

Anal. Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 45-82

Sesiones

Vía de la ubiquitina-proteosoma

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Los sistemas intracelulares proteolíticos reconocen y degradan proteínas lesionadas o mal plegadas. La vía de la ubiquitina proteosoma se encuentra implicada en el recambio intracelular de las proteínas y juega un papel importante en la degradación de proteínas reguladoras de vida corta, implicadas en una serie amplia de procesos celulares tales como: regulación del ciclo celular, modulación de los receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento y presentación de antígenos y activación de factores de transcripción. Esta vía utiliza una cascada enzimática, mediante la cual moléculas de ubiquitina se insertan covalentemente a la proteína sustrato. Un paso importante en la cascada proteolítica es el reconocimiento del sustrato por una de las muchas ubiquitina ligasas, E3, lo cual conduce a la poliubiquitinación o señal de degradación. La modificación por poliubiquitinación marca a la proteína para su destrucción y la conduce al complejo proteosoma 26S para su degradación proteolítica.

Palabras clave: Ubiquitina.—Poliubiquitinación.—Proteosoma 26S.—Degradación proteica.—Proteolisis.

ABSTRACT

Intracellular proteolytic systems recognize and destroy misfolded or damaged proteins. The ubiquitin-proteasome pathway is widely involved in intracellular protein turnover. It plays a central role in degradation of short-lived and regulatory proteins important in a broad array of cellular processes, including regulation of the cell cycle, modulation of cell surface receptors and ion channels, antigen processing and presentation and activation of transcription factors. The pathway employs an enzymatic cascade by which multiple ubiquitin molecules are covalently attached to the protein substrate. An important step in the proteolytic cascade

is the specific recognition of the substrate by one of many ubiquitin ligases, E3s, which is followed by generation of the polyubiquitin degradation signal. The polyubiquitin modification marks the protein for destruction and directs it to the 26S proteasome complex for proteolytic degradation.

Key words: Ubiquitin.—Polyubiquitination.—26S Proteasome.—Protein degradation.—Proteolysis.

INTRODUCCIÓN

La célula, la unidad fundamental de la vida, es un lugar en el que miles de reacciones ocurren simultáneamente. Las células coordinan estas acciones a través de mensajes transmitidos por proteínas de un lugar a otro. Estos mensajes son parte de la burocracia que controla momento a momento las acciones celulares. Cuando tales mensajes se alteran el resultado es la muerte o el cáncer. Los mensajes transmitidos por las proteínas han de ser rápidos e inmediatos. De no ser así se vuelven obsoletos y las proteínas han de ser destruidas y hay que preparar un nuevo mensajero que a menudo acarrea instrucciones opuestas.

Como todos los componentes del organismo, el proteoma está también en un estado dinámico de síntesis y degradación. Los distintos mecanismos proteolíticos poseen diferentes requerimientos fisiológicos y permiten al organismo adaptarse a condiciones ambientales y fisiológicas en continuo cambio. Es necesario distinguir entre la destrucción de las proteínas «propias» y las «extrañas». Para evitar la respuesta inmune, las proteínas extrañas de la dieta se degradan «fuera», en el lumen del tracto intestinal. Los dos grupos de proteínas propias —extracelulares e intracelulares— se degradan por mecanismos diferentes.

La vía de la ubiquitina-proteosoma es el principal mecanismo en la célula para el catabolismo proteico, interviniendo de manera directa en el funcionamiento y recambio de muchas proteínas reguladoras. Esta importante vía se encuentra involucrada en la regulación de procesos celulares críticos, tales como: control del ciclo celular, reparación del DNA, oncogénesis, catabolismo de proteínas anormales, modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, modulación de receptores de superficie y canales iónicos, procesamiento de an-

tígenos, biogénesis de los ribosomas, transcripción, infección vírica, degeneración neural y muscular, diferenciación celular, respuesta al estrés, etc.

La degradación de una proteína por el sistema de la ubiquitina implica dos etapas sucesivas: 1) conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteína, y 2) degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo proteosoma de 26S, con la liberación de trozos de la proteína y de ubiquitina libre reutilizable. Para asegurar la eliminación eficiente de una cierta proteína en un determinado momento, tanto la conjugación de la ubiquitina como la degradación de los sustratos ubiquitinados han de estar estrictamente regulados.

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina con la proteína sustrato intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales que conllevan la unión del residuo glicocola del terminal carboxilo de la ubiquitina con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina (K) de la proteína sustrato. Una cadena de poliubiquitina se va elaborando sobre la proteína por adiciones de monómeros de la ubiquitina en sucesivas rondas de ubiquitinación. Estas moléculas de ubiquitina van añadiéndose a residuos específicos de lisina de la última ubiquitina de la cadena. Las proteínas unidas a la cadena de poliubiquitina son reconocidas por el proteosoma para su degradación proteolítica con el concomitante reciclado de monómeros de la ubiquitina por enzimas desubiquinantes.

UBIQUITINA

La ubiquitina fue aislada por vez primera por Goldstein *et al.* [1] a partir de timo bovino y posteriormente se encontró en diferentes tejidos y organismos y al principio se creyó que participaba en la diferenciación de los linfocitos. Es una proteína con 76 aminoácidos y 8,6 kDa, ideal para estudios de plegamiento basados en resonancia magnética nuclear, debido a su pequeño tamaño, elevada estabilidad, ausencia de enlaces disulfuro, excelente solubilidad y predominio de estructuras secundarias con enlaces de hidrógeno. Está formada por cinco láminas beta y una gran hélice alfa (Figura 1).

Esta pequeña proteína se une a las proteínas que van a ser degradadas en un proceso denominado ubiquitinación. La ubiquitina actúa a modo de etiqueta para que la proteína pueda ser reconocida por el proteosoma para su degradación. Un proceso antagónico es aquel catalizado por enzimas antiubiquitinantes que eliminan la ubiquitina de las proteínas.



FIGURA 1. *Estructura de la ubiquitina. Cinco láminas beta y una hélice alfa.*

El nombre ubiquitina se debe a su ubicua presencia en casi todos los tipos de células. Es, también, una de las proteínas más conservadas durante la evolución. La secuencia de aminoácidos es casi idéntica desde los insectos al hombre.

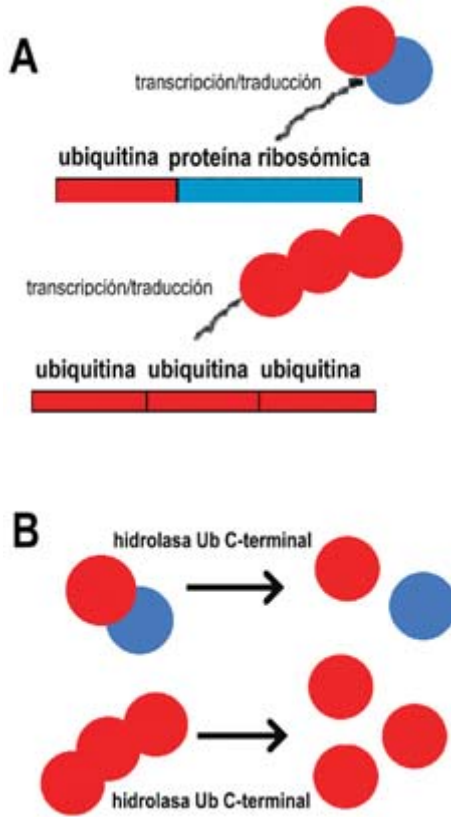


FIGURA 2. *Expresión de la ubiquitina. Genes cuyos productos son proteínas de fusión (ver texto).*

La ubiquitina está codificada por una familia de genes cuyos productos son proteínas de fusión. Los genes Ub existen generalmente en dos estados: A) El gen ubiquitina (rojo) se fusiona con un gen de proteína ribosómica (azul), dando lugar a un producto que es una proteína de fusión ubiquitina-ribosómica. Los genes Ub pueden también existir como una repetición lineal, lo que significa que el producto proteico comprende una cadena lineal de moléculas de Ub fusionadas (poliubiquitina). Después de la fusión de los genes, las proteínas se sintetizan juntas. B) Otra proteína denominada hidrolasa Ub C-terminal separa las proteínas fusionadas en el terminal C de la Ub. De esa manera se libera una Ub individual y la proteína

ribosómica, o se liberan una serie de monómetros de Ub de la cadena de poliubiquitina.

Esta proteína se encuentra en eucariotas y está muy conservada. La secuencia de aminoácidos apenas difiere entre la levadura y el humano. Esta alta conservación sugiere que la mayoría de los aminoácidos que forman la ubiquitina son esenciales, ya que cualquier mutación a lo largo de la evolución se hubiera eliminado por selección natural.

La ubiquitina es una proteína estable al calor que posee una estructura globular. Tiene una gran capacidad para conjugarse con otras proteínas en un proceso que requiere energía [2-4]. Es esta propiedad la que la capacita para encontrarse implicada en muchos procesos celulares. Por ejemplo, la ubiquitina se conjuga con la ciclina durante las fases G1 y M del ciclo celular, jugando un importante papel en la regulación de dicho ciclo. La ubiquitina interviene también en la reparación del DNA, embriogénesis, la regulación de la transcripción, la apoptosis, etc.

Función de la ubiquitina

Las proteínas existen como una cadena lineal de aminoácidos que puede degradarse con el tiempo, ya que tal reacción es termodinámicamente favorable en medio acuoso. La degradación temporal de las proteínas se denomina recambio proteico «protein turnover». La relación entre la degradación de una proteína y su síntesis es lo que determina la concentración de esa proteína dentro de la célula. De este recambio proteico se deduce que algunas proteínas tienen una vida media larga y otras una vida media corta. Las primeras constituyen la mayoría de las proteínas celulares, mientras que las de vida corta son típicamente proteínas reguladoras clave y proteínas anormales o defectuosas. Las proteínas anormales suelen encontrarse parcialmente plegadas.

La ubiquitina tiene una función muy importante, que es la vigilancia del recambio proteico en la célula, regulando estrictamente la degradación de proteínas específicas. Mediante la degradación proteica, las células pueden rápidamente eliminar una proteína que, a

su vez, regulaba otra función. Esto es lo que ocurre con un factor de transcripción necesario para la expresión de un gen particular. Además, esta forma de control es muy efectiva, ya que la eliminación de una proteína reguladora asegura que el proceso regulador efectuado por esa proteína se ha desconectado. En este contexto, una estrategia alternativa es simplemente inactivar las proteínas no deseadas, cambiando su conformación.

La simple hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas no necesita energía, sin embargo, la ubiquitina funciona de manera dependiente del ATP. La razón es que para degradar determinadas proteínas, éstas tienen que ser ubiquitinadas o específicamente marcadas para ser reconocidas por la maquinaria que va a realizar la degradación. La ubiquitina no degrada proteínas, su misión es etiquetarlas para la degradación que va a ser efectuada por el proteosoma 26S.

Conjugación de la ubiquitina

El proceso de conjugación de la ubiquitina, demostrado por Avram Hershko, es reminiscencia de la activación de los aminoácidos y ocurre en tres etapas: 1) En una reacción dependiente de ATP, el carboxilo terminal de la ubiquitina se conjuga mediante un enlace tioéster con el enzima activador de la ubiquitina E1. 2) La ubiquitina se transfiere a un grupo SH del enzima conjugador, transportador de ubiquitinas (E2). 3) La ubiquitina ligasa E3 transfiere la ubiquitina activada en E2 a un grupo ϵ amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico. Al parecer E3 es clave en la selección de la proteína a degradar.

El enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina. En esta reacción, la ubiquitina se une al enzima activador de la ubiquitina (ubiquitin activating enzyme) E1, mediante un enlace tioéster de alta energía, entre el carboxilo terminal del residuo de glicocola y el residuo de cisteína del sitio activo del enzima E1 (E1-S-Ub). En esta reacción el enzima E1 hidroliza el ATP a AMP y PPi, con la intermedia formación de un E1- ubiquitin adenilato (Figura 2). La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 a un miem-

bro de una familia denominada proteína transportadora de ubiquitina (ubiquitin carrier protein) E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1 (E2-S-Ub). La ubiquitina, de esta manera, puede ser transferida directamente desde el enzima E2 al sustrato proteico, al que se une mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo amino de lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación [5].

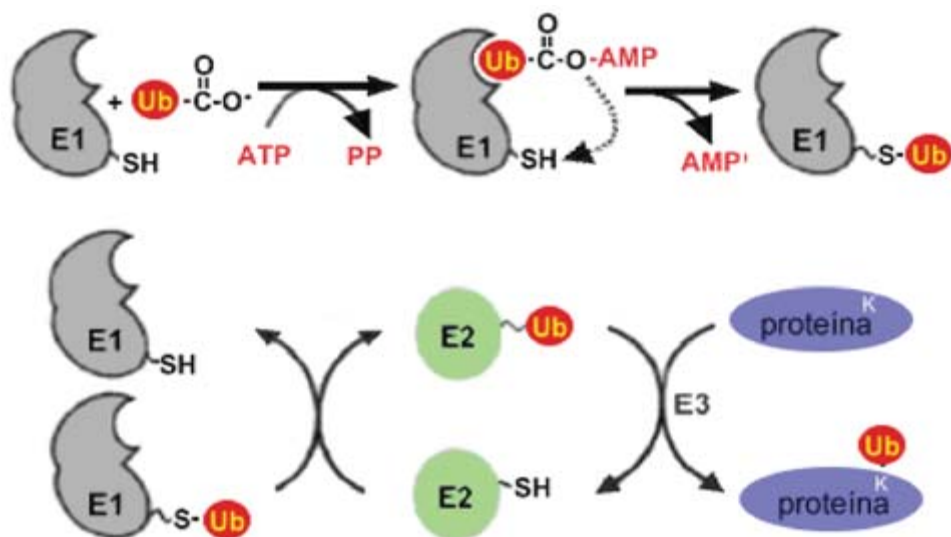


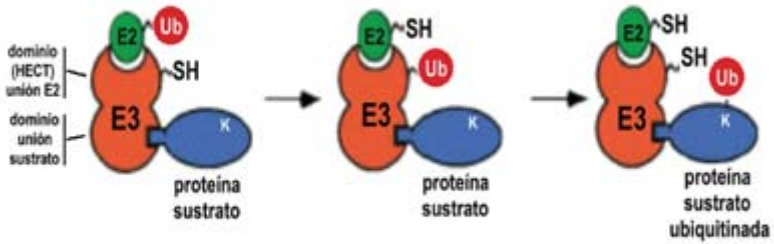
FIGURA 3. Una molécula de ubiquitina se adenila en presencia del enzima E1 y ATP.

Posteriormente, la ubiquitina se une por su carboxilo terminal a un grupo SH de un residuo cisteína en E1, formando un enlace tioéster de alta energía y liberando AMP . La ubiquitina así activada se transfiere entonces desde el enzima E1 al enzima transportador E2, formando un enlace tioéster similar al formado anteriormente con el enzima E1. La ubiquitina se transfiere directamente al sustrato proteico mediante un enlace isopeptídico con el grupo ϵ de un residuo lisina (K) del sustrato. Otras reacciones de conjugación requieren la intervención de un tercer enzima, la ubiquitina ligasa (E3). E3 se une a la proteína sustrato y también a E2 para formar un complejo E2-E3-sustrato. La formación y reconocimiento de dicho complejo tiene una alta especificidad de sustrato para la cascada de conjugación.

El enzima E1, activador de la ubiquitina, es esencial en la ubiquitinación y degradación proteica. Su inactivación a temperatura elevada causa la pérdida de un 80 por 100 de la proteólisis [6]. Existe un solo E1, producto de un solo gen. El enzima E2 es la proteína transportadora de la ubiquitina. Existen 50 tipos diversos, que son polipéptidos pequeños de unos 150 residuos que contienen en su sitio activo un residuo de cisteína, además de presentar una identidad elevada entre ellos. El enzima E3, ubiquitin-ligasa [7], es un polipéptido de 225 kDa, que reconoce el objetivo. E3 actúa a modo de puente de interacción entre E2 y el sustrato. Existen más de 100 tipos de E3 con especificidad para un solo sustrato. E3 se muestra en dos formas: con dominio HECT y con dominio RING finger, ambos poseen también dominios de enlace a E2 (Figura 4).

El dominio HECT de la ligasa E3 debe su denominación a *Homologous E6-AP C-terminus*, siendo E6-AP un factor celular que induce la poliubiquitinación de p53, requerida para la transformación mediada por el virus del papiloma humano. El dominio HECT consiste en una secuencia de 350 aminoácidos con una protuberancia helicoidal N-terminal de 100 aminoácidos como una mezcla separada de hélices α y láminas β , que incluye una cisteína cerca del N-terminal, directamente implicada en la transferencia de ubiquitina. Varios motivos WW actúan como sitios de unión de fosfoserina. Las ligasas HECT-E3 sirven como adaptadores para unir el sustrato a una E2 específica, formando un intermediario en el cual la ubiquitina se une a la cisteína conservada. El dominio RING finger de la ligasa E3 debe su denominación a: *Really Interesting New Gene*. Contiene una estructura en doble bucle rica en cisteína formados por dos átomos de Zn. Este dominio actúa a modo de soporte donde se unen el enzima y el sustrato o subunidades juntas. Las ligasas RING finger E3 incluyen tanto las de cadena sencilla como los grandes complejos APC y SCF implicados en el ciclo celular. Una complicación adicional para estudios genómicos es que algunas las ligasas E3 son complejos de varias subunidades proteicas [8].

A. dominio HECT



B. dominio RING

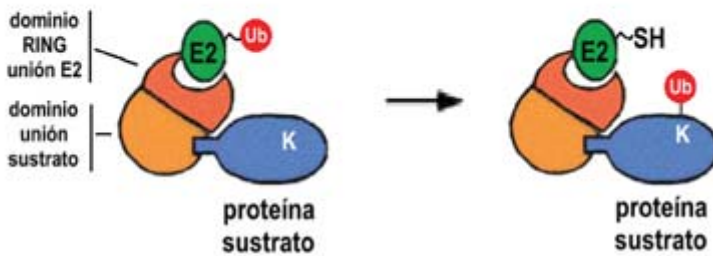


FIGURA 4. Formas de la ubiquitina ligasa E3. A) Dominio HECT. B) Dominio RING finger.

La diversidad de la maquinaria ubiquitina-proteosoma la proporciona las múltiples formas de E3 con capacidad para reconocer a un grupo específico de sustratos.

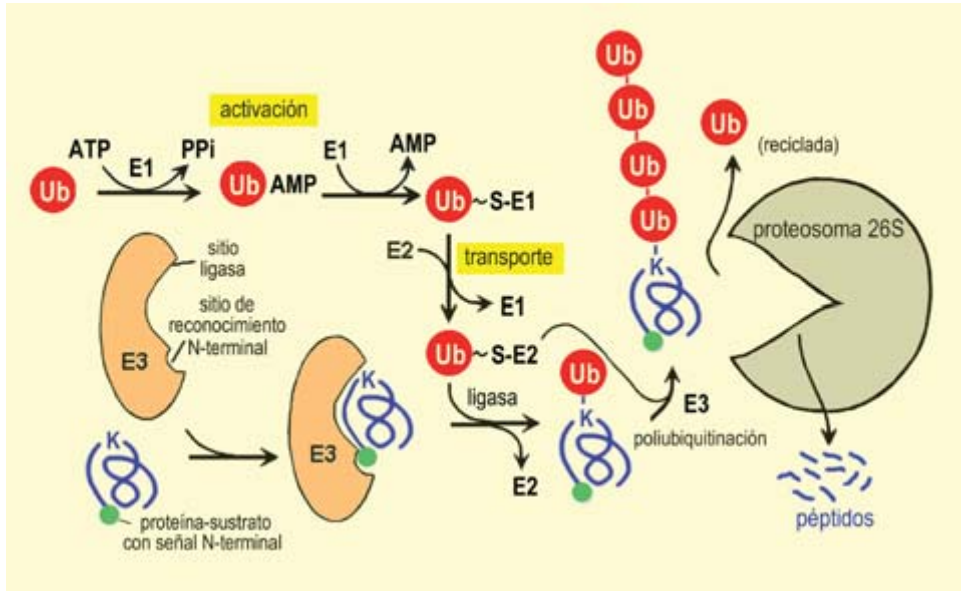


FIGURA 5. Mecanismo de la vía ubiquitina proteosoma donde se muestra en la E3 ligasa los sitios de reconocimiento del N-terminal de la proteína y el sitio catalítico ligasa.

Xie y Varshavsky [9] han demostrado que Ubr1p y Ufd4p componentes de dos diferentes ligasas E3, interaccionan directamente con el proteosoma 26S. Ubr1p se une específicamente a las proteínas Rpn2p, Rpt1p y Rpt6p del complejo 19S, y Ufd4p se une a la Rpt6p. Estos hallazgos sugieren que una ligasa E3, unida al sustrato, participa en el envío de sustratos al proteosoma.

Desubiquitinación

Las proteínas ubiquitinadas no sólo son sujetos de la degradación, pues el proceso de ubiquitinación es reversible y dichas proteínas pueden perder la cadena de ubiquitina mediante la acción de unas enzimas denominadas desubiquitininas. Estos enzimas desubiquitinantes o isopeptidasas (UCH, UBP, DUB) son responsables de la vuelta de la ubiquitina a su estado monomérico, manteniendo el «pool» celular de ubiquitina funcional (Figura 6). Los sustratos de estos enzimas desubiquitinantes incluyen:

- a) formas precursoras de la ubiquitina;
- b) conjugados resultantes de reacciones colaterales no específicas de E1-S-Ub / E2-S-Ub con nucleófilos celulares; y
- c) sustratos ubiquitinados y cadenas poliubiquitinadas unidos covalentemente.

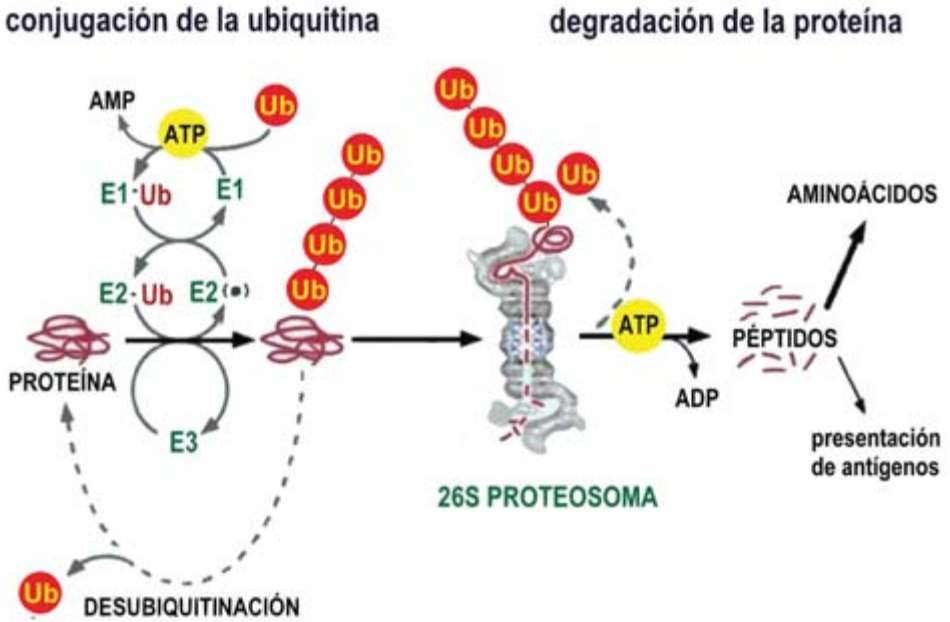


FIGURA 6. Liberación de monómeros de ubiquitina para su reutilización. La ubiquitina puede ser liberada a partir de la propia proteína ubiquitinada por acción de los enzimas desubiquitinantes, como proceso inverso al de conjugación. Otra vía es mediante las isopeptidasas presentes en el complejo 19S del proteosoma.

Etiqueta Sumo

A veces son sutiles diferencias las que condicionan el destino de las proteínas. Así como con la señal de ubiquitina, la proteína está condenada al desguace, si en ese mismo lugar tuviera la etiqueta SUMO, dicha proteína se «salvaría» de ser degradada por el proteosoma. Por un proceso enzimático similar al de ubiquitinación, la

proteínas pueden ser «sumoiladas», es decir, se les coloca la marca o etiqueta SUMO. Estas proteínas ya no se degradan, SUMO les ha cambiado su destino intracelular. Por ejemplo, una proteína de citoplasma que está «sumoilada» puede ir a núcleo y allí regular la transcripción del DNA.

Proteolisis: la señal de destrucción

Hasta los primeros años ochenta del pasado siglo, la degradación proteica fue un área de investigación poco atendida por los científicos, ya que la mayoría de ellos se encontraban ocupados en describir el código genético y su traducción al proteoma. Se pensaba que la destrucción de las proteínas celulares era un proceso terminal no específico. Aunque se sabía que las proteínas tenían que destruirse, no se apreció entonces, en toda su magnitud, la especificidad del proceso y su repercusión en el control de numerosos procesos celulares. El descubrimiento del lisosoma por Christian de Duve no produjo cambios significativos en estas ideas, ya que estaba claro que este orgánulo se encuentra implicado principalmente en la degradación de proteínas extracelulares y sus proteasas no eran sustrato-específicas. El descubrimiento de la cascada compleja de la vía ubiquitina-proteosoma supuso una revolución y a partir de aquí, la degradación de las proteínas ha adquirido una nueva dimensión. Hoy se sabe, gracias a los trabajos de los investigadores premiados con el Nobel 2004 [2-5, 10], que la degradación de las proteínas celulares mediante el sistema ubiquitina es un proceso complejo, enormemente controlado en el tiempo y estrictamente regulado, que se encuentra involucrado en numerosos procesos básicos de la vida y la muerte de la célula, en la salud y la enfermedad.

Durante muchos años, el concepto que pretendía atribuir una significación fisiológica a la proteolisis intracelular fue ampliamente descartado, porque degradar proteínas, de una manera programada, parecía un desperdicio energético. También fue rechazado otro concepto que trataba de encontrar a la destrucción específica de proteínas, un papel en la regulación fisiológica de las vías de transducción de señales, ya que sería necesario sintetizar las proteínas de nuevo. Tales prejuicios resultaron erróneos, ya que las proteínas son degradadas continuamente de acuerdo con las necesidades fisiológicas. La

proteolisis intracelular tiene componentes lisosómicos y no lisosómicos, siendo los últimos los mediados por el sistema de la ubiquitina-proteosoma. Debe existir interrelación entre ambas formas de proteolisis que están comenzando a ser aparentes.

¿En qué consiste la proteolisis mediada por ubiquitinación? La ubiquitina al unirse a proteínas, éstas quedan marcadas para su destrucción. Para que este marcaje sea posible es preciso que la ubiquitina se active previamente en un proceso que consume energía. Dicho de otro modo: la ubiquitina es una etiqueta costosa que marca a las proteínas para que sean posteriormente destruidas. El otro protagonista del proceso es el proteosoma, una gran molécula de forma cilíndrica que reconoce y se une a las proteínas ubiquitinizadas y las destruye en su interior consumiendo también energía. Antes de que esto tenga lugar, las unidades de ubiquitina se liberan para ser reutilizadas. Aunque costoso, este procedimiento es rápido y eficaz.

La proteolisis está mediada por proteasas dependientes de ATP, esenciales, intracelulares y ubicuas, denominadas proteosomas o proteasas multicatalíticas. Los proteosomas degradan una amplia variedad de proteínas citoplásmicas, nucleares y de membrana, que hayan sido marcadas para su degradación mediante la inserción de moléculas de ubiquitina [5, 11, 12]. Los proteosomas de eucariotas son grandes complejos proteicos de alrededor de 2,500 kDa, con arquitectura modular [13, 14] (Figura 7). El proteosoma es una proteasa multimérica, que cataliza el paso final de la degradación de las proteínas intracelulares, vía de ubiquitina-proteosoma. El proteosoma existe en múltiples formas en las células eucariotas. En todas las isoformas se encuentra el núcleo catalítico (CP) conocido como proteosoma 20S. La hidrólisis del ATP se requiere para el desplegamiento de la proteína que le permita la accesibilidad al núcleo catalítico.

El núcleo catalítico del complejo, el proteosoma 20S, de 720 kDa, es una partícula cilíndrica que consiste en cuatro anillos con siete subunidades diferentes cada uno, que están presentes en dos copias y en una sola localización, de forma que la partícula presenta una simetría doble [11, 13, 15, 16] (Figura 7). Los cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos están formados por subunidades α o β , unidas axialmente formando una estructura $\alpha \beta \beta \alpha$, con centros

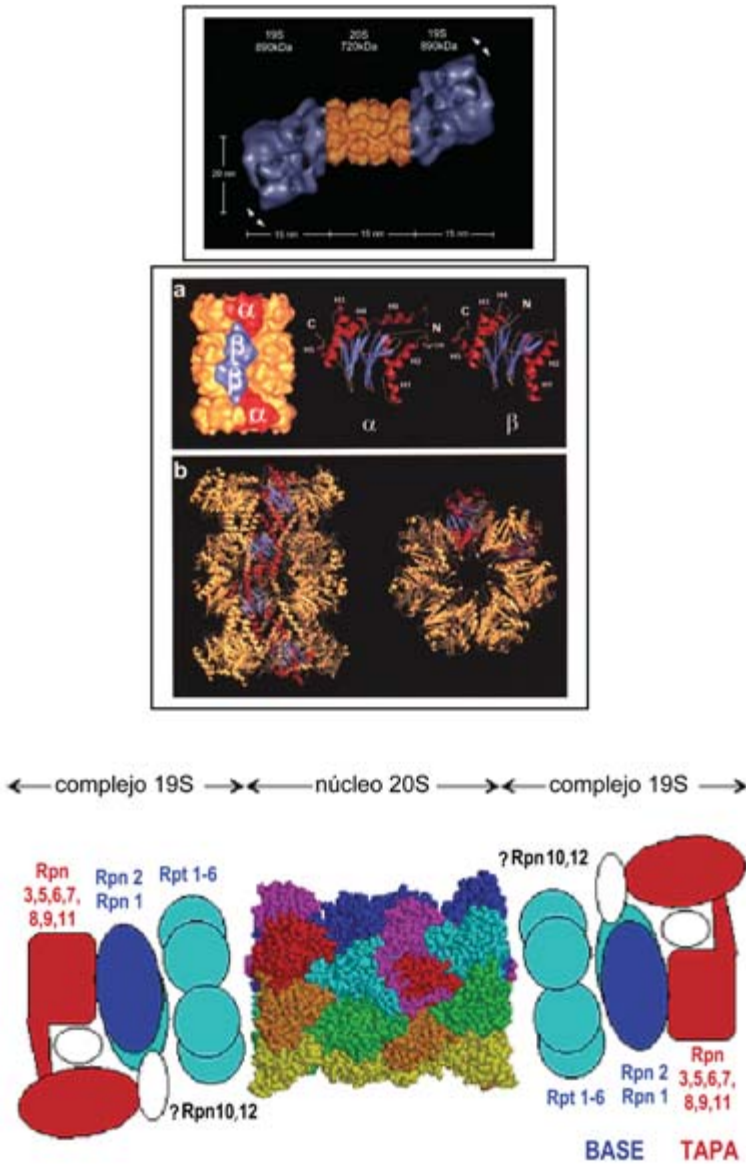


FIGURA 7. Distintas representaciones del proteosoma 26S.

multicatalíticos localizados dentro de la cavidad interna de las subunidades β . La cavidad interna posee un diámetro de 13 Å (Figura

ra 6). El proteosoma 20S se caracteriza por tres actividades proteolíticas distintas: tipo quimiotripsina (Tir o Fen), tipo tripsina (Arg o Lis) e hidrolasa peptidilglutamil (Glu).

Las subunidades del proteosoma 20S de levadura son de dos clases filogenéticamente diferentes, relacionadas a las dos subunidades α y β del proteosoma de las arqueobacterias [17] y se denominan subunidades α y β [18]. Las subunidades α no son catalíticamente activas y forman antecámaras de la cavidad central del complejo 20S, que está formado por las subunidades β . En los proteosomas de *Thermoplasma acidophilum* todas las subunidades β son transcritas y traducidas a partir de un solo gen y se expresan como precursores. En el proceso de maduración de las partículas, todas las copias de la subunidad β llegan a ser activas, de forma que se forman dos anillos con siete sitios catalíticos cada uno en las paredes internas de la cámara central. El aminoácido treonina N-terminal está expuesto en la subunidad β como un nucleófilo catalítico en la hidrólisis del enlace peptídico [19-21]. En base a la estructura cristalina del proteosoma 20S del *T. acidophilum*, la distancia entre las treoninas del sitio activo se considera el patrón molecular que determina la distribución de la longitud de los péptidos generados por el proteosoma. La clasificación del proteosoma 20S como una treonina proteasa se debe al reconocimiento covalente de un residuo Treo en una subunidad β en proteosomas de mamíferos por el inhibidor específico del proteosoma, la lactacistina, un metabolito fúngico [22].

La forma del proteosoma que reconoce y degrada estas proteínas poliubiquitinadas es el proteosoma 26S. Este complejo multienzimático de 2.500 kDa de masa molecular está formado por el núcleo catalítico de 20S, antes mencionado y dos copias de un complejo regulador de 19S (Figura 7).

El complejo regulador (RP) está compuesto de 18 subunidades de tamaños diferentes, desde 25 kDa a 110 kDa y hasta la fecha se le conocen las siguientes misiones: receptor para la cadena de ubiquitina, actividad ATPasa necesaria para desplegar la proteína y actividad isopeptidasa desubiquitinante. RP está formado por una base, en íntimo contacto con el núcleo de 20S y con la entrada al canal y una cubierta o tapa. Las subunidades de este complejo RP se clasifican en Rpt (trifosfatasa RP) y Rpn (RP no ATPasa).

La base contiene Rpt 1-6 (de 48 kDa cada una) formando un anillo hexamérico en contacto directo con el anillo de subunidades α del extremo del núcleo 20S y tienen similitud de secuencia con las proteínas AAA (ATPasas Asociadas con Actividades celulares). Las proteínas AAA son enzimas implicados en el transporte de membrana en el cual se verifican movimientos interdominios en conjunción con la hidrólisis del ATP. Estos seis componentes Rpt se requieren para la funcionalidad del proteosoma 26S. Rpn 1 y Rpn2 son repeticiones ricas en leucina. Rpn 10 se encuentra en el dominio de unión a la ubiquitina. Existen además repeticiones KEKE. Las funciones de la tapa o cubierta del RP incluyen el reconocimiento y eliminación de las cadenas de ubiquitina de la proteína sustrato [23, 24] (Figura 9).

Cada RP (complejo de 19S) es de mayor tamaño que el CP (complejo de 20S). El menor coeficiente de sedimentación del RP se debe a su estructura menos compacta.

La ubiquitinación intensifica la unión de las proteínas al RP, posiblemente porque la ubiquitina prolonga el tiempo de unión al proteosoma para que se verifique el desplegamiento, acontecimiento que es limitante. Si se aumenta la estabilidad de la proteína sustrato, por ejemplo, por unión a un ligando de alta afinidad, el ritmo de degradación se reduce debido a un desplegamiento más lento. Esto sucede cuando el análogo del sustrato metotrexato se une a la dihidrofolato reductasa. Las cadenas de poliubiquitina elevan significativamente la afinidad de una proteína para el RP.

La proteólisis por el proteosoma no es arbitraria, sigue un método. Aunque las unidades catalíticas actúan como endopeptidasas, porque no son las uniones terminales las que se rompen, el modo de acción preferido es por roturas sucesivas comenzando cerca del N-terminal y produciendo fragmentos de 4 a 25 aminoácidos, con una media de 8 a 9 residuos. Como la proteólisis se verifica siguiendo un proceso, las roturas se verifican de manera secuencial, una tras otra.

El mecanismo general de degradación de las proteínas poliubiquitinadas es: 1) Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinado por el receptor en el complejo 19S; 2) despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP; 3) introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido

la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas; 4) rotura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos, y 5) salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto.

Señales de degradación

¿Qué es lo que determina que una proteína sea marcada para la degradación? Las proteínas contienen una serie de señales que aparentemente son reconocidas por la vía de la ubiquitina:

1. N-degrón. En 1986, Varshavsky [25] demostró la existencia de una correlación entre la vida media de una proteína y su aminoácido N-terminal. Esta observación dio lugar a la regla del N-terminal (N-end rule), mediante la cual se puede predecir la vida de una proteína en base a su residuo N-terminal. Por ejemplo, las proteínas que tienen Ser como aminoácido N-terminal tienen vida larga, con vida media de más de 20 horas, mientras que las que tienen Asp como aminoácido N-terminal, tienen una vida media de sólo 3 minutos. Se desconoce el mecanismo que acopla el reconocimiento del aminoácido N-terminal con la vida media de la proteína. Sin embargo, es interesante destacar que la regla del N-terminal se aplica a las bacterias, aunque ellas no contienen ubiquitina.

2. Ciertas secuencias de aminoácidos parece que son señales de degradación. Una de tales secuencias se conoce como PEST, porque secuencias cortas de unos ocho aminoácidos están enriquecidas con Prolina, ácido glutámico (E), Serina y Treonina. Un ejemplo es el factor de transcripción Gcn4p, proteína de 281 aminoácidos cuya secuencia PEST se encuentra en las posiciones 91-106. La vida media normal de esta proteína es de unos 5 minutos, pero si se elimina la secuencia PEST, la vida media se eleva a 50 minutos.

3. Algunas señales de degradación pueden estar enmascaradas u ocultas si forman parte de interacciones proteína-proteína, o por inserción covalente de grupos fosfato o cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Ambos mecanismos permitirían así un mejor control, ya que esta señal de degradación sólo necesita ser desenmascarada para que la proteína pueda ser marcada para degradación. Las señales pueden también estar ocultas en el núcleo hidrofóbico. Esto

explica porqué proteínas mutantes o parcialmente plegadas son más propicias para la degradación. Cuando tales proteínas existen en su estado nativo, las señales están ocultas y la proteína tiene vida larga, pero en un estado desplegado, las señales pueden ser detectadas por la maquinaria de la ubiquitina. Esta reacción parece estar obstaculizada por la actividad de las carabinas moleculares.

4. En todas las ciclinas se han localizado secuencias señalizadas de degradación denominadas cajas de destrucción (*destruction box*), formadas por nueve aminoácidos RAALGNISN, que se encuentran presentes entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica.

5. Motivos KFERQ: son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para proteólisis lisosómica, siendo este motivo una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Estas secuencias hacen susceptibles de la degradación lisosómica a aquellas proteínas que la presentan en ciertas condiciones de estrés, como puede ser la retirada del suero en cultivo o en tejidos y organismos por inanición.

Procesamiento de los antígenos por el proteosoma

En los mamíferos la activación del sistema inmune conduce a la liberación del interferon γ . Esto origina que tres subunidades de la partícula núcleo CP (20S) sean reemplazadas por subunidades sustitutas. Los péptidos generados por proteólisis en este proteosoma alterado son reconocidos por proteínas TAP (Transporter Associated with antigen Processing), transportadoras asociadas con el procesamiento de antígenos y transportadas desde el citosol al retículo endoplásmico. Cada péptido se sitúa en un surco en la superficie de una molécula de histocompatibilidad de la clase I (MHCI). Este complejo se mueve a través del aparato de Golgi y se inserta en la membrana plasmática donde es reconocido por los linfocitos T CD8⁺.

Vía de la ubiquitinación-proteosoma y control del ciclo celular

Sin duda alguna, uno de los descubrimientos más importantes en la reciente historia del ciclo celular ha sido reconocer que los reguladores del crecimiento celular están controlados por proteólisis. Aunque este concepto es reciente, desde el descubrimiento de las ciclinas, se vislumbraba la existencia de acontecimientos proteolíticos que podían controlar las transiciones del ciclo celular. Entre las proteínas a degradar se incluyen la mayoría de las ciclinas, los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (ICDK), factores de replicación del DNA, las securinas, que inhiben la pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas después de la replicación del DNA y por supuesto el mismo factor de cohesión, cohesina. El control de la degradación proteica se encuentra a nivel de ubiquitinación, activación de ubiquitina ligasas, conjugación con moléculas ubiquitínicas, fosforilación de objetivos proteolíticos y activación de proteasas de la clase separina [26].

El control del ciclo celular se encuentra en el centro de muchos procesos biológicos y el descontrol en la proliferación celular conduce al cáncer. La división celular es propulsada por la oscilación de las actividades de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), las cuales, a su vez, están reguladas por la síntesis y degradación periódicas de las ciclinas, subunidades reguladoras de las CDK. La destrucción de las ciclinas mediante la vía ubiquitina-proteosoma inactiva las CDK y media la transición unidireccional de un ciclo celular al siguiente [27]. Además de las ciclinas existen también otros reguladores, tales como p27, p53, inhibidor de la anafase, Cdc20, una serie de quinasas y proteínas motoras relacionadas con la quinesina, etc., todas reguladas por la vía proteolítica de la ubiquitina proteosoma. Por tanto, el sistema ubiquitina-proteosoma controla, no sólo las actividades CDK, sino también la ejecución de muchos acontecimientos del ciclo celular más allá del circuito regulador de las CDK.

La progresión del ciclo celular está regulada por mecanismos de vigilancia o puntos de control que aseguran que la iniciación de un acontecimiento se acople con la finalización del acontecimiento anterior. Por ejemplo, una célula no puede entrar en mitosis si no ha

finalizado completamente la replicación del DNA (fase S). Así, los mecanismos de control aseguran la integridad del genoma y la fidelidad de la separación de los cromosomas mediante una ejecución ordenada de los acontecimientos. La inactivación de esos controles es la causa principal de la inestabilidad genómica (Figura 8).

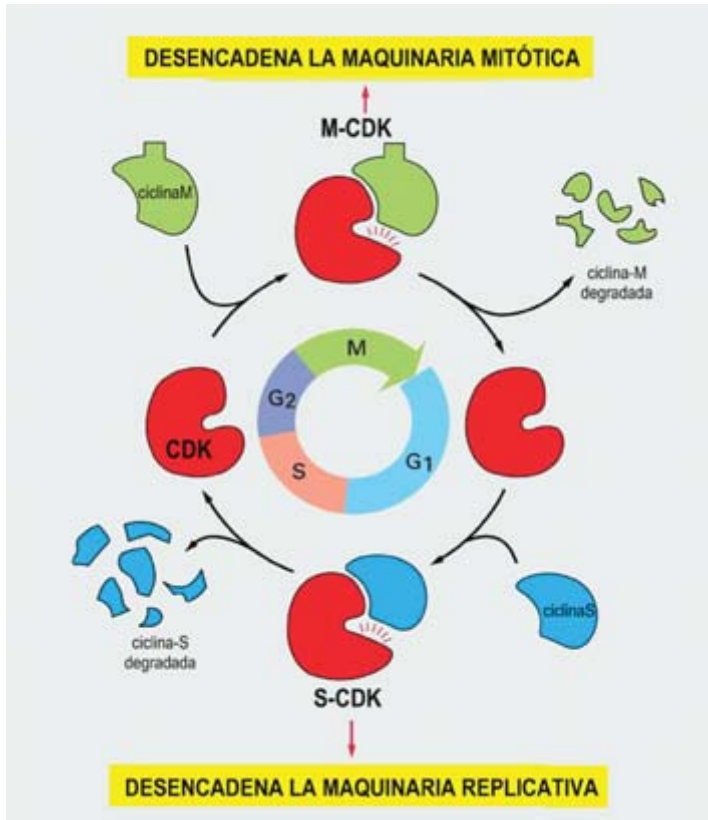


FIGURA 8. La célula usa las ciclinas y las degrada para regular las distintas fases del ciclo celular.

Existen diversos puntos de control del ciclo celular: G1/S, G2/M y M/G1. La proteólisis dependiente de ubiquitina es crítica en dos importantes etapas del ciclo celular: G1/S y M/G1. Complejos ubiquitin ligasas actúan en cada una de estas etapas por un mecanismo diferente.

La progresión G1/S requiere la acción de un complejo denominado SCF (Skp1, Culina y caja F). SCF reconoce proteínas fosforiladas en las secuencias PEST (Prolina, Glutamato/Aspartato, Serina Treonina), sitios comunes en proteínas que tienen un recambio rápido (vida media corta). La proteólisis dependiente de ubiquitina es importante para mantener la progresión del ciclo celular. El SCF poliubiquitina la ciclina D, previa fosforilación de dicha ciclina D por la misma CDK que ella activa y esta fosforilación la señala para ser ubiquitinada por SCF y posterior degradación por el proteosoma (Figura 8).

La entrada en S requiere la degradación proteolítica de un inhibidor de la fase S denominado p27. Para ello, p27 tiene que ser fosforilada en su motivo PEST por la ciclina/CDK de G1, y así puede ser poliubiquitinada por SCF y degradada por el proteosoma. Una vez eliminado el inhibidor p27, la célula puede entrar en S.

En la mitosis funcionan dos puntos de control, uno a la entrada de la mitosis G2/M y el otro en la transición metafase-anafase.

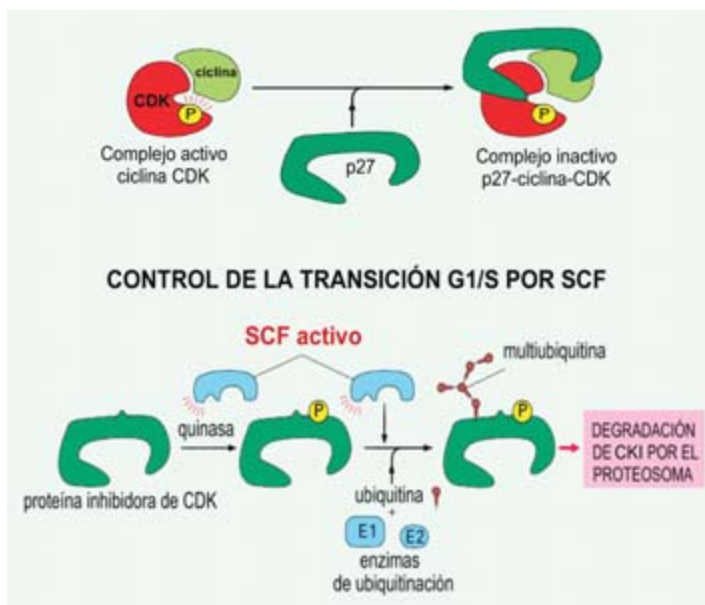


FIGURA 9. Control de la transición G1/S por el SCF, que promueve la degradación del inhibidor de las G1-CDK, la proteína p27.

La mitosis es aquella fase del ciclo celular donde la célula sufre la división celular y la citoquinesis, distribuyendo el material genético igualmente entre las dos células hijas. APC (Anaphase Promoting Complex) es una ubiquitina ligasa E3 compleja, formada por 12 subunidades proteicas. Es un importante regulador de la mitosis que controla la transición metafase-anafase, el movimiento de los cromosomas en la anafase, salida de la mitosis y acoplamiento entre las fases S y M.

El punto de control de la metafase controla la inserción del huso mitótico a los quinetocoros y la tensión generada por la inserción del huso mitótico. En presencia de un solo quinetocoro no inserto, el control de la metafase frena la separación de las cromátidas hermanas y proporciona tiempo adicional para dicha inserción. De esta manera, el control de la metafase asegura la alta fidelidad de la separación de los cromosomas y previene la aneuploidia durante la mitosis.

El punto de control de G2/M funciona cuando una célula entra en mitosis. Vigila los acontecimientos dependientes de los microtubulos, tales como la separación de los centrosomas duplicados en G2, y retrasa la transición en presencia de alteración en los microtubulos. Así, este punto de control determina la duración de la entrada en mitosis y asegura una mitosis productiva.

Ambos puntos de control de la mitosis están regulados por APC (*Anaphase Promoting Complex*), el complejo promotor de la anafase, complejo ubiquitina ligasa, antes mencionado, importante para la transición metafase/anafase durante la mitosis. APC cataliza la ubiquitinación de las ciclinas de la fase M. La regulación de APC es complicada y está parcialmente regulada por fosforilación de las subunidades de APC. La fosforilación de APC por la ciclina/CDK mitótica activa APC para ubiquitinar las ciclinas mitóticas. Su especificidad de sustrato está controlada por diferentes subunidades que forman parte del complejo. Por ejemplo, la degradación de las ciclinas mitóticas se requiere para la iniciación de la separación de los cromosomas. Más tarde, en la telofase, APC comienza a degradar proteínas implicadas en la anafase. Una subunidad que proporciona especificidad para las ciclinas mitóticas se reemplaza por otra que confiere especificidad para las proteínas de la anafase.

En la transición metafase-anafase, la cohesión de las cromátidas hermanas está mediada por las cohesinas. La disolución de tal cohesión corresponde a una cisteína endopeptidasa, la separasa, que actúa sobre la cohesina rompiendo la unión con una de sus subunidades, la Scc1, con lo que queda inactiva. La inactivación de la cohesina permite la separación de las cromátidas y la transición a la anafase. Previamente, la separasa tuvo que dissociarse de su inhibidor, la securina, la cual se degrada por la vía ubiquitina-proteosoma, utilizando la APC, previamente activada por unión con Cdc20.

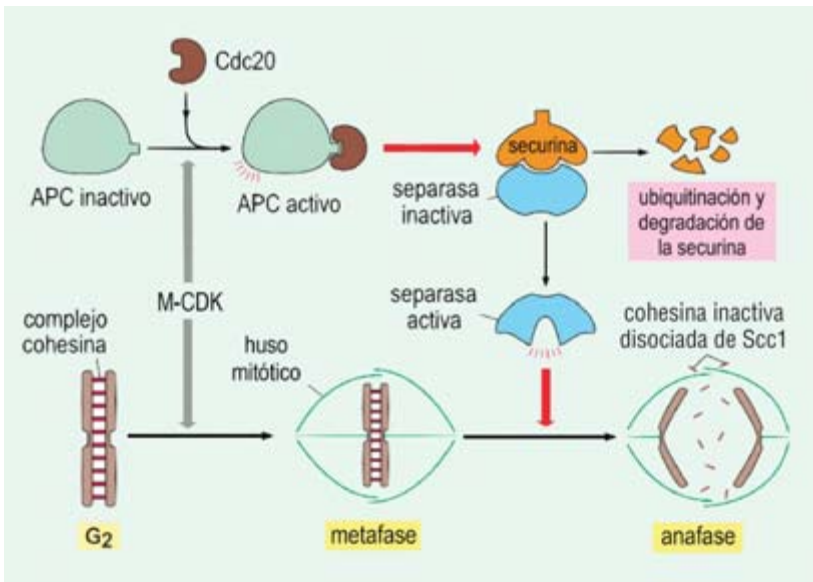


FIGURA 10. Transición metafase-anafase controlada por APC, por degradación de la securina.

De esta manera se observa que la actividad SCF se regula por modificación de los sustratos, mientras que la actividad APC se regula por modificación del complejo APC.

Estudios muy recientes han demostrado que el complejo APC, aparte de su papel en el control de la mitosis, es también importante previniendo la degradación de los sustratos del complejo SCF durante la fase G1, con la consiguiente entrada prematura en la fase S, la cual causaría inestabilidad genómica. Wei *et al.* [29] sugieren que

APC puede tener actividad supresora de tumores mediante su inhibición de Skp2, cuyas elevadas concentraciones se relacionan con la desestabilización de p27 en cánceres humanos.

Ciclo celular y E2F

En células de mamíferos, los factores de transcripción juegan un importante papel en la regulación de la progresión del ciclo celular en la transición G1/S, siendo E2F el ejemplo mejor estudiado. Entre los múltiples mecanismos de control, E2F-1 se degrada por el sistema ubiquitina-proteosoma, pero la ubiquitinación se previene si E2F se encuentra unido a la proteína retinoblastona (Rb) supresora de tumores. Como sólo la forma desfosforilada de Rb puede unirse a E2F-1 y existen muchas formas de Rb fosforiladas, la fosforilación de Rb por las CDK/ciclinas se usa como mecanismo de control. Es interesante que la degradación de E2F-1 se eleva por la oncoproteína E7 del HPV.

Apoptosis

Hasta la fecha, todos los estudios acerca de la relación entre la apoptosis y el proteosoma han insistido en el papel clave que juega el proteosoma en virtud de su capacidad para degradar moléculas reguladoras implicadas en la apoptosis. Sum *et al.* [30] han demostrado que la inducción de la apoptosis puede regular la actividad del proteosoma. Durante la apoptosis, la activación de la caspasa origina la rotura de tres subunidades específicas del complejo regulador 19S del proteosoma: Rpt5 y Rpn10, cuyas misiones son el reconocimiento de los sustratos poliubiquitinados, y Rpn2 que con Rpn1 mantienen unidas la tapa y la base del complejo 19S. Estas roturas mediadas por la caspasa inhiben la degradación proteosómica de sustratos dependientes o independientes de la ubiquitina, incluyendo moléculas proapoptóticas tales como SMAC/Diablo, facilitando así la ejecución del programa apoptótico [31-32].

Por otro lado, IAP (proteína inhibidora de las caspasas), posee un dominio RING Ubiquitina ligasa en el carboxilo terminal. XIAP está también implicada en la ubiquitinación proteica.

El proteosoma puede degradar caspasas e inhibir la apoptosis y a su vez, las caspasas pueden degradar el proteosoma con lo cual se promueve a apoptosis.

Durante la apoptosis, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases), proteína de unión al IAP (inhibitor of apoptosis protein), se libera de la mitocondria y potencia la apoptosis bloqueando la inhibición de las caspasas por el IAP. MacFarlane *et al.* [33] han demostrado que la exposición de células MCF-7 al ligando de muerte TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) originó una rápida salida de SMAC de la mitocondria, lo cual ocurre antes o en paralelo a la salida del citocromo c. La salida de SMAC se inhibe por Bcl-2/Bcl-xL o por un inhibidor pan-caspasa, lo que demuestra que este evento es dependiente de caspasas y modulado por los miembros de la familia Bcl-2. Una vez liberado SMAC, se degrada rápidamente por el proteosoma, efecto suprimido por co-tratamiento con un inhibidor del proteosoma. Como el dominio RING finger de XIAP posee actividad ubiquitin-proteína ligasa y XIAP se une estrechamente al SMAC maduro, un ensayo de ubiquitination *in vitro* reveló que XIAP funciona como una proteína ligasa E3 en la ubiquitinación de SMAC, y que el dominio RING finger de XIAP es esencial para la ubiquitinación y la rápida degradación de la SMAC liberada de la mitocondria. Así que, además de su bien caracterizada misión inhibidora de la actividad caspasa, XIAP protege las células de lesión mitocondrial accidental marcando las moléculas pro-apoptóticas para degradación proteosómica.

Proteínas del choque térmico (HSP)

Situaciones de estrés, tales como el calor, isquemia, estrés oxidativo y otros, elevan la concentración intracelular de HSP (HSP72, HSP60 y HSP27). La misión de estas proteínas es proteger las células frente a los agentes estresantes antes mencionados. Las proteínas HS funcionan principalmente como carabinas moleculares implicadas en el transporte, plegamiento, acoplamiento y degradación de proteínas lesionadas o mal plegadas. HS parece que evita que se acumulen proteínas lesionadas en células afectadas por situaciones de estrés [34].

La transcripción específica de un subgrupo de genes, tales como Hsp25 y Hsp75, se induce en condiciones de bloqueo de la actividad del proteosoma. Los inhibidores del proteosoma 26S, MG 132 y lactacistina indujeron la hiperfosforilación y la actividad de unión al DNA del factor de transcripción heat shock 1 (HSF1), que es el factor clave en la regulación de la expresión de las HSP 70 y HSP 27 [35]. Exceptuando esta expresión específica de las HSP, la inhibición del proteosoma 26S parece inhibir la síntesis proteica en general, aunque hasta la fecha no se ha propuesto ningún mecanismo e incluso hay autores que rechazan esta disminución global de la síntesis proteica [36].

Trabajos también recientes [37] han tratado de inhibir simultáneamente la actividad de la HSP90 mediante el antibiótico geldamicina y el proteosoma mediante el Bortezomid. Ambos compuestos, cuando fueron simultáneamente administrados, inhibieron la proliferación de células tumorales MCF-7 mucho más intensamente que cuando se administraron por separado. También, ambos compuestos asociados promovieron la acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas potencialmente citotóxicas, lo que indica que la ubiquitinación se encontraba incrementada. Estas observaciones, obtenidas por acción de geldamicina en combinación con el Bortezomid, apoyan la existencia de un mecanismo que interrumpe la función de la HSP90 y del proteosoma, promueve la acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas y da como resultado una actividad antitumoral elevada.

Reguladores de la transcripción

P53. P53 es un factor de transcripción de vida media relativamente corta que ejerce un efecto antiproliferativo y actúa como señal para la reparación del DNA. Originalmente se encontró que la proteína E6 del virus del papiloma humano mediaba la ubiquitinación de p53 en asociación con el factor E6-AP, el arquetipo de las proteínas E3 con dominio HECT. Frente a una lesión del DNA inducida por estrés, p53 se estabiliza transitoriamente para actuar como activador transcripcional para genes apropiados que inducen la parada del ciclo celular, y ejercer así sus funciones apoptóticas. Durante este intervalo, la concentración intracelular de p53 se eleva. Simul-

táneamente la transcripción de la oncoproteína Mdm2 se incrementa como contrapartida autoreguladora. Se ha demostrado recientemente que Mdm2 es la ubiquitina ligasa específica de p53 que marca a p53 para la degradación por el proteosoma (Figura 11). Así que el intervalo entre la estabilización de p53 y la proteólisis inducida por los elevados niveles de Mdm2, proporciona a p53 un período de tiempo para completar sus actividades reparadoras y permitir la progresión del ciclo celular. La degradación de p53 se acelera por la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV), que interacciona con E3-E6-AP, para conseguir una rápida ubiquitinación de p53. Por tanto, la infección de las células con HPV permite la proliferación celular y previene la apoptosis [38, 39].

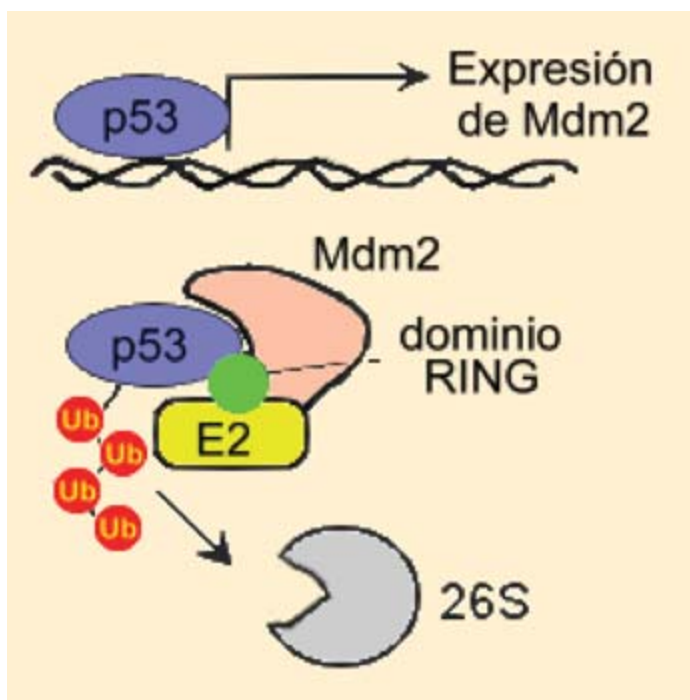


FIGURA 11. *Mecanismo de acción de p53 y Mdm2 en relación con el sistema ubiquitina/proteosoma.*

NF κ B. Entre los factores de transcripción cuya actividad está modulada por el sistema ubiquitina proteosoma, se encuentra el

caso de los varios miembros de la familia de factores de transcripción inducibles Factor Nuclear κ B (NF- κ B), implicados en procesos inflamatorios, inmunes, de estrés y del desarrollo. Este factor se activa mediante un mecanismo que consta de dos etapas. Inicialmente, la proteína precursora p105 se rompe y genera la subunidad activa p50. Este es un caso particular en el cual p105 se procesa de una manera limitada en lugar de ser destruida completamente. p50 entonces se asocia con p65 para generar el activador transcripcional heterodimérico que está secuestrado inactivo en el citosol, formando un complejo heterotrimérico con el inhibidor I κ B. Después de un estímulo celular (citoquinas, componentes víricos, bacterianos o situaciones de estrés), se induce la fosforilación del inhibidor I κ B en un residuo Ser específico, lo cual conduce a la rápida ubiquitinación de dicho inhibidor y posterior degradación por el proteosoma. Al quedar libre y activo, el heterodímero (p50-p65) NF- κ B puede trasladarse al núcleo, donde inicia la transcripción específica de genes, uniéndose a los promotores o intensificadores de más de sesenta genes (Figura 12).

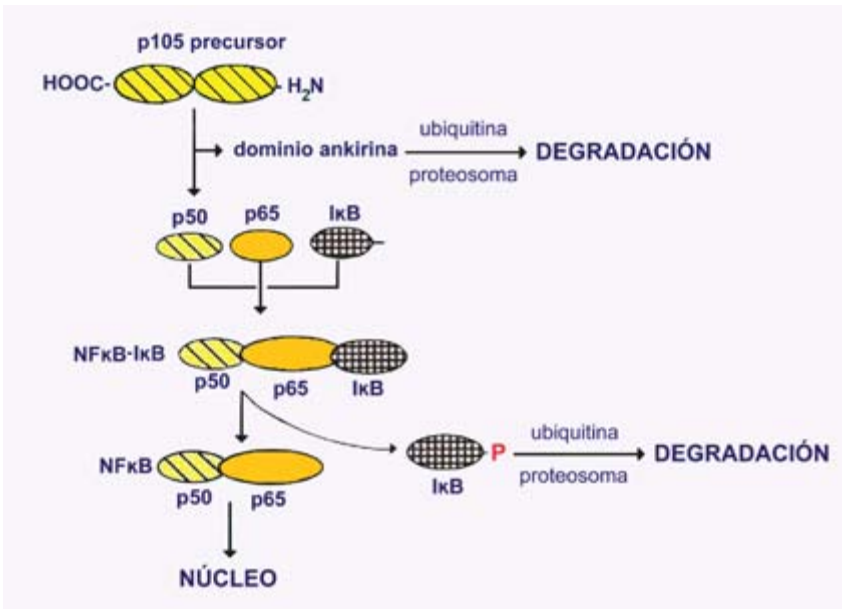


FIGURA 12. Implicación del sistema ubiquitina/proteosoma en el procesamiento del NF- κ B.

El grupo de Ciechanover ha reconstituido, tanto *in vitro* como *in vivo*, la cascada de activación del NF- κ B, han identificado las señales que protegen a p105 de la destrucción completa, y caracterizado los enzimas E2 y E3 implicados en el proceso de activación [40-42].

La activación del NF- κ B juega un importante papel en muchos aspectos del desarrollo tumoral, progresión y terapia. Algunos tipos de cáncer se caracterizan por actividad constitutiva del NF- κ B, mientras que en otros, tal actividad se induce como consecuencia de la quimioterapia. Los tumores inducidos por el NF- κ B son generalmente resistentes a la quimioterapia y su erradicación requiere la inhibición del este factor de transcripción. Amit y Ben-Neriah [43] han descrito los mecanismos de activación del NF-B en células normales y tumorales. El nombre, Nuclear Factor- κ B procede de su descubrimiento como factor de transcripción que se une al intensificador del gen del anticuerpo kappa de cadena ligera. Sin embargo, también activa genes que codifican para IL-1 y otras citoquinas que promueven la inflamación. Los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides se originan por su capacidad para elevar la producción de I κ B.

El NF- κ B también activa la transcripción de genes necesarios para proliferación celular, adhesión celular y angiogenesis.

Otros. Otros factores de transcripción se degradan rápidamente en células de mamíferos por la vía de la ubiquitina proteosoma, tales como c-Jun y c-Fos, pero no sus homólogos transformantes v-Jun or v-Fos. La degradación del c-Jun de mamíferos se induce por quinasas activadas por mitógenos.

El complejo factor inducible por hipoxia (HIF-1) que estimula la síntesis de la eritropoyetina se compone de dos subunidades: HIF α y HIF β . En condiciones normales, este complejo es inactivado por proteólisis del HIF α .

Enfermedad

En el sistema ubiquitin-proteosoma, una proteína sustrato sufre una modificación por la ubiquitina o por una proteína ubiquitínica. Esta modificación remodela la superficie de la proteína sustrato,

afectando entre otras propiedades, su estabilidad, interacciones con otras proteínas, actividad y localización subcelular. En muchos casos las proteínas son modificadas por muchas ubiquitinas que generan una cadena ramificada de poliubiquitina. Para la mayor parte de las proteínas, estas modificaciones de la proteína conducen a su degradación por el proteosoma 26S. Además, dependiendo del carácter de la unión entre las ubiquitinas, las modificaciones pueden conducir a la activación de reguladores de la transcripción. Modificaciones por monoubiquitinación puede marcar las proteínas para su degradación lisosómica. La conjugación de ubiquitina o proteínas ubiquitínicas puede servir también para producir una variedad de funciones no proteolíticas, tales como activación de enzimas, modulación de la dinámica de la membrana, o dirigir a las proteínas marcadas a su destino subcelular.

La ubiquitinación de las proteínas celulares es un mecanismo complejo y estrictamente controlado que selecciona de manera específica multitud de proteínas. Cualquier alteración o aberración que afecte este mecanismo tiene que influir en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como ciertas malignidades, enfermedades neurológicas y patologías de los sistemas inmune e inflamatorio [44-45].

El hecho de que estas modificaciones estén originadas por una cascada modular de enzimas con elevada especificidad hacia motivos estructurales definidos en las proteínas sustratos, hace que tengan que ser consideradas como modificaciones post-traduccionales que juegan importantes misiones en la regulación de un amplio espectro de procesos celulares: división celular, diferenciación, transducción de señales, transporte y control de calidad. No sorprende, por tanto, que las aberraciones en el sistema se hayan implicado en la patogénesis de muchas enfermedades, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y patologías de la respuesta inflamatoria e inmune, entre ellas. Así, se han encontrado relacionadas como primera causa o consecuencia secundaria, en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas transmitidas por herencia o adquiridas. Recientes hallazgos indican que este sistema está involucrado en la patogénesis de enfermedades de Alzheimer [46], Parkinson, Huntington, de los priones y la esclerosis lateral amiotrófica [47]. El conocimiento de los mecanismos que intervienen es importante para el desarrollo de nuevos medicamentos basados en estos mecanismos.

Las mutaciones en el gen de la parkina causa enfermedad de Parkinson juvenil autosómica recesiva. En casos de enfermedad de Parkinson esporádica, la parkina se acumula en los esferoides axonales y en algunos cuerpos de Lewy. Como la ubiquitina es el principal componente de los cuerpos de Lewy y los esferoides axonales, Choi *et al.* [48] decidieron investigar la relación entre la parkina y la ubiquitina. Los datos obtenidos por estos investigadores demostraron que la parkina era un sustrato de esta vía degradativa, y también que la parkina jugaba un papel en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson esporádica. Recientemente se descubrió que la parkina es una E3 ligasa, que regula por ubiquitinación proteínas del ciclo celular (como ciclina E). La mutación de la parkina lleva a la acumulación de ciclina E y esto lleva a la muerte neuronal por apoptosis [49].

Inhibición del proteosoma 26S y terapéutica

El sistema de la ubiquitina se ha convertido en una diana terapéutica interesante para el desarrollo de fármacos frente a diferentes enfermedades. Estos fármacos se dirigirían directamente a los componentes del sistema de proteólisis mediado por la ubiquitina, para prevenir la degradación de proteínas específicas. Además, esos nuevos compuestos pueden también activar el sistema para destruir las proteínas no deseadas.

Bortezomib (Velcade®)

El 13 de mayo de 2003 fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, un fármaco denominado Bortezomib (Velcade®), conocido como LDP-341, para tratar pacientes con mieloma múltiple, un cáncer de las células plasmáticas. Este fármaco bloquea la acción proteolítica del proteosoma [50], y con ello impide el efecto carcinogénico de muchas vías, entre las que cabe citar las siguientes:

1. Al impedir degradar el I κ B se bloquea la acción del factor de transcripción NF- κ B, con lo cual docenas de genes necesarios para la proliferación y adhesión de las células del mieloma no se expresan.

2. Al no degradarse las ciclinas se inhibe el funcionamiento del ciclo celular y en consecuencia la proliferación mitótica de las células cancerosas.

3. Este fármaco parece que funciona especialmente cuando se administra asociado a la quimioterapia convencional porque, probablemente, inhiba la capacidad de las células cancerosas de protegerse frente al daño que les causa la quimioterapia.

4. La inhibición de la Bcl-2 conduce a las células a la apoptosis. La angiogénesis y la metástasis se inhiben también.

5. Su administración ha de ser intermitente y su acción es reversible. Las células cancerosas mueren mientras que las normales sobreviven.

GLOSARIO

APC:	(Anaphase Promoting Complex). Factor promotor de la anaphase, también dominado cicloso. Degrada complejos ciclina-CDK fosforilados de la fase M, securina y B-ciclina.
AAA:	ATPasas Asociadas con Actividades celulares. Enzimas implicadas en procesos de transporte de membrana en los cuales se verifican movimientos entre dominios en conjunción con hidrólisis del ATP.
Cdc20:	Proteína activadora de APC.
CDK:	Quinasas dependientes de ciclinas. Unidades catalíticas del ciclo celular.
Ciclinas:	Unidades reguladoras del ciclo celular.
CP:	Unidad catalítica del proteosoma. Núcleo de 20S y 720 kDa formado por cuatro anillos heteroheptaméricos yuxtapuestos, cada uno contiene siete subunidades distintas α o β y se disponen $\alpha \beta \beta \alpha$.
Culina:	Componentes principales de una serie de ubiquitina ligasas multiméricas.
E6 AP:	Factor celular de ubiquitina p53, requerido para la transformación celular del virus del papiloma mediada por E6. Arquetipo de HECT.

- HECT E3: (Homolous to E6-AP C-Terminus). Secuencia de 350 aminoácidos con una hélice N. terminal de 100 aminoácidos y una cisteína cercana al N-terminal. Sirve como adaptador para un sustrato.
- IAP: Inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos. Su actividad es inhibida por smac.
- KEKE: Dominio hidrofóbico compuesto por residuos de lisina cargados positivamente y residuos de glutamato cargados negativamente.
- MAD: Mitotic Arrest Deficiency. Inhibe APC/Cdc20, se localiza en el quinetocoro.
- Mdm2: Oncoproteína implicada en la degradación de p53.
- MHCI: Complejo de histocompatibilidad I.
- Negron: La señal que representan los aminoácidos N-terminales susceptibles.
- Parkina: E3 ubiquitina ligasa que interviene en la degradación de proteínas. La mutación del gen se relaciona con la enfermedad de Parkinson juvenil.
- PEST: Secuencias de reconocimiento para la degradación: Pro, Asp, Glu, Ser, Treo.
- RING: Finger (Really Interesting New Gene), E3s (N- end rule) incluyen ubiquitina ligasas de una sola cadena y grandes complejos APC y SCF.
- RP: Unidad reguladora del proteosoma de 19S y 720 kDa. Una en cada extremo del complejo 20S. 18-20 proteínas diferentes.
- Rpn1/Rpn2: (Regulatory proteasome non triphosphatase) (104 kDa) son componentes básicos del complejo 19S, cuya misión es el reconocimiento y eliminación de la ubiquitina de proteínas ubiquitinadas.
- Rpt 1-6: (Regulatory proteasome triphosphatase) (48 kDa cada uno). Forman un anillo hexamérico en directo contacto con el anillo alfa de siete subunidades en ambos extremos del núcleo 20S. Poseen secuencias similares a las proteínas AAA. Todos los Rpn1 se requieren para la funcionalidad del proteosoma 26S.
- SCF: (Skp1, Culin, F box), degrada complejos CDK1-ciclina fosforilados.

- Skp1: Componente de SCF.
 Skp2: Componente de SCF, miembro de la familia F box.
 SMAC: (Second mitochondria-derived activator of caspases). Inhibidor de IAP y de XIAP. Es el segundo activador mitocondrial de la caspasa. Proteína que se une y bloquea la acción inhibitoria de IAP.
 TAP: (Transporter Associated with antigen Processing), Transportador asociado con el procesado de los antígenos.
 XIAP: Proteína inhibitoria de la apoptosis ligada al cromosoma X. Posee tres dominios BIR y un motivo dedo de zinc circular.
 WW: Dominios compuestos por 30 a 40 residuos con dos triptófanos conservados, que une ligandos ricos en prolina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GOLDSTEIN, G.; SCHEID, M. S.; HAMMERLING, V.; BOYSE, E. A.; SCHLESINGER, D. H. & NIALL, H. D. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **72**, 11-15.
- (2) CIECHANOVER, A.; HOD, Y. & HERSHKO, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1100-1105.
- (3) CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A. L. & HERSHKO, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 1365-1368.
- (4) CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; KATZ-ETZION, R. & HERSHKO, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP dependent proteolytic system. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 761-765.
- (5) HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev Biochem* **67**, 425-479.
- (6) FINLEY, D.; CIECHANOVER, A. & VARSHAVSKY, A. (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**, 43-55.
- (7) PICKART, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Ann. Rev. Biochem.* **70**, 503-533.
- (8) TYERS, M. & JORGENSEN, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**: 54-64.

- (9) XIE, Y.; VARSHAVSKY, A. (2000). Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2497-2502.
- (10) GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. (2000). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- (11) HILT, W. & WOLF, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- (12) HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-409.
- (13) BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZÜHL, F. & SEEMÜLLER, E. (1998). The proteasome paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* **92**, 367-380.
- (14) PETERS, J. M.; CEJKA, Z.; HARRIS, R. J.; KLEINSCHMIDT, J. A. & BAUMEISTER, W. (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 932-937.
- (15) COUX, O.; TANAKA, K. & GOLDBERG, A. L. (1996). Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- (16) GROLL, M.; DITZEL, L.; LÖWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D. & HUBER, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature (London)* **386**, 463-471.
- (17) DAHLMANN, B.; KOPP, F.; KUEHN, L.; NIEDEL, B.; PFEIFER, G.; HEGERL, R. & BAUMEISTER, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eucaryotes to archaeobacteria *FEBS Lett.* **251**, 125-131.
- (18) GROLL, M.; HEINEMEYER, W.; JÄGER, S.; ULLRICH, T.; BOCHTLER, M.; WOLF, D. H. & HUBER, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci. USA* **96**, 10976-10983.
- (19) LÖWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICK, P.; BAUMEISTER, W. & HUBER, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- (20) SEEMÜLLER, E.; LUPAS, A.; STOCK, D.; LÖWE, J.; HUBER, R. & BAUMEISTER, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-581.
- (21) HEINEMEYER, W.; FISCHER, M.; KRIMMER, T.; STACHON, U. & WOLF, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-25209.
- (22) FENTEANY, G.; STAENDAERT, R. F.; LANE, W. S. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino terminal threonine modification by lactacystine. *Science* **268**, 726-731.
- (23) PICKART, C. M. (2000). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* **234**, 932-937.
- (24) VARSHAVSKY, A. (1996). The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **21**, 96-102.
- (25) VARSHAVSKY, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**, 13-28.
- (26) CLARKE, D. J. (2002). Proteolysis and the cell cycle. *Cell Cycle*, **1**, 233-234.
- (27) PETERS, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* **9**, 931-943.

- (28) GLOTZER, M.; MURRAY, A. W. & KIRSCHNER, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- (29) WEI, W.; AYAD, N. G.; WAN, Y.; ZHANG, G. J.; KRISCHNER, M. W. & KAEHLIN, W. G. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell cycle phase G1 by the anaphase promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.
- (30) SUN, X. M. M.; BUTTERWORTH, M.; MACFARLANE, M.; DUBIEL, W.; CIECHANOVER, A. & COHEN, G. M. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell*. **14**, 81-93.
- (31) CASCALES, M. (2003). Bases Moleculares de la Apoptosis. *Anal Real Acad Nac Farm* **69**, 43-70.
- (32) CHEN, F.; CHANG, D.; GOH, M.; KLIBANOV, S. A. & LJUNGMAN, M. (2000). Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Differ* **11**, 239-246.
- (33) MACFARLANE, M.; MERRISON, W.; BRATTON, S. B.; COHEN, G. M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* **277**, 36611-36616.
- (34) CASCALES, M. (2002). Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas. *Real Acad Nac Farm Madrid*, pp. 72-77.
- (35) KIM, D.; KIM, S-H.; LI, G. C. (1999). Proteasome inhibitors MG-132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 264-268.
- (36) YERLICAYA, A. (2004). Cellular functions of the 26S proteasome. *Turk J Biol* **28**, 31-38.
- (37) MIMNAUGH, E. G.; XU, W.; VOS, M.; YUAN, X.; ISAACS, J. S.; BIST, K. S.; GIUS, D. & NECKERS, L. (2004). Simultaneous inhibition of hsp90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosol vacuolization and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* **3**, 551-566.
- (38) MURATANI, M.; TANSEY, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 192-201.
- (39) JESENBERGER, V.; JENTSCH, S. (2002). Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**, 112-121.
- (40) BREITSCHOPF, K.; BENGAL, E.; ZIV, T.; ADMON, A. & CIECHANOVER, A. (1998). A Novel Site for Ubiquitination: The N-Terminal Residue and Not Internal Lysines of MyoD is Essential for Conjugation and Degradation of the Protein. *EMBO J*. **17**, 5964-5973.
- (41) ORIAN, A.; GONEN, H.; BERCOVICH, B.; FAJERMAN, I.; EYTAN, E.; ISRAEL, A.; MERCURIO, F.; IWAI, K.; SCHWARTZ, A. L. & CIECHANOVER, A. (2000). SCF-(beta) (-TrCP) Ubiquitin Ligase-Mediated Processing of NF-kappaB p105 Requires Phosphorylation of its C-Terminus by IkkappaB Kinase. *EMBO J*. **19**, 2580-2591.
- (42) COHEN, S.; ORIAN, A. & CIECHANOVER, A. (2001). Processing of p105 is Inhibited by Docking of p50 Active Subunits to the Ankyrin Repeat Domain, and Inhibition is Alleviated by Signaling via the C-Terminal Phosphorylation/Ubiquitin-Ligase Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 26769-26776.

- (43) AMIT, S.; BEN-NERIAH, Y. (2003). NF-kappaB activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach. *Semin Cancer Biol* **13**, 15-28.
- (44) CIECHANOVER, A. & IWAI, K. (2004). The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* **56**, 193-201.
- (45) CIECHANOVER, A. (2003). The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem Soc Trans.* **31**, 74-81.
- (46) CASCALES, M. (1999). Oxidación y degradación de proteínas. En: Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad. *Instituto de España. Madrid*, pp. 91-123.
- (47) CIECHANOVER, A.; BRUNDIN, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. **40**, 427-446.
- (48) CHOI, P.; OSTREROVA-GOLTS, N.; SPARKMAN, D.; COCHRAN, E.; LEE, J. M.; WOLOZIN, B. (2000). Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system. *Neuroreport* **11**, 2635-2638.
- (49) MILLER, R. J.; WILSON, S. M. (2003). Neurological disease: UPS stops delivering! *Trends Pharmacol Sci.* **24**, 18-23.
- (50) ADAMS, J. (2002). Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med.* **8** (4 Suppl): S49-S54.