).
14. Weissman, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** (3), 169-178 (2001).
  15. Lorick, K.L. *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (20), 11364-11369 (1999).
  16. Joazeiro, C.A. *et al.* The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286** (5438), 309-312 (1999).
  17. Fang, S. *et al.* Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275** (12), 8945-8951 (2000).
  18. Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J.V. & Hershko, A. Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (20), 9303-9307 (1995).
  19. Yang, Y. *et al.* Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288** (5467), 874-877 (2000).
  20. Turner, G.C., Du, F. & Varshavsky, A. Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* **405** (6786), 579-583 (2000).
  21. Rape, M., Reddy, S.K. & Kirschner, M.W. The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* **124** (1), 89-103 (2006).
  22. Linares, L.K. *et al.* HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (21), 12009-12014 (2003).
  23. Kaido, M., Wada, H., Shindo, M. & Hayashi, S. Essential requirement for RING finger E3 ubiquitin ligase Hakai in early embryonic development of *Drosophila*. *Genes Cells* **14** (9), 1067-1077 (2009).
  24. Fujita, Y. *et al.* Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* **4** (3), 222-231 (2002).
  25. Figueroa, A. *et al.* Novel roles of hakai in cell proliferation and oncogenesis. *Mol. Biol. Cell* **20** (15), 3533-3542 (2009).
  26. Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C.J. & Martin, S.A. Muscle-specific RING finger (MuRF) cDNAs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their role as regulators of muscle protein degradation. *Mar. Biotechnol. (NY)* **14** (1), 35-45 (2012).
  27. Mizuno, Y., Hattori, N. & Matsumine, H. Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **71** (3), 893-902 (1998).
  28. Shimura, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25** (3), 302-305 (2000).
  29. Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. & Howley, P.M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (11), 5249-5267 (1995).
  30. Huang, L. *et al.* Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* **286** (5443), 1321-1326 (1999).
  31. Plant, P.J. *et al.* Apical membrane targeting of Nedd4 is mediated by an association of its C2 domain with annexin XIIIb. *J. Cell Biol.* **149** (7), 1473-1484 (2000).
  32. Staub, O. *et al.* WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J.* **15** (10), 2371-2380 (1996).
  33. Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A. & Wittinghofer, A. Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* **105** (2), 245-255 (2001).
  34. Rotin, D. & Kumar, S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10** (6), 398-409 (2009).
  35. Debonneville, C. *et al.* Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na<sup>+</sup> channel cell surface expression. *EMBO J.* **20** (24), 7052-7059 (2001).
  36. Snyder, P.M., Olson, D.R. & Thomas, B.C. Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* **277** (1), 5-8 (2002).
  37. Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y. C. & Karin, M. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (6), 1717-1722 (2006).
  38. Wiesner, S. *et al.* Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* **130** (4), 651-662 (2007).
  39. Kee, Y., Lyon, N. & Huibregtse, J.M. The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J.* **24** (13), 2414-2424 (2005).
  40. Vu, T.H. & Hoffman, A.R. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat. Genet.* **17** (1), 12-13 (1997).
  41. Rougeulle, C., Glatt, H. & Lalande, M. The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat. Genet.* **17** (1), 14-15 (1997).
  42. Kishino, T., Lalande, M. & Wagstaff, J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* **15** (1), 70-73 (1997).
  43. Wu, Y. *et al.* A *Drosophila* model for Angelman syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (34), 12399-12404 (2008).
  44. Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J. & Shirasu, K. The U-box protein family in plants. *Trends Plant. Sci.* **6** (8), 354-358 (2001).
  45. Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** (22), 4673-4680 (1994).
  46. Hatakeyama, S. *et al.* U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* **276** (35), 33111-33120 (2001).
  47. Koegl, M. *et al.* A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96** (5), 635-644 (1999).
  48. Patterson, C. A new gun in town: the U box is a ubiquitin ligase domain. *Sci. STKE* **2002** (116), pe4 (2002).
  49. Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. & Varshavsky, A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* **270** (29), 17442-17456 (1995).
  50. Pukatzi, S., Tordilla, N., Franke, J. & Kessin, R.H. A novel component involved in ubiquitination is required for development of Dictyostelium discoideum. *J. Biol. Chem.* **273** (37), 24131-24138 (1998).
  51. Patel, S. & Latterich, M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* **8** (2), 65-71 (1998).
  52. Huber, A.H., Nelson, W.J. & Weis, W.I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90** (5), 871-882 (1997).
  53. Contino, G. *et al.* Expression analysis of the gene encoding for the

- U-box-type ubiquitin ligase UBE4A in human tissues. *Gene* **328**, 69-74 (2004).
54. Schnell, J.D. & Hicke, L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **278** (38), 35857-35860 (2003).
55. Peters, J.M., Franke, W.W. & Kleinschmidt, J.A. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269** (10), 7709-7718 (1994).
56. Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W. & Tamura, T. The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* **95** (5), 637-648 (1998).
57. Blondel, M. *et al.* Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *EMBO J.* **19** (22), 6085-6097 (2000).
58. Lenk, U. & Sommer, T. Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J. Biol. Chem.* **275** (50), 39403-39410 (2000).
59. Floyd, Z.E. *et al.* The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD. *J. Biol. Chem.* **276** (25), 22468-22475 (2001).
60. Hochstrasser, M. Introduction to intracellular protein degradation. *Chem. Rev.* **109** (4), 1479-1480 (2009).
61. Hurley, J.H., Lee, S. & Prag, G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* **399** (3), 361-372 (2006).
62. Dino Rockel, T. & von Mikecz, A. Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J. Struct. Biol.* **140** (1-3), 189-199 (2002).
63. Fenteany, G. *et al.* Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268** (5211), 726-731 (1995).
64. Celniker, S.E. & Rubin, G.M. The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**, 89-117 (2003).
65. Fortini, M.E. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell* **16** (5), 633-647 (2009).
66. Fischer-Vize, J.A., Rubin, G.M. & Lehmann, R. The fat facets gene is required for *Drosophila* eye and embryo development. *Development* **116** (4), 985-1000 (1992).
67. Millard, S.M. & Wood, S.A. Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes. *J. Cell. Biol.* **173** (4), 463-468 (2006).