



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
(Facultad de Farmacia)
GRADO DE FARMACIA

Diversidad Funcional de la Ubiquitinación
de Proteínas
(Revisión Bibliográfica)

Trabajo presentado por:
César Brieva Sánchez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
(Facultad de Farmacia)
GRADO DE FARMACIA
CURSO ACADÉMICO [2015/2016]

Título:

Diversidad Funcional de la Ubiquitinación de Proteínas.

Autor:

César Brieva Sánchez.

Departamento:

Departamento de Bioquímica y Biología molecular.

Tutor:

Dr. Diego Ruano Caballero.

Tipo de Trabajo de Fin de Grado:

Revisión bibliográfica.

Lugar y fecha de presentación:

Facultad de Farmacia 19/9/2016

RESUMEN

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona dependiente de ATP que consiste en la unión covalente de ubiquitina (una proteína muy conservada evolutivamente y altamente estable) a proteínas intracelulares, llevada a cabo por tres enzimas conocidas como: enzima activadora de la ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2), ubiquitina ligasa (E3-ligasa). Esta modificación tiene una gran diversidad de funciones en los seres vivos, que depende del tipo de cadena que forme, las más conocidas se unen en la Lys48 de la ubiquitina que tiene como objetivo la degradación proteosoma y en la Lys63 que participa en la señalización inflamatoria, pero además de estas existen otras cadenas conocidas como “atípicas” a las que pertenecen: Met1, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29 y Lys33. El tipo de cadena no solo depende del lugar de unión, sino que además la longitud de la cadena también otorga una función distinta, podemos encontrar la mono-ubiquitinación, la multi-ubiquitinación y la poli-ubiquitinación. Una de las funciones que desempeña la mono-ubiquitinación es la regulación del tráfico endocítico de los receptores de señalización, canales iónicos, permeasas, transportadores tanto en las levaduras como en las células de mamíferos, también participa en la reparación del ADN donde la multi-ubiquitinación también cumple ciertas funciones. Y finalmente la poli-ubiquitinación que su principal papel es el marcaje de proteínas para su posterior degradación por el proteosoma 26S, a través de la cadena tetramérica de Lys48 como señal canónica, y según recientes estudios las cadenas “atípicas” Lys11 y Lys29, y en cierto modo las Lys63 también están involucradas.

PALABRAS CLAVES: ubiquitinación, ubiquitina, mono-ubiquitinación, multi-ubiquitinación, poli-ubiquitinación.

ÍNDICE

- I. Introducción.
- II. Objetivo de la revisión.
- III. Metodología.
- IV. Resultados y discusión.
 - 1. La Ubiquitina
 - 2. La Ubiquitinación
 - 3. La mono-ubiquitinación.
 - 4. La multi-ubiquitinación.
 - 5. La poli-ubiquitinación lineal.
 - 6. La poli-ubiquitinación ramificada.
 - 7. Los dominios de unión a ubiquitina.
 - 8. Funciones celulares según el tipo de cadena
 - 9. Ejemplos de mono-ubiquitinación y poli-ubiquitinación
- V. Conclusión
- VI. Bibliografía

I. INTRODUCCIÓN

El marcaje selectivo de proteínas con la ubiquitina (Ub), es un proceso conocido como ubiquitinación. Dicho proceso fue descubierto y descrito a finales de los 70 y principios de los 80 por los Nobel de Química: Abraham Hershko, Irwin Rose y Aaron Ciechanover. Demostraron que la degradación selectiva y específica de proteínas estaba mediada por un mecanismo de marcación dependiente de ATP, dicho mecanismo viene dado por la unión covalente de polímeros de la proteína APF1 (factor 1 proteo-lítico ATP-dependiente), conocida actualmente como Ub. (Niño Suárez C., 2011). Estos autores también describieron la maquinaria enzimática encargada de esta marcación, la cual incluye 3 tipos de enzimas:

- Enzima activadora de la Ub (E1): existen 16 diferentes, es la encargada de la activación de la ubiquitina con el consumo de ATP correspondiente.
- Enzima conjugadora de Ub (E2): existen 53 diferentes y transporta la ubiquitina activada al sustrato.
- Ubiquitina ligasa (E3-ligasa): existen 527 diferentes, punto final en la cascada enzimática, encargada de reclutar la E2 que transporta la ubiquitina, reconocer el sustrato y catalizar la transferencia de la ubiquitina de E2 a la proteína sustrato. (Zamudio-Arrollo y Peña-Rangel, 2012)

Los trabajos de Abraham Hershko, Irwin Rose y Aaron Ciechanover permitieron postular posteriormente el proceso de degradación específico de proteínas en las células eucariotas, actualmente conocido como el sistema ubiquitina-proteosoma (SUP). En este sistema las proteínas previamente ubiquitinadas son degradadas por **el proteosoma 26S**. (véase más abajo) (Niño Suárez C., 2011).

Desde entonces y hasta hace relativamente poco se asociaba la ubiquitinación de proteína a los procesos degradativos de proteínas mal plegadas o deficientes. Sin embargo, actualmente se sabe que este proceso va más allá del control de la calidad de proteínas. En este sentido, hoy en día se tienen datos que muestran a la ubiquitinación participa en la regulación de multitud de procesos celulares.

II. Objetivo de la revisión

El objetivo de esta revisión es mostrar la gran diversidad funcional de la ubiquitinación de proteínas:

- Conocer el mecanismo básico del SUP
- Conocer la versatilidad del proceso de la ubiquitinación.
- Presentar ejemplos concretos de las funciones alternativas a la degradación proteica mediante la ubiquitinación.

III. Metodología

Para la realización de esta revisión bibliográfica se han utilizado como recursos, la base de datos Pubmed, usando como palabras claves en la búsqueda: ubiquitination, ubiquitine, functionality, monoubiquitination y poliubiquitination, se han buscado revisiones de los últimos 14 años y se han usado a su vez las referencias de estas. Se ha tomado como base para el trabajo, el artículo: ubiquitine code de Komander, D. y Rape, M. Este artículo se ha usado para la obtención de algunas referencias sobre el tema en cuestión. Se ha utilizado también como recurso de búsqueda “Google Académico” para buscar artículos concretos y también artículos informativos de temática general.

IV. Resultados y discusión:

La Ubiquitina

La ubiquitina es una proteína muy conservada evolutivamente y altamente estable. Estructuralmente posee un pliegue β -comprimido compacto con una cola flexible de seis residuos C-terminal (Figura 1). La mayor parte de los residuos del núcleo son rígidos, pero el bucle β_1 / β_2 que contiene Leu8 muestra una flexibilidad muy importante para el reconocimiento por parte de las proteínas a la hora de producirse la unión de la ubiquitina. (Komander y Rape., 2012)

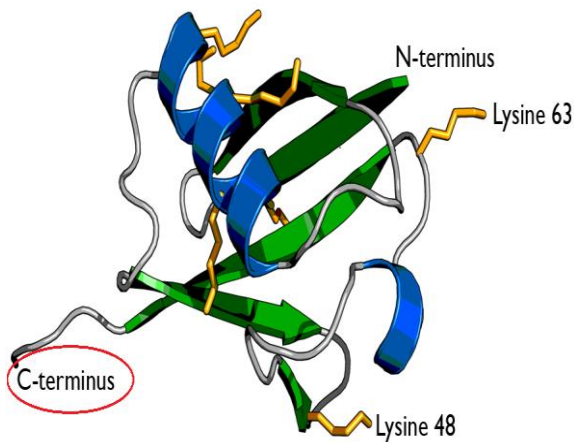
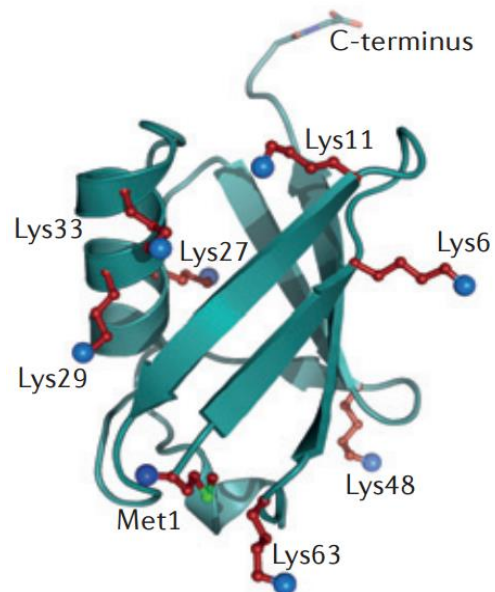


Figura 1

Estructura de la ubiquitina, indicando la cadena C-terminal

Figura 2

Imagen de la ubiquitina donde se muestran los residuos de Lys.



La ubiquitina es la piedra angular de un conjunto de señales moleculares que la célula utiliza para determinar diferentes funciones que pueden ir desde la degradación clásica de proteínas a la internalización de proteínas receptoras o la reparación del ADN.

La ubiquitina posee siete residuos de lisinas (K) y la Met N-terminal que son cruciales para diversidad funcional de esta proteína. Los residuos de Lys se sitúan en las siguientes posiciones de la secuencia lineal: K6, K11, K27, K29, K33, K48, y K63. (Ikeda F. y cols., 2010). A través de estos residuos se unen las moléculas de ubiquitinas entre sí.

Las lisinas más susceptibles de unir otras moléculas de ubiquitina para formar una cadena de poli-ubiquitina son la Lys 48 y Lys 63.

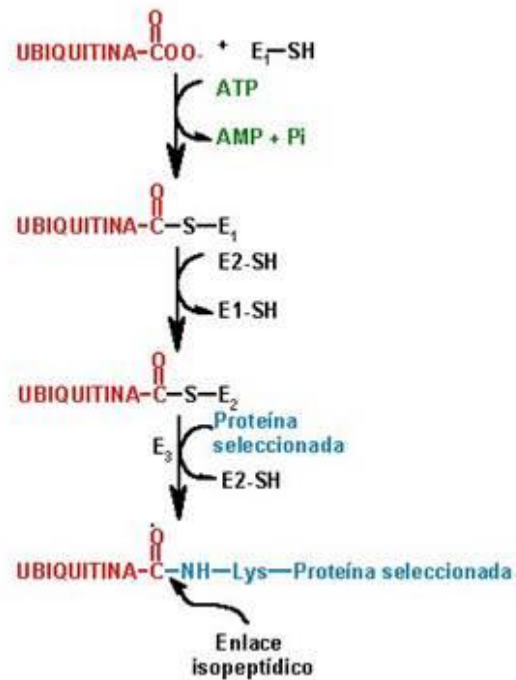
La Ubiquitinación

Modificación post-traducciona dependiente de ATP que consiste en la unión covalente de ubiquitina a proteínas intracelulares.

Figura 3

El mecanismo de la ubiquitinación ocurre en tres etapas:

- La primera etapa es una reacción ATP-DEPENDIENTE, el carboxilo de la ubiquitina se conjuga vía un enlace tio-éster con el enzima E1 que se encarga de activar la Ub.
- En la segunda la Ub es transferida a un sulfridrilo de una de los muchos enzimas E2s.
- Y en la tercera la E3-ligasa se encarga de la transferencia de la Ub-activada por la E2 al grupo amino de una Lys de una proteína previamente seleccionada.



El resultado final es una proteína a la cual se le ha añadido un residuo de ubiquitina. Este proceso puede repetirse originando diversas estructuras de ubiquitina, que se encargan de marcar las proteínas para sus respectivos destinos. (Figura 4)

Estás estructuras de ubiquitina son:

La Mono-ubiquitinación

Es una de las múltiples posibilidades dentro de la ubiquitinación. Se produce cuando las enzimas que catalizan la Mono-ubiquitinación, reconocen como sustrato los residuos de lisina, esta especificidad es determinada por las Enzima conjugadora de Ub (E2) y Ubiquitina ligasa (E3-ligasa), o un complejo sustrato-E3 en particular. (Komander y Rape., 2012)

Como un ejemplo del complejo citado anteriormente, se encuentra el polycomb E3 ligasa Bmi1-RING1 monoubiquitinado en la histona H2A en la Lys 119.

La Multi-ubiquitinación

Es otra de las conocidas posibilidades dentro de la ubiquitinación. Consiste en la mono-ubiquitinación en múltiples residuos de lisina de la misma proteína catalizado por las mismas enzimas E1, E2 y E3-ligasa, que realizan la mono-ubiquitinación simple.

La Poli-ubiquitinación lineal

Consiste en la unión de varias moléculas de ubiquitina a una proteína diana. Está catalizada por los tres enzimas: E1, E2 y E3-ligasa. La función y destino de cada proteína viene dado por el tipo de enlace y el número de ubiquitinas, que generalmente son cuatro. Como ejemplos:

- Las proteínas con enlaces en K11 y K48, son destinados a la degradación proteosomal.
- Las proteínas con enlaces en K63, se encargan de la traducción de la señal de tolerancia al daño en el ADN, la activación de la quinasa y de facilitar la endocitosis.

La Poli-ubiquitinación ramificada

Sigue el mismo procedimiento que la poli-ubiquitinación lineal, con la diferencia que la cadena principal de ubiquitina se ramifica con la adhesión de más ubiquitinas, lo cual da lugar a una gran diversidad de cadenas posibles.

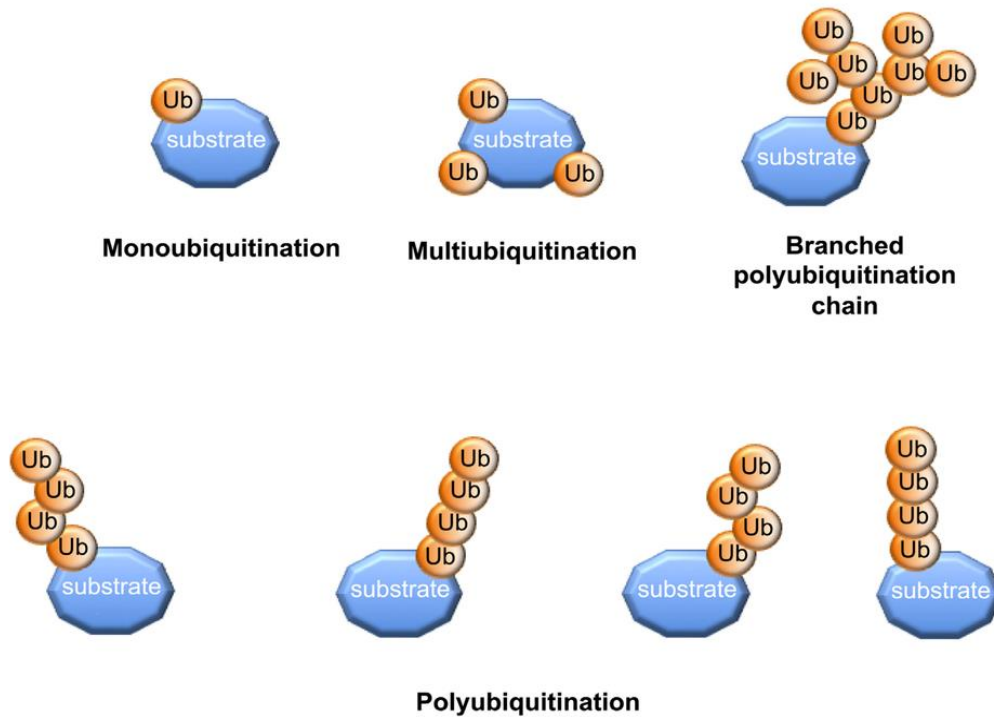


Figura 4

Generación de las diferentes estructuras de Ub que conducen las proteínas a distintos destinos.

Los dominios de unión a ubiquitina

La ubiquitina es una proteína muy conservada dentro de los eucariotas, desde las levaduras al hombre. Esto sugiere una alta presión evolutiva para conservar la estructura de la ubiquitina e implica que gran parte de sus superficies son reconocidas por los dominios de unión a ubiquitina. (Komander y Rape, 2012)

Los dominios de unión a ubiquitina (UBDs), son elementos modulares que se unen de forma no covalente a la ubiquitina. Estudios estructurales recientes a nivel atómico de complejos de ubiquitina-UBDs han revelado algunos de los mecanismos que subyacen a las funciones versátiles de la ubiquitina in vivo.

El contexto de la secuencia de UBDs y los cambios conformacionales que siguen su unión a la ubiquitina también contribuyen a la señalización de ella. (Dikic, I y cols., 2009)

La ubiquitina suele ser reconocida por los UBDs a través de una superficie hidrófoba que consiste en Leu8, Ile44, Val70 e His68.

Los aminoácidos Leu8, Ile44 y Val70 en el polipéptido de la ubiquitina, son conocidos colectivamente como el parche hidrófobo y son críticos para la degradación proteosomal, mientras que el reconocimiento eficiente de los sustratos ubiquitinados por el proteosoma 26S requiere un mínimo de orientación de la señal de degradación de proteínas intracelulares, que consta de cuatro restos de ubiquitina unidos entre sí a través de enlaces isopeptídicos, entre los residuos Gly76 y Lys48.

Funciones celulares según el tipo de cadena

Las cadenas más conocidas son las que se producen en Lys48 y Lys63, pero existen otras menos estudiadas que se conocen como cadenas “atípicas” a las que pertenecen: Met1, Lys6, Lys11, Lys27, Lys29 y Lys33.

Met 1: las cadenas de ubiquitina unidos a la Met1 tienen como función ser reguladores positivos clave en la señalización de NF-kB. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys6: su mecanismo es menos claro que el de la Met1, pero se le atribuyen papeles no degradativos, recientes estudios relacionan estas cadenas con dos contextos celulares. Una primera serie de estudios la asocia con el BRCA1 / complejo ligasa E3 BARD1, un importante regulador de la respuesta al daño del ADN. Y una segunda serie de estudios han relacionado las cadenas de Lys6 con la homeostasis mitocondrial. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys 11: las cadenas en Lys11 son la mejor estudiadas de los tipos de cadena “atípicas”, y se han establecido como una señal de la degradación proteosomal adicional que se utiliza en particular en la regulación del ciclo celular. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys27: las cadenas de Lys27 sirven como base para el reclutamiento de proteínas en la respuesta al daño del ADN. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys29: en líneas celulares humanas, da lugar a la inhibición del proteosoma en el enriquecimiento de las cadenas de Lys29, lo que sugiere que estas cadenas pueden ser

una señal de la degradación proteosomal. También modifica el receptor de ubiquitina del proteosoma Rpn13 con cadenas con Lys29 en respuesta al estrés proteosomal, para evitar una mayor participación de sustrato. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys33: unos estudios sugieren que tiene un papel como un regulador negativo de la apoptosis, y otros en el transporte de proteínas de membrana post-Golgi. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys48: las cadenas de Lys48 son el tipo de cadena y objetivo más común para la degradación proteosomal, requieren por lo menos una cadena de tetraubiquitina para ser dirigidos de manera eficiente al proteosoma. Aunque estudios más detallados, piensan que, controlando el tipo de cadena, longitud de la cadena y la posición de la cadena sobre un sustrato, podría ser esencial para comprender finalmente lo que constituye la señal de la degradación proteosomal perfecta. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Lys63: su principal función es la señalización inflamatoria, pero desde que se descubrieron las cadenas de Met1, también se le atribuye participación en la activación de NF- κ B, esto está respaldado con estudios que demuestran que las cadenas de Lys63 son posteriormente modificadas con cadenas de Met1 en estructuras mixtas o ramificadas. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Cadenas mixtas y ramificadas: como se ejemplificó antes con Lys63/Met1, estas cadenas híbridas podrían ser portadoras de nueva información de señalización. De hecho, todas las nuevas funciones de las cadenas “atípicas” pueden depender de la interacción con otros tipos de vinculación. (Swatek, K. y Komander, D., 2016)

Ejemplos de mono-ubiquitinación

La Ubiquitinación a parte del marcaje de proteínas para su degradación por el proteosoma 26S también se encarga de la **regulación del tráfico endocítico** de los receptores de señalización, canales iónicos, permeasas, transportadores tanto en las levaduras como en las células de mamíferos. (Sloper-Mould KE y cols., 2001)

La regulación del tráfico endocítico fue la primera función descrita no proteosomal de la ubiquitinación, donde la mono-ubiquitinación era suficiente, en las levaduras, como señal de internalización endocítica, los residuos de Lys63 de la ubiquitina facilitaban la endocitosis. Por otro lado, en las células animales es menos clara. Muchas proteínas de la membrana plasmática y receptores se ubiquitan en sus dominios citoplásmicos y esto puede afectar a la elección de la vía endocítica.

Como ejemplo, se encuentra que las funciones endocíticas y estructurales de las β -arrestinas están estrechamente relacionadas con la ubiquitinación. La ubiquitinación específica de las β -arrestinas desempeña un papel fundamental en la estabilización de la asociación β -arrestina-7TMR (7 receptores transmembrana, también llamados receptor acoplados a proteínas G, GPCR) y la formación del signalosoma. (Jean-Charles PY y cols., 2016)

No solo la mono-ubiquitinación está relacionada con el la regulación del tráfico endocítico, la multi-ubiquitinación también, según en un estudio realizado con una secuencia de 58 aminoácidos, “PEST-like” dentro del receptor de factor-alfa (Ste3p) de las levaduras. Esta secuencia de aminoácidos sigue un proceso en el cual primero se mono-ubiquitina, después es absorbido por endocitosis y finalmente acaba con la degradación vacuolar de la proteína receptora. Los resultados de este artículo confirman las conclusiones extraídas de los estudios originalmente con el receptor del factor-alfa (Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., y Hicke, L. Mol. Cell. 1998. 1, 193-202), que decían que la mono-ubiquitinación, y las cadenas de multi-ubiquitina no proporcionan el determinante principal para el reconocimiento de la absorción de proteínas. Y que aunque la mono-ubiquitinación basta, los resultados indican que la multi-ubiquitinación sirve para aumentar la velocidad de absorción de las proteínas. (Melani D.Ohi y cols., 2003)

Otra función de la mono-ubiquitinación que podemos encontrar es la **reparación del ADN**. La mono-ubiquitinación realiza modificaciones en el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), factor imprescindible en la replicación del ADN y su reparación. La RAD6 (E2) mediada por la mono-ubiquitinación de PCNA activa la síntesis de ADN translesión, por las polimerasas tolerantes al daño eta y zeta en las levaduras. Por otra parte, la zeta-polimerasa es afectada de forma distinta por las modificaciones del PCNA por parte de la mono-ubiquitinación y SUMO (una pequeña proteína relacionada con la ubiquitina, “small ubiquitin-like modifier”, que utiliza un sistema de conjugación similar al de la ubiquitina que a veces contrarresta los efectos de esta). Tanto SUMO como la mono-ubiquitina contribuyen a la estabilidad del ADN. (Stelter P, y Ulrich HD., 2003) Se debe hacer mención que la multi-ubiquitinación de PCNA mejora la estabilidad en mayor medida.

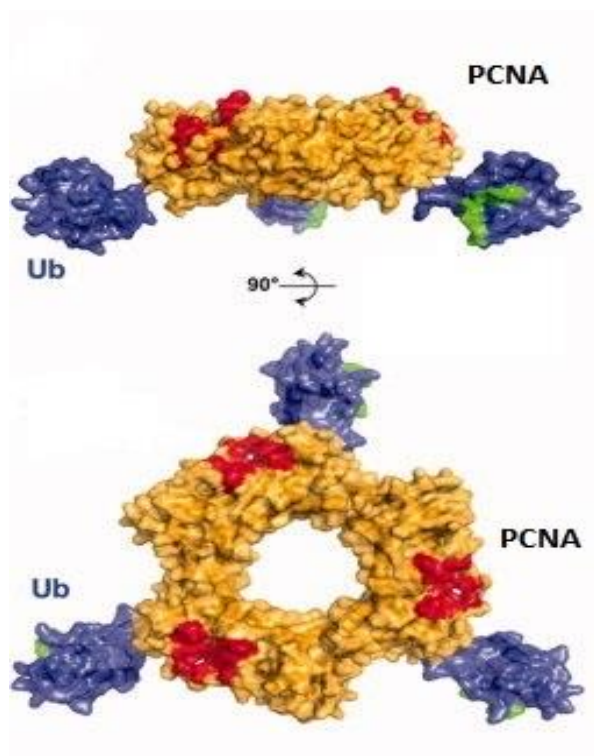


Figura 5

Multi-ubiquitinación de PCNA

Otro ejemplo de mono-ubiquitinación hace referencia a las modificaciones covalentes de las histonas son importantes en la regulación dinámica de la cromatina y la transcripción. (Wang H y cols., 2004)

Estas modificaciones se pueden dar mediante acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. Centrándonos en la ubiquitinación, los enzimas participantes de estos procesos de modificación, varían según la especie.

En los seres humanos, la mono-ubiquitinación H2A está mediada por al menos dos ligasas diferentes E3 ubiquitina, que son Ring1B y 2A-HUB (Tabla 1) ambos de los cuales están asociados con el silenciamiento transcripcional.

	H2B Ubiquitinación		H2B Des-ubiquitinación		H2A Ubiquitinación		H2A Des-ubiquitinación
	E2	E3	Transcripción	Silenciamiento	E2	E3	
<i>S. cerevisiae</i>	Rad6	Bre1	Udp8	Udp10 (Dot4)	-	-	-
Ratón	mHR6A/mHR6B	-					
Humano	hHR6A/hHR6B <i>UbcH6?</i> <i>Mdm2?</i>	RNF20	USP22 USP3?			Ring1B (Ring2/Rnf2) 2A-HUB (hRUL138)	UBP-M (USP16) 2A-DUB (MYSM1) USP21 <i>USP3 ?</i>

Tabla 1: Enzimas que participan en Ubiquitinación / des-ubiquitinación de H2A y H2B en diferentes organismos. (Weake. V.M. y Workman J.L., 2008)

Las H2A ubiquitin-ligasas están asociados con complejos represivos:

- El H2A ubiquitin-ligasa Ring1B es un componente de tres complejos represivos diferentes: **PRC1** localizado en la Lys-27 H3 trimetilada y reprime la transcripción de genes Hox; **E2F6.com-1** metilado en la Lys-9 H3 y un elemento “E2F- y myc-response”; y el complejo **FBXL10-BCOR** contiene la Lys4 H3 KDM2B desmetilasa y proteínas adicionales putativas (líneas discontinuas), y reprime los genes diana BCL6. (Figura 6 A)
- Los 2A-HUB asociados con H2A ubiquitina ligasa con el **NCoR / HDAC1/3** complejo represivo e inhiben el reclutamiento de “FACT” y la elongación de la transcripción. A la inversa, el 2A-DUB ubH2A des-ubiquitinasa asociada con el coactivador **PCAF / KAT2B**, que es requerido para la activación de genes en un subconjunto genes promotores de las quimioquinas, potencialmente mediante la mejora del reclutamiento de “FACT”. (Figura 6 B) (Weake. V.M. y Workman J.L., 2008)

La mono-ubiquitinación H2B es requerida en los pasos iniciales en la elongación de la transcripción:

- El H2B ubiquitin-ligasa Bre1 interactúa con activadores ácidos, tales como Gal4, y recluta a Rad6 y Lge1. (Figura 7 A)
- La Monoubiquitinación de H2B por Rad6 / Bre1 requiere interacciones con el complejo PAF, el complejo BUR, y la forma elongada de la ARN polimerasa II que ha sido fosforilada en la Ser-5 de la CTD por Kin28. El complejo BUR fosforila Ser-120 de Rad6, lo que podría estimular su actividad ubiquitin-conjugasa. (Figura 7 B)
- Se requiere la ubiquitinación H2B para el reclutamiento de la subunidad Cps35 de COMPASS, que activa la di- y trimetilación de la Lys-4 H3 por Set1. El proteasoma 19S y “Ccr4-Not complex” también vinculan la mono-ubiquitinación de H2B a la metilación de la Lys-4 H3. (Figura 7 C)

Se han realizado gran cantidad de estudios que revelan el papel de la ubiquitinación de

H2B en la activación de la transcripción de genes y el silenciamiento. Un concepto interesante que ha salido de estos estudios es la interferencia entre la mono-ubiquitinación de H2B y otras modificaciones de las histonas, incluyendo la metilación de la histona H3.

En el modelo que se presenta en estos estudios, Rad6 (E2) y Bre1 (E3) inicialmente son reclutados como promotores para interactuar con los activadores y después son asociados con la ARN polimerasa II a medida que se produce la transcripción.

Pero para la mono-ubiquitinación de H2B no es suficiente con el reclutamiento de los promotores, además para la estimulación de la actividad de ubiquitina conjugasa Rad6 se requieren interacciones con factores adicionales que se asocian con la forma de alargamiento de la ARN polimerasa II. (Weake. V.M. y Workman J.L., 2008)

Al igual que he mostrado el poder sobre la transcripción del ADN de las modificaciones producidas por la mono-ubiquitinación, debo mencionar el procedimiento contrario conocido como des-ubiquitinación y su importancia en este mismo proceso.

- El principal enzima des-ubiquitinadora de H2A es la UBP-M también llamada USP16 (Tabla1). La des-ubiquitinación de H2A es un requisito previo para la posterior fosforilación de Ser10 de H3 y la segregación de cromosomas cuando las células entran en mitosis. Por otra parte, UBP-M regula la expresión de genes Hox a través des-ubiquitination H2A. (Joo HY. Y cols. 2007)
- La segunda des-ubiquitinasa de H2A, 2A-DUB (MYSM1), actúa durante la iniciación de la transcripción y es necesario para la activación de genes en un subconjunto de promotores. 2A-DUB contiene un dominio JAMN/MPN+, que puede catalizar la hidrólisis de enlaces isopeptídicos de la cadena de ubiquitina. (Zhu P. y cols., 2007)

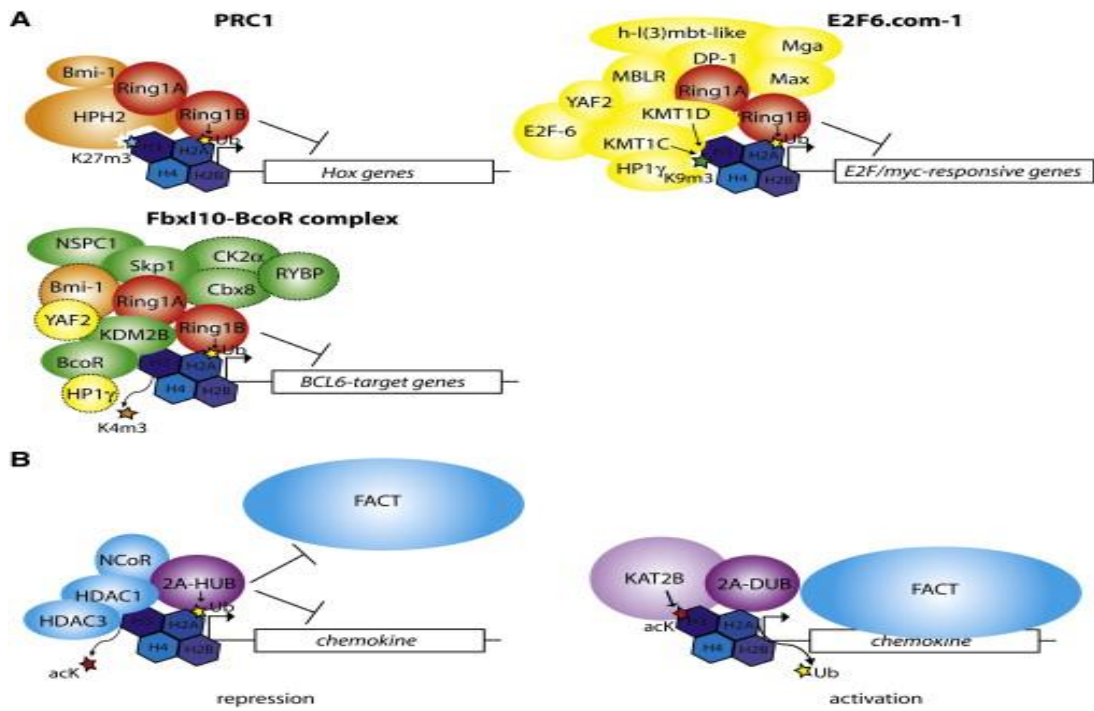


Figura 6

Proceso de ubiquitinación de H2A

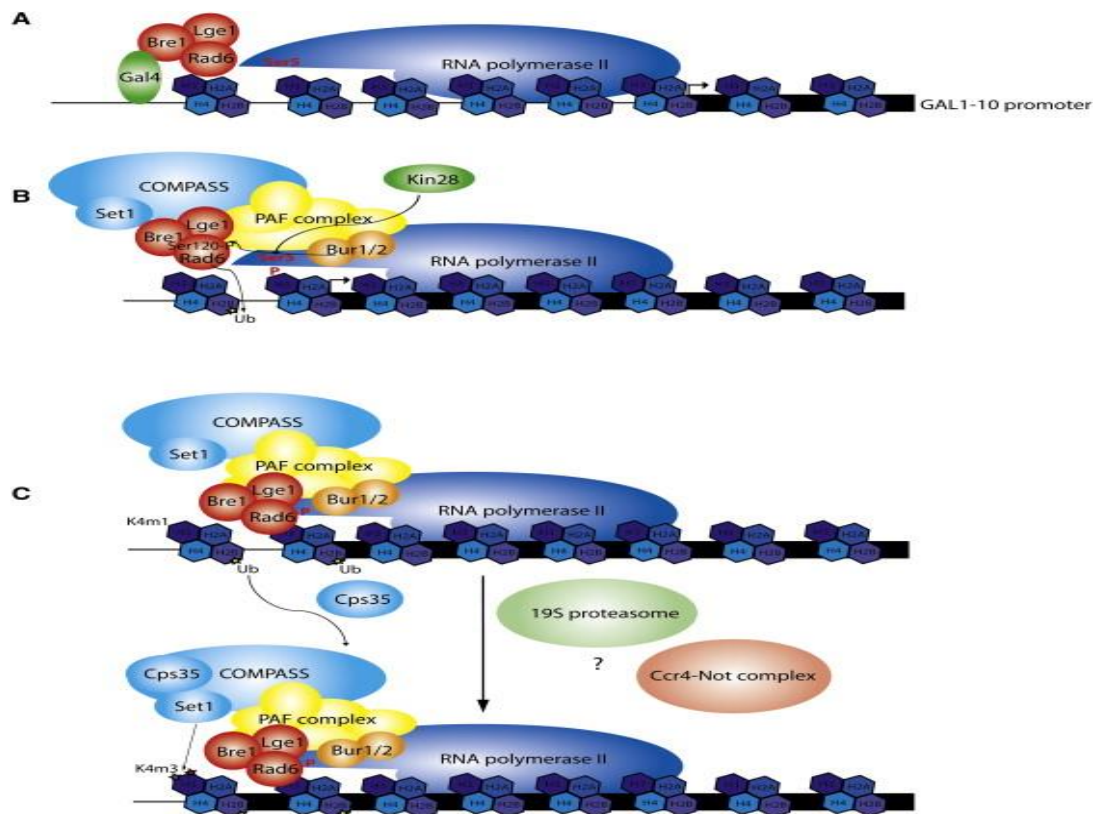


Figura 7

Proceso de ubiquitinación H2B

Ejemplos de poli-ubiquitinación

La principal función conocida de la poli-ubiquitinación es el marcaje de proteínas para su posterior degradación por el proteosoma 26S.

El proteosoma 26S es un gran complejo proteico que posee actividad proteolítica. Se encarga de degradar proteínas de forma selectiva las cuales, han sido previamente marcadas por la ubiquitina. Este complejo está formado por 2 subunidades: la subunidad catalítica 20S y la subunidad reguladora 19S. (Figura 8)

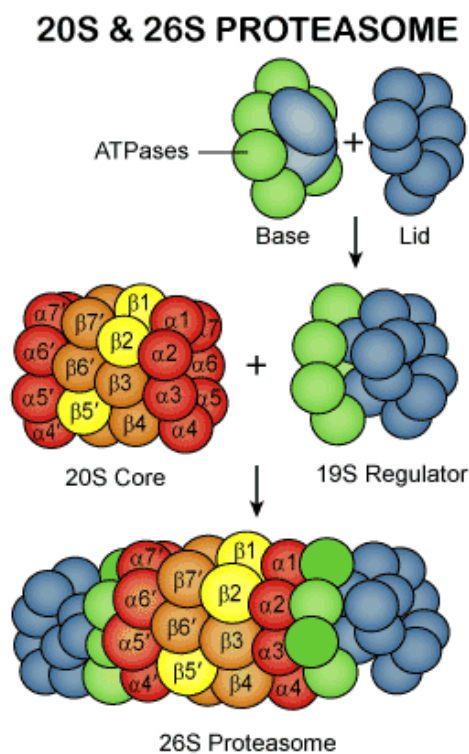


Figura 8

Representación gráfica del proteosoma 26S, partiendo de la subunidad catalítica 20S y dos subunidades reguladoras 19S que se colocan en ambos extremos.

La partícula catalítica 20S: Está formada por dos anillos heptaméricos de subunidades alfas y dos de subunidades betas. Las subunidades alfas están en la parte exterior en contacto con la partícula reguladora mientras que las betas ocupan el centro del proteosoma. Las regiones N-terminales de las subunidades alfa ocluyen el canal central, actuando a modo de compuerta. Tres subunidades beta por anillo poseen actividad treonin-proteasa, por lo que el proteosoma en total tiene seis. Esta combinación de centros activos produce péptidos de longitud entre 3 y 23 aminoácidos.

La partícula reguladora 19S: En ella se distinguen dos estructuras: la base y la pestaña. La base está formada por 6 subunidades con actividad de ATPasa (Rpt1-Rpt6) pertenecientes a la superfamilia AAA+ y 3 sin actividad de ATPasa (Rpn1, Rpn2 y Rpn10). Se supone que las ATPasas forman un anillo hexagonal, común en este tipo de enzimas, que está en contacto con las subunidades alfas de la partícula central. La pestaña, de 400 kDa, está formada por subunidades sin actividad ATPasa (Rpn3-9,11-12) y tiene la forma parecida a un disco que puede separarse y unirse al resto de la partícula. (Rolando A., 2013)

Conociendo ya el funcionamiento de este complejo degradativo, y volviendo con la ubiquitinación como proceso de marcaje, la cadena de ubiquitina más corta reconocida por el proteosoma tiene que contener al menos cuatro ubiquitinas, y la señal prototipo 'canónica' es una cadena de poli-ubiquitina donde las ubiquitina están vinculadas entre sí a través de un enlace isopeptídico entre la Gly76 y la Lys48.

Sin embargo, investigaciones recientes muestran que la señal proteosomal proteolítica es mucho más compleja y diversa: cadenas basadas en diferentes vínculos internos, cadenas mixtas y sorprendentemente también una fracción única ubiquitina, puede ser reconocido por el proteosoma. (Ciechanovera A, Stanhill A., 2014)

El montaje de Ub en una cadena tetramérica de Lys48 crea un elemento de reconocimiento único que está obligado por los receptores específicos del complejo 19S. Sin embargo, también es posible que el conjunto de ubiquitina en una cadena ligada a Lys48 mejora la señalización simplemente aumentando la concentración de mono-ubiquitinas. Existen estudios que han intentado demostrar la hipótesis que plantea que la señalización debe aumentar linealmente con la longitud de la cadena, pero los resultados han concluido que el aumento en la longitud de la cadena provoca un aumento de afinidad (un aumento de 6 veces la cadena, aumenta 600 veces la afinidad) pero la cadena puede no indicar la proteólisis mediante el aumento de la concentración de mono-ubiquitinas. Sin embargo, la cadena de poli-ubiquitina Ub5DHFR es una potente señal de direccionamiento que tiene plenamente en cuenta la interacción de la proteína con el proteosoma, pero a pesar de su alta afinidad, Ub5DHFR se degrada aproximadamente 50 veces más lentamente que un pequeño péptido. (Thrower. J y cols., 2000)

Como dije en párrafos anteriores la cadena de ubiquitina predominante con función proteosomal es en Lys48, pero las cadenas en Lys11 y Lys29 también están involucradas en la degradación de proteínas proteosoma-dependientes. Por el contrario, las cadenas de ubiquitina en Lys63 y la mono-ubiquitinación generalmente se cree que funcionan en procesos independientes del proteosoma tales como reparación del ADN, la transducción de señales y la endocitosis de receptores in vivo, mientras que estudios emergentes in vitro implican que cadenas en Lys63 estaría relacionada con la degradación proteosomal.

Unos estudios realizados con Rsp5 (E3-ligasa) y un sustrato natural del proteosoma con un inhibidor de CDK (kinasa dependientes de ciclinas) llamado 'Sic1PY', demostraron bajo condiciones no fisiológicas que las cadenas homogéneas de Lys63 con suficiente longitud sirvieron como señal de orientación proteosomal in vitro. Y se deduce de estos estudios que las cadenas ubiquitinadas en Lys63 están involucradas en el control de calidad de las proteínas en las células y sirven como señal de la degradación de proteínas por el proteosoma 26S. (Saeki y cols., 2009)

Recientes estudios destacan que el proteosoma puede reconocer ubiquitinas solitarias, lo que implica la existencia de mono-ubiquitinación en este mecanismo de degradación. En este contexto, estudios previos han sugerido que la longitud de cadena requerida para la degradación proteosomal se determina por el tamaño del sustrato, y posiblemente otras características que afectan a la afinidad del sustrato modificado por ubiquitinación para el proteosoma. Concretamente, se sugirió que los sustratos más pequeños de 150 aminoácidos se degradan siguiendo la mono-ubiquitinación, mientras que los sustratos más largos requieren cadenas más largas de ubiquitina.

Por ello, se ha propuesto un modelo dinámico, según el cual la cadena se alarga a un punto donde la afinidad para el proteosoma es lo suficientemente alta para asegurar una unión estable del sustrato conjugado.

Otro estudio demostró que la restricción del número de residuos de Lys ubiquitinables puede cambiar el tipo de modificación necesario para la degradación, entre la mono-ubiquitinación y la poli-ubiquitinación, lo que sugiere que, en la célula, el enmascaramiento de residuos de Lys por interacciones proteína-proteína o modificación postraducciona l puede afectar a el modo de ubiquitinación.

Sin embargo, todos estos estudios se han llevado a cabo utilizando sustratos específicos, lo que quiere decir que las conclusiones generales se mantienen limitadas. (Bratena O y cols., 2016)

V. Conclusión

Tras la revisión podemos concluir que las cadenas atípicas, cadenas no vinculadas a las Lys48 y Lys63, aportan una gran diversidad funcional a la ubiquitinación, ya que cada tipo de cadena es regulado de forma independiente, y a su vez regulan procesos celulares distintos, independientemente de si múltiples tipos de cadenas acaban en el mismo resultado celular (por ejemplo, la degradación proteosomal). Esto abre una amplia gama de futuras investigaciones, algunas de ellas ya en marcha, con resultados bastante satisfactorios que aportarán más conocimientos y más incógnitas sobre esta modificación post-traducciona l de proteínas intracelulares.

VI. Bibliografía

- Bratena O, Livneha I, Zivb T, Admonb A, Kehatd I, Caspid L, Gonena H, Bercovicha B, Godzike A, Jahandidehe S, Jaroszewskie L, Sommerf T, Kwong Y, Guharoyi M, Tompai P, y Ciechanovera A. Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. pii: 201608644
- Ciechanovera A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014. Volume 1843, Issue 1, Pages 86–96.
- Dikic I, Wakatsuki S, y Walter KJ. Ubiquitin-binding domains from structures to functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. 10:659-671.
- Ikeda F, Crosseto N, y Dikic I. What Determines the Specificity and Outcomes of Ubiquitin Signaling? *Cell*. 2010. Volume 143, Issue 5. Pages 677–681.
- Jean-Charles PY, Rajiv V, y Shenoy SK. Ubiquitin-Related Roles of β -Arrestins in Endocytic Trafficking and Signal Transduction. *J. Cell. Physiol*. 2016. 231: 2071-2080.
- Joo HY1, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chang C, Wang H. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* 2007. 449:1068-1072.
- Komander D, y Rape M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem*. 2012. 81:203–29.
- Niño Suárez C. Análisis de la ubiquitinación de proteínas en la diferenciación de *Giardia intestinalis* (tesis doctoral). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011
- Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, y Gould KL. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nature Structural Biology* 2003. 10:250 - 255
- Rolando A. La vía ubiquitina-proteasoma ¿destruir o construir? ese es el dilema. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2013. Vol.12 no.1.
- Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, Toh A, y Tanaka K. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *The EMBO Journal* 2009. 28:359–371.

- Sloper-Mould KE, Jemc JC, Pickart CM, Hicke L. Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:30483–89.
- Stelter P, y Ulrich HD. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 2003. 425:188-191.
- Swatek K, y Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Research* 2016. 26:399-422.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, and M.Pickar C. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal.* 2000. Vol.19, No.1, Pages 94–102.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Richard S. Jones y Yi Zhang. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* 2004. 431:873–78.
- Weake V.M. y Workman J.L. Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Molecular Cell.* 2008. Volume 29, Issue 6, p653–663.
- Zamudio-Arrollo J, y Peña-Rangel M. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP.* 2012. Vol.15 no.2.
- Zhu P1, Zhou W, Wang J, Puc J, Ohgi KA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Glass CK, Rosenfeld MG. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell.* 2007. 27:609-621.