

**ESTUDIO DE LOS PATRONES DE UBIQUITINACIÓN Y LA ACTIVIDAD DE PROTEOLISIS
ESPECÍFICA DEL PROTEOSOMA EN *Giardia intestinalis***

JENNY JOVANA CHAPARRO GUTIÉRREZ

Código 197951 jjchaparrog@unal.edu.co

**Trabajo de tesis presentado como requisito parcial
para optar al título de Doctor en Ciencias - Química**

Dirigido por:

MOISÉS WASSERMAN LERNER PhD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BÁSICAS EN BIOQUÍMICA

Bogotá D. C. Marzo de 2010

ESTUDIO DE LOS PATRONES DE UBIQUITINACIÓN Y LA ACTIVIDAD DE PROTEOLISIS ESPECÍFICA DEL PROTEOSOMA EN *Giardia intestinalis*

STUDY OF THE UBIQUITINATION PATTERNS AND THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE PROTEASOME IN *Giardia intestinalis*

RESUMEN

El parásito protozoario *Giardia intestinalis* es un agente causante de diarrea en humanos alrededor del mundo. Además de su importancia como patógeno es un eucariota que divergió tempranamente y constituye un importante modelo de estudio de procesos celulares básicos. Durante su ciclo de vida, *G. intestinalis*, presenta dos procesos de diferenciación, la enquistación y la exquistación, los cuales involucran modificaciones intracelulares, transcripción de nuevos genes, síntesis y probablemente degradación específica de proteínas. En nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia y expresión de genes esenciales dentro del proceso de ubiquitinación de proteínas en *G. intestinalis*. En el presente trabajo se realizó la purificación de ubiquitina a partir de trofozoítos de *G. intestinalis*, se produjo un anticuerpo anti-ubiquitina específico, se estandarizaron las condiciones para la detección y evaluación de los patrones de ubiquitinación y se identificó una proteína ubiquitinada. Por otro lado, se realizó la purificación y caracterización parcial del 20S proteosoma de *Giardia* y se evidenció una acumulación de conjugados proteicos de alto peso molecular en respuesta a la inhibición del proteosoma. Durante el proceso de enquistación, la actividad del proteosoma se incrementa. Además, se encontró una actividad peptidasa similar al proteosoma en extractos crudos de proteína de *Giardia intestinalis*. Estos resultados demuestran la presencia de un sistema ubiquitina-proteosoma activo durante el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación en *G. intestinalis*. Además, nuestras observaciones sugieren la presencia de otra actividad similar al proteosoma que podría estar involucrada en la vía de proteólisis en este eucariota basal.

Palabras clave: *Giardia*, Diferenciación, Protozoa, Proteosoma, Proteólisis, Ubiquitina

ABSTRACT

The parasitic protozoan *Giardia intestinalis* is one of the major causes of diarrhoea in humans worldwide. Furthermore, *G. intestinalis* belongs to the earliest diverging eukaryotic lineage known and provides an important model for studying basic insights into key pathways. *G. intestinalis* undergo two differentiation events, encystation and excystation, which involves intracellular rearrangement, new gene transcription, protein synthesis and likely specific protein degradation. In our laboratory previous studies demonstrated the presence and expression of components of the ubiquitination system in *G. intestinalis*. In this work was isolated ubiquitin from trophozoites and was produced a specific antibody against this protein, using this antibody was standardized a method to evaluate the ubiquitination patterns and was possible to identify a protein ubiquitinated. On the other hand, was purified and characterized partially the 20S proteasome from *Giardia* and was evidenced a constitutive turnover of cellular proteins via the ubiquitin pathway after treatment with proteasome inhibitors. During the process of encystation, proteasome activity increased. In addition, was found a proteasome-like peptidase activity in *G. intestinalis* crude extracts which was about 10S and its activity was importantly increased during the encystation process. These results demonstrate the presence of an active ubiquitin-proteasome system during the trophozoite stage and during the encystation process of *G. intestinalis* with an interesting behaviour during this differentiation process and with the presence of interesting effects after proteasome specific inhibition in vivo. Furthermore, our observations suggest the presence of another proteasome-like activity that could be involved in the proteolytic pathway in this basal eukaryote.

Keywords: *Giardia*, Differentiation, Protozoa, Proteasome, Proteolysis, Ubiquitin

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1. BIOLOGÍA DE <i>Giardia intestinalis</i>	17
2.1.1. Estadios Morfológicos.....	18
2.1.2. Ciclo de Vida.....	20
2.1.3. Genoma.....	22
2.1.4. Variación Antigénica	23
2.1.5. Transporte de Proteínas y Degradación	25
2.1.6. Metabolismo	26
2.2. SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSOMA.....	28
2.2.1. Ubiquitina.....	29
2.2.2. La Vía de Ubiquitinación	30
2.2.3. Enzima Activadora de Ubiquitina (E1)	31
2.2.4. Enzimas Conjugadoras de Ubiquitina (E2)	34
2.2.5. Enzimas Ubiquitina Ligasas (E3s).....	35
2.2.6. Selección del sustrato por E3s.....	36
2.2.7. Ubiquitinación sin E3	37
2.2.8. Enzimas E4.....	38
2.2.9. Enzimas Deubiquitinadoras (DUB).....	38
2.2.10. Cadenas de Poliubiquitina.....	41
2.2.11. Proteínas Similares a Ubiquitina (<i>Ubiquitin-like proteins-Ubls</i>)	46
2.2.13. Enzimas de la Vía de Ubiquitinación en Parásitos Protozoarios.....	49
2.2.14. Enzimas DUBs en Parásitos Protozoarios.....	51

2.2.15. Dominios de Unión a Ubiquitina (<i>Ubiquitin-binding domains</i> -UBDs).....	51
2.2.16. Métodos para la Purificación de Proteínas Ubiquitinadas.....	52
2.2.17. Análisis e Identificación de Proteínas Ubiquitinadas.....	55
2.2.18. El Proteosoma	56
2.2.19. Sistema Ubiquitina-Proteosoma en <i>Giardia intestinalis</i>	78
3. JUSTIFICACIÓN	80
4. OBJETIVOS	82
4.1. Objetivo General	82
5. METODOLOGÍA.....	83
5.1. Cultivo de <i>Giardia intestinalis</i>	83
5.2. Obtención de Extracto Proteico de <i>G. intestinalis</i> Para Purificación de Ubiquitina.....	83
5.3. Electroforesis de Proteínas Empleando Geles Tricina-SDS-PAGE.	84
5.4. Purificación de Ubiquitina	85
5.5. Producción de anticuerpos policlonales.....	86
4.5.1. Preparación del antígeno.....	86
5.5.2. Esquema de inoculación con el antígeno.....	86
5.5.3. Seguimiento de producción de anticuerpos	87
5.5.4. Inmunodetección de conjugados ubiquitina-proteína, ensayos western blot	87
5.6. Inhibición de la Enzima Activadora de Ubiquitina E1.....	88
5.7. Inhibición del Proteosoma durante el estadio de trofozoíto.....	88
5.8. Inhibición del Proteosoma durante el proceso de enquistación	89
5.9. Evaluación de los Patrones de Ubiquitinación Después de la Inhibición del Proteosoma.....	90
5.10. Identificación de Proteínas Blanco de Ubiquitinación.....	91
5.11. Obtención de Extractos Proteicos de <i>G. intestinalis</i> Para Evaluación de la Actividad Peptidasa y Purificación del Proteosoma.....	92
5.12. Electroforesis de Proteínas Empleando Geles Glicina-SDS-PAGE	93

5.13. Ensayos de Actividad Enzimática	93
5.14. Fraccionamiento de Extractos de Proteína y Evaluación de la Actividad del Proteosoma en el Estadio de Trofozoíto y Durante el Proceso de Enquistación.....	95
5.15. Ensayos de Actividad en Gel (Overlay assays)	95
5.16. Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa in vivo e in vitro	96
5.17. Inhibición Conjunta del Proteosoma y de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en Cultivo de Trofozoítos y en la Enquistación.....	98
5.18. Purificación Parcial del Proteosoma de G. intestinalis	98
5.19. Ensayos de Activación del Proteosoma de G. intestinalis	101
6. RESULTADOS Y DISCUSION	102
6.1. Purificación de Ubiquitina	102
6.2. Producción de anticuerpos contra ubiquitina	103
6.3. Inmunodetección-Patrones de Ubiquitinación.....	109
6.4. Inhibición de la enzima activadora de ubiquitina E1.....	110
6.5. Efecto de la Inhibición del Proteosoma sobre el Crecimiento y Viabilidad de los Trofozoítos de G. intestinalis	114
6.6. Patrones de Ubiquitinación Post-Inhibición del Proteosoma en G. intestinalis	120
6.7. Efecto de la inhibición del Proteosoma sobre el Proceso de Enquistación de G. intestinalis	122
6.8. Identificación de una Proteína Ubiquitinada en G. intestinalis	126
6.9. Actividad del Proteosoma en Extractos Crudos de Proteína del Estadio de Trofozoíto.....	132
6.10. Actividad del Proteosoma en Extractos Crudos de Proteína Durante el Proceso de Enquistación ..	137
6.11. Ensayos de Actividad Enzimática en Gel (Overlay Assay)	141
6.12. Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa in Vivo	145
6.13. Inhibición Conjunta del Proteosoma y de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en Cultivo de Trofozoítos y en la Enquistación.....	150
6.14. Purificación Parcial del Proteosoma 20S de G. intestinalis.....	154
6.14. Ensayos de Activación del Proteosoma de G. intestinalis	161

7. CONCLUSIONES.....164

8. BIBLIOGRAFÍA166

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Quiste de <i>Giardia intestinalis</i>	14
Figura 2. Trofozoíto de <i>Giardia intestinalis</i>	15
Figura 3. Ciclo de Vida de <i>Giardia intestinalis</i>	17
Figura 4. Sistema Ubiquitina-Proteosoma	23
Figura 5. Diagrama de Cintas de Ubiquitina	25
Figura 6. Activación de la Enzima Activadora de Ubiquitina, E1	26
Figura 7. Método para la Purificación de Proteínas Ubiquitinadas Empleando Anticuerpos.	49
Figura 8. Método para la Purificación de Proteínas Ubiquitinadas Empleando Proteínas de Unión a Ubiquitina o UBDs	49
Figura 9. Esquema del Proteosoma Eucariota con sus Subcomplejos	52
Figura 10. Representación del 20S de Levadura Cristalizado	54
Figura 11. Composición de la RP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Figura 12. Modelo de Regulación Acoplada de Activación e Inhibición del Proteosoma	58
Figura 13. Subunidades Catalíticas del Proteosoma del Proteosoma de Levadura en Complejo con Epoxomicina	69
Figura 14. Mecanismo de Inhibición del Proteosoma por MG132	70
Figura 15. Purificación de Ubiquitina	101
Figura 16. Detección de Ubiquitina en Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	103
Figura 17. Detección de Ubiquitina sobre extractos de proteína de trofozoítos	

de <i>G. Intestinalis</i>	104
Figura 18. Control Negativo Patrones de Ubiquitinación	105
Figura 19. Alineamiento entre Ortólogos de Ubiquitina	106
Figura 20. Ensayos de Inmunodetección Cruzados	107
Figura 21. Patrones de Ubiquitinación Durante la Enquistación	108
Figura 22. Crecimiento de Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> Post-inhibición con 50 uM de UBEI-41 por 3 y 24 horas	111
Figura 23. Alineamiento entre ortólogos de la Enzima Activadora de Ubiquitina, E1.	111
Figura 24. Ensayo de Inhibición de E1 en <i>G. intestinalis</i>	112
Figura 25. Efecto de Inhibición del Proteosoma Sobre el Crecimiento de <i>G. intestinalis</i>	117
Figura 26. Efecto de Diferentes Inhibidores del Proteosoma Sobre el Porcentaje (%) de Inhibición del Crecimiento de <i>G. intestinalis</i> .	118
Figura 27. Efecto de Inhibición del Proteosoma Sobre los Patrones de Ubiquitinación	120
Figura 28. Eficiencia de Enquistación in vitro de <i>G. intestinalis</i> con Inhibición del Proteosoma	122
Figura 29. Efecto de MG132 50 uM Sobre la Viabilidad de Quistes de <i>G. intestinalis</i>	123
Figura 30. Ensayo de Viabilidad de Quistes de <i>G. intestinalis</i>	124
Figura 31. Separación de una Proteína Blanco de Ubiquitinación en <i>G. intestinalis</i>	127

Figura 32. Ubiquitinación de HSP90 en <i>G. intestinalis</i> .	129
Figura 33. Expresión de HSP90 Durante la Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	130
Figura 34. Titulación de la Actividad Peptidasa en Extracto Crudo de Proteínas de Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	133
Figura 35. Actividad Peptidasa Similar al Proteosoma en Extractos Crudos de <i>G. intestinalis</i>	134
Figura 36. Perfil de Actividad Peptidasa Similar a Caspasa de un Extracto Crudo de Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	135
Figura 37. Actividad Peptidasa CTL Durante la Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	138
Figura 38. Fraccionamiento de Actividad Peptidasa de Extractos de Proteína del Proceso de Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	139
Figura 39. Ensayo de Actividad Peptidasa en Gel Nativo (Overlay assay)	142
Figura 40. Ensayo de Inhibición de Actividad Tripeptidil Peptidasa en Gel Nativo (Overlay assay)	143
Figura 41. Efecto del Inhibidor de Tripeptidil Peptidasa, H-Ala-Ala-Phe-CH ₂ Cl, (AAF ₂ CMK) sobre el crecimiento de <i>G. intestinalis</i>	145
Figura 42. Efecto de la Inhibición de TPP II Sobre el Número de Duplicaciones de los Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	145
Figura 43. Efecto de la Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en la Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	147
Figura 44. Efecto de la Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa Sobre los Patrones de Ubiquitinación Durante la Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	148

Figura 45. Efecto de la Inhibición Conjunta de TPP II y el Proteosoma en Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	150
Figura 46. Efecto de la Inhibición de TPP II y el Proteosoma Sobre el Número de Duplicaciones de los Trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	151
Figura 47. Efecto de la Inhibición de TPP II y el Proteosoma en la Enquistación de <i>G. intestinalis</i>	152
Figura 48. Purificación del Proteosoma de <i>G. intestinalis</i> — Fraccionamiento del Extracto Crudo por Precipitación con Sulfato de Amonio	155
Figura 49. Purificación del Proteosoma de <i>G. intestinalis</i> – Fraccionamiento del <i>pellet</i> en Gradientes de Glicerol	156
Figura 50. Purificación del Proteosoma de <i>G. intestinalis</i> - Fraccionamiento en columna de DEAE Affigel Blue	157
Figura 51. Purificación del Proteosoma de <i>G. intestinalis</i> – Fraccionamiento en columna de Hidroxiapatita (HAP)	158
Figura 52. Purificación del Proteosoma de <i>G. intestinalis</i>	159
Figura 53. Efecto de PA700 sobre la Actividad Peptidasa de <i>G. intestinalis</i>	161
Figura 54. Efecto de PA28 α sobre la Actividad Peptidasa de <i>G. intestinalis</i>	162

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto de Inhibidores de Proteosoma Sobre Parásitos Protozoarios	75
Tabla 2. Resultados de Espectrometría de Masas: MS+MS/MS.	127

LISTA DE ABREVIATURAS

ALIS: agesome-like induced structure
AMPK: AMP-activated protein kinase
AMSH: associated molecule with the SH3 domain of STAM
APC: anaphase-promoting complex
AZ: antizima
CHIP: carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein
CL: caspase-like activity
CP: partícula central
CP2: cisteína protease 2
CTL: chymotrypsin-like activity
CWP: cyst wall proteins
DUB: deubiquitinadoras
ESV: encysting specific vesicles
GalNAc: N-acetil galactosamina
GST: glutation S transferasa
HCNCp: high cysteine non-variant protein
HECT: homologous to the E6-AP carboxyl terminus
HIF: hypoxia- inducible factor-1
HsluV: heat shock locus V
IAPs: inhibidores de apoptosis
JAMM: domain-asociated metalloisopeptidase Jab1/MPN
LRR: leucine rich repeat
MHC: major histocompatibility complex
MJD: Machado Josephin disease
MS: espectrometria de masas
NER: nucleotid excision repair
NF- κ B: factor nuclear κ B
ODC: onitina decarboxilasa
ORF: open reading frames
OUT: ovarian tumor-related protease
PA: proteínas adaptadoras.
PLM: proteína promielocitica de leukemia
Pru: pleckstrin-like receptor for ubiquitin
Pup: prokaryotic ubiquitin like
pVHL: von Hippel-Lindau protein
RE: reticulo endoplásmico

RING: really interesting new gene
RP: partícula regulatoria
SAGA: Spt-Ada-Gcn5- acetyltransferase
SCF: Skp-1, Cullin-1, Fbox protein
SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SUP: sistema ubiquitina proteosomal
TI: trypsin-like activity
UBC: ubiquitin conjugating enzyme
UBD: ubiquitin binding domain
UBE1: ubiquitin activating enzyme 1
Ubl: ubiquitin-like fold
UCH: ubiquitin carboxy-terminal hydrolases
UIM: ubiquitin interacting motives
ULM: ubiquitin-like modifiers
ULPs: proteasas específicas de Ubls
USP/UBP: ubiquitin-specific processing protease
VSP: variable surface protein

1. INTRODUCCIÓN

Giardia intestinalis es un parásito protozoario flagelado considerado uno de los principales agentes causales de diarrea en humanos y otros mamíferos alrededor del mundo (Adam 2001). Este parásito binucleado ha despertado gran interés científico por dos razones, primero es un eucariota que divergió tempranamente y puede servir como modelo de estudio de procesos celulares básicos tales como la diferenciación celular (Svård et al, 2003; Morrison et al, 2007) y segundo coloniza el intestino proximal de mamíferos superiores y puede causar una patología conocida como giardiosis (Adam 2001), esta enfermedad es considerada un problema de salud pública en países desarrollados y en vía de desarrollo (Lebwohl et al, 2003). Las especies de *Giardia* presentan dos estados en su ciclo de vida; la infección en el hospedero se inicia cuando el quiste es ingerido con agua o alimentos contaminados o a través de contaminación oral-fecal. El quiste es relativamente inerte, lo que permite su supervivencia en una gran variedad de condiciones medioambientales. Después de la exposición al medio ácido del estómago, el quiste exquista en trofozoítos en el intestino delgado proximal. El trofozoíto es la forma vegetativa y replica en el intestino delgado, causando síntomas como diarrea y mala absorción, después de la exposición a fluidos biliares algunos de los trofozoítos forman quistes (enquistación) en el yeyuno, los cuales son eliminados con las heces, permitiendo así que el ciclo se complete (Adam 2001). Algunos estudios han encontrado variaciones en la expresión de diferentes mARNs, durante la enquistación y la exquistación de *Giardia intestinalis* (Hetsko et al, 1998; Touz et al, 2002; Niño y Wasserman 2003; Kim et al, 2009). Además, se ha demostrado la existencia y expresión de genes esenciales dentro del proceso de ubiquitinación de proteínas durante el ciclo de vida de este protozoario (Gallego et al, 2007) y se sabe que *G. intestinalis* posee una partícula central 20S con 7 subunidades α y 7 subunidades β (Emmerlich et al, 1999) y en el genoma hay secuencias homólogas de subunidades de la partícula reguladora 19S (Emmerlich et al, 2001). Esta información nos indica que probablemente *G. intestinalis* tiene un sistema ubiquitina-proteosoma completo. Sin embargo desconocemos si este sistema está participando en los procesos de degradación específica de proteínas y en eventos regulatorios durante el ciclo de vida del parásito.

Para dar inicio a la caracterización bioquímica y fisiológica de este sistema en *G. intestinalis* se realizó el presente trabajo que incluye una investigación acerca de las características de los patrones de ubiquitinación durante el estadio de trofozoíto y durante la enquistación, la

identificación de un sustrato del proceso de ubiquitinación y la evaluación de los efectos de inhibición de la primera enzima del proceso de ubiquitinación (E1) durante la fase vegetativa del ciclo de vida del parásito. Además se obtuvo información novedosa acerca de la actividad peptidasa *in vivo* (cultivo) e *in vitro* (extractos celulares) del proteosoma de *G. intestinalis* y se evaluaron los efectos de inhibición de esta enzima sobre el patrón de conjugados ubiquitina-proteína, viabilidad y morfología del parásito en el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación. Finalmente se logró la identificación de una actividad peptidasa, no reportada previamente, la cual al parecer complementa la actividad de proteólisis del proteosoma. Los resultados de este trabajo son originales y novedosos y constituyen un importante aporte al conocimiento de los procesos de proteólisis específica en *G. intestinalis*. Así mismo, consideramos que representan el punto de partida que direccionará la caracterización bioquímica y fisiológica del sistema ubiquitina-proteosoma de este protozoario tempranamente divergente. Además, la comprensión de los procesos de biosíntesis y degradación de proteínas intracelulares en *G. intestinalis* pueden constituir un importante sistema modelo para el estudio de procesos celulares regulados por la actividad del sistema Ubiquitina-Proteosoma en células eucariotas, ya que en muchas vías que requieren complejos multiproteicos, es evidente que *Giardia* tiene un menor número de componentes cuando se compara con otros organismos eucariotas. Si esto se debe a su divergencia temprana o a reducción genómica, *G. intestinalis* provee las claves acerca de los mínimos componentes necesarios en procesos celulares complejos (Morrison et al, 2007; Cacciò y Sprong 2009).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *BIOLOGÍA DE Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis (Sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*) es un microorganismo protozoario flagelado, amitocondriado que fue identificado inicialmente por Van Leewenhoek en 1681 y posteriormente descrito con detalle por Lambl en 1859. En la clasificación de los protozoos de Levine y colaboradores (1980), se incluye en el phylum: Sarcomastigophora, subphylum: Mastigophora, clase: Zoomastigophorea, orden: Diplomonadida, familia: Hexamitidae que incluye al género *Giardia*. *G. intestinalis* es considerado como una de las principales causa de diarrea alrededor del mundo (Adam 2001). Produce una patología intestinal denominada Giardiosis que afecta especialmente a niños menores de 10 años y conduce a problemas de mala absorción, malnutrición y retraso en el crecimiento (Thompson et al, 1993; Lebwohl et al, 2003). Por otro lado, *G. intestinalis* ha sido reconocido como uno de los eucariotas más antiguos basados en los análisis filogenéticos de las secuencias de ARN ribosomal (ARNr) y de varias proteínas (Reiner et al, 2003; Best et al, 2004) y se ha determinado que este protozoario muestra de manera consistente un patrón simplificado de: maquinaria molecular, estructura de su citoesqueleto y vías metabólicas, comparado con líneas que divergieron más tardíamente como los hongos, *Trichomonas* y *Entamoeba* (Morrison et al, 2007). A pesar de que la visión de fósil o parásito antiguo se encuentra en discusión por recientes estudios sistemáticos (Embley y Martín 2006; Dacks et al, 2008) y de sus snoARNs (Luo et al, 2009), *G. intestinalis* sigue siendo considerado un excelente modelo para realizar estudios funcionales y genómicos de otros parásitos protozoarios intestinales cuyo ciclo de vida no puede ser realizado en el laboratorio y además es un modelo interesante para el estudio de muchos procesos celulares (por ejemplo, la diferenciación celular, el tráfico y degradación específica de proteínas), ya que en muchas vías que requieren complejos multiproteicos, es evidente que *Giardia* tiene un menor número de componentes cuando se compara con otros organismos eucariotas. Si esto se debe a su divergencia temprana o a reducción genómica, *G. intestinalis* provee las claves acerca de los mínimos componentes necesarios en procesos celulares complejos (Morrison et al, 2007; Cacciò y Sprong 2009).

G. intestinalis es un típico organismo eucariota en cuanto a que posee núcleo, nucléolo, envoltura nuclear, citoesqueleto y sistema de endomembranas, pero carece de algunos organelos que son

casi universales en los eucariotas tales como peroxisomas, además es anaerobio y carece de la mitocondria y de los componentes de la fosforilación oxidativa (Adam 2001). El descubrimiento del gen *cpn60* similar a mitocondrial y un mitosoma implica que la ausencia de mitocondria en *G. intestinalis* puede reflejar una adaptación a un estilo de vida microaerófilico más que a divergencia antes de la endosimbiosis del ancestro mitocondrial (Regoes et al, 2005).

2.1.1. Estadios Morfológicos

Durante el ciclo de vida, *G. intestinalis* presenta dos estadios claramente diferenciables el quiste y el trofozoíto.

2.1.1.1. Quiste: es la forma infectiva del parásito, es resistente a las condiciones ambientales externas y tiene una tasa metabólica de tan solo el 10 al 20% de la encontrada en los trofozoítos (Adam 2001). El quiste tiene forma elipsoidal con 8-12 μm de longitud por 5 a 8 μm de diámetro, está cubierto por una pared que tiene entre 0.3 y 0.5 μm de grosor (Fig. 1). La pared es una estructura rígida, compuesta por una capa externa filamentosa de N-acetil galactosamina (GalNAc), asociada con proteínas, siendo las más abundantes las CWP (Cyst Wall Proteins): CWP1, CWP2 (Gillin et al, 1996; Luján et al, 1998) y la CWP3 (Sun et al, 2003), estas tres proteínas están relacionadas y se caracterizan por poseer secuencias repetidas ricas en leucina en su secuencia. Una cuarta proteína, HCNCp (*High Cysteine Non-variant Cyst protein*), hace parte de la pared del quiste y es una proteína rica en cisteína (Davids et al, 2006). Las vesículas específicas de enquistación (*Encysting-Specific Vesicles-ESVs*), son las encargadas de transportar por vía secretoria enzimas y las proteínas que participan en la formación de la pared del quiste (Adam 2001). El análisis cinético, reveló que las ESVs se originan de la cisterna del retículo endoplásmico (RE), sugiriendo una nueva vía secretoria en la cual las funciones del RE y del sistema Golgi co-localizan (Lanfredi-Rangel et al, 2003). El mecanismo estructural involucrado en la deposición de la pared del quiste se ha descrito como un mecanismo de fusión de membranas diferente del que tradicionalmente se observa en exocitosis. Después de la liberación de su contenido, las membranas pueden ser cerradas nuevamente para formar vesículas vacías, las cuales pueden ser endocitadas por el parásito y/o permanecer como vesículas vacías (Benchimol 2004). Dos membranas celulares hacen parte de la pared del quiste además de la capa fibrilar. Estos componentes membranosos se originan de vacuolas grandes (Chávez-

Munguía et al, 2004), las cuales se elongan y fusionan entre ellas para formar dos membranas continuas alrededor del parásito. El origen de estas vesículas grandes es aún desconocido, pero pueden derivar de los remanentes de ESVs (Luján et al, 1997).

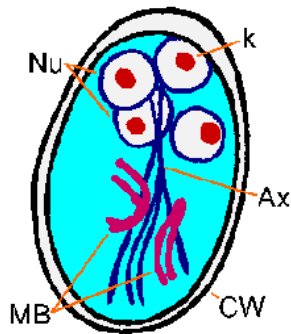


Figura 1. Quiste de *Giardia intestinalis*. Los quistes tienen forma elipsoidal de 8-12 μm de longitud por 5 a 8 μm de diámetro, están cubiertos por una pared (CW) que tiene entre 0.3 y 0.5 μm de grosor. Cuatro núcleos (Nu) están ubicados en el extremo anterior del quiste. El quiste maduro carece de flagelos y disco ventral pero persisten los axonemas (Ax) y cuerpos medios (MB). Tomado y modificado de <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/intes.html>

2.1.1.2. Trofozoíto: es la forma vegetativa, tiene forma de pera y mide aproximadamente 10 a 12 μm de longitud por 5 a 7 μm de ancho (Fig. 2). El citoesqueleto incluye: un cuerpo medio, el cual es una estructura no membranosa asociada al racimo de microtúbulos en la mitad del cuerpo celular y cuya función es desconocida (Piva y Benchimol 2004); cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral); el funis, una estructura pobremente estudiada y que está compuesta de microtúbulos que se extienden entre el flagelo caudal y varas flagelares postero-laterales (Benchimol et al, 2004) y un disco ventral, que contiene microtúbulos de α y β tubulina y microcintas de β -giardina (Adam 2001; Campanati et al, 2003). El citoesqueleto y fundamentalmente el disco ventral tienen un papel importante en la supervivencia de *G. intestinalis* en el intestino del hospedador. El disco ventral es una estructura cóncava que ocupa las dos terceras partes de la superficie ventral del trofozoíto, contiene proteínas contráctiles actina, miosina y tropomiosina que constituyen la base bioquímica para la contracción del disco, implicada en la adherencia del trofozoíto al epitelio intestinal (Gillin y Reiner 1982; Palm et al, 2005). Los trofozoítos de *Giardia* poseen dos núcleos que están localizados anteriormente y son simétricos con respecto al eje longitudinal, poseen la misma cantidad de ADN, se replican casi al mismo tiempo, son transcripcionalmente activos (Adam 2001) y poliploides con cuatro copias de cada uno de los cinco cromosomas que poseen un tamaño aproximado de 1,6 Mb (cromosomas 1 y 2), 2.3 Mb (cromosoma 3), 3.0 Mb (cromosoma 4) y 3.8 Mb (cromosoma 5), que resulta en un genoma haploide de 12 MB (Bernarder et al, 2001). Cada núcleo posee un compartimento

nucleolar, en el cual hay actividad transcripcional y procesamiento de ARNr (Jiménez-García et al, 2008).

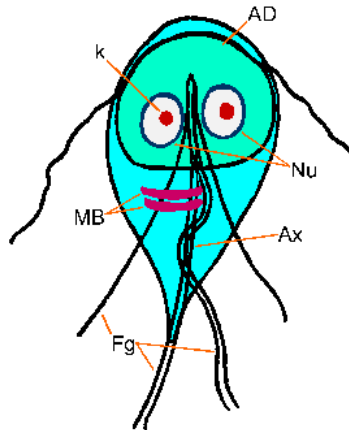


Figura 2. Trofozoito de *Giardia intestinalis*. es la forma vegetativa, tiene forma de pera y mide aproximadamente 10 a 12 μm de longitud por 5 a 7 μm de ancho. Los trofozoitos poseen dos núcleos (Nu) con cariosomas (k) centrales, dos cuerpos medios (MB), que son estructuras con forma de costilla curva que se originan posterior a los núcleos y las fibras que recorren el parásito y que se conocen como axonemas (Ax), los cuales se forman de las regiones proximales de los flagelos (Fg). Un disco ventral o adhesivo (AD) se ubica en la región ventral y extremo anterior del trofozoito. Tomado y modificado de <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/intes.html>

2.1.2. Ciclo de Vida (Fig. 3)

La infección en el hospedador se inicia cuando el quiste es ingerido con agua o alimentos contaminados o a través de contaminación oral-fecal. El quiste es relativamente inerte lo cual permite su supervivencia en una gran variedad de condiciones medioambientales. Después de la ingestión, la exposición del quiste a los ácidos gástricos del hospedador induce que el quiste salga de su estado durmiente de arresto del ciclo celular y en respuesta al pH alcalino y proteasas del intestino delgado, se da el proceso de exquistación. Los estímulos que promueven la exquistación de *G. intestinalis* son bien conocidos pero aún no hay una comprensión exacta del mecanismo. Inicialmente se logró la exquistación en condiciones óptimas luego de la exposición de los quistes a pH de 1.3 a 2.7, posteriormente, la exquistación de *Giardia muris* se realizó a pH 7.5 en buffer fosfato con bicarbonato, indicando que el pH ácido no se requiere para la exquistación. Luego, estudios de quistes producidos *in vitro* encontraron como pH óptimo, 4. La exquistación fue facilitada por proteasas pancreáticas e inhibida por un inhibidor de tripsina. Además de proteasas externas la cisteína proteasa 2 (CP2) se requiere para la exquistación, inhibidores de estas enzimas previenen la exquistación sin afectar el crecimiento y replicación de los trofozoitos (Ward et al, 1997). Algunos antagonistas de calmodulina (TFP y W7) inhiben la exquistación sugiriendo que esta proteína puede estar involucrada en este proceso (Bernal et al, 1998). En general, después de la exposición a las condiciones que promueven la exquistación el proceso se completa en 10 minutos. Luego de iniciada la exquistación las células recientemente exquistadas

se dividen dos veces sin replicación del ADN y son denominadas exquistos, son células ovals con ocho flagelos largos, cuatro núcleos y con un contenido de ADN 16N y su metabolismo es intermedio entre el trofozoito y el quiste (Bernander et al, 2001). El trofozoito binucleado que coloniza el epitelio del intestino delgado pasa de una ploidia celular 4N a una 8N, durante el ciclo celular normal y de esta manera los trofozoitos se pueden multiplicar por largos periodos de tiempo (Reiner et al, 2008).

El trofozoito se replica en el intestino delgado, causando síntomas como diarrea y mala absorción, después de la exposición a fluidos biliares, algunos de los trofozoitos forman quistes (enquistación) en el yeyuno. Las condiciones específicas que promueven la enquistación incluyen un medio con pH alcalino (pH de 7,8) y sales biliares conjugadas más ácidos grasos. La enquistación es inhibida cuando se adiciona colesterol, sin embargo la deprivación de colesterol y adición de sales biliares y ácidos grasos aún es controversial como factores esenciales en este proceso. La enquistación se divide en dos fases: una fase temprana, la cual se completa en aproximadamente 10 horas e incluye cambios en división celular, ultraestructura, transporte de proteínas y expresión génica. Rápidamente el trofozoito adquiere una forma redondeada y pierde la capacidad de adherirse a las superficies (Adam 2001). Durante este periodo ocurre la síntesis y transporte de los componentes de la pared del quiste. Un conjunto de membranas similares a las de Golgi son visibles por microscopía electrónica, son las ESVs, las cuales al parecer están involucradas en el transporte de las proteínas de la pared del quiste (Reiner et al, 1990). La fase tardía de la enquistación se completa en aproximadamente 16 horas más y se caracteriza por la aparición de sitios de ensamblaje de los filamentos de la pared del quiste en el plasmalema del trofozoito (Adam 2001). Es esta fase, el núcleo de la célula enquistante (enquistos) se divide y el ADN es replicado durante un ciclo celular modificado que involucra carioquinesis sin citoquinesis o endorreplicación (Bernander et al, 2001), produciendo un quiste con una ploidia celular de 16N. Cuando la enquistación se está completando, la motilidad es abolida y la parte externa del parásito se torna redondeada y filamentosa, las ESVs desaparecen y en la parte interna hay dos trofozoitos con cuatro núcleos. Los quistes son eliminados con las heces, permitiendo así que el ciclo se complete (Adam 2001).

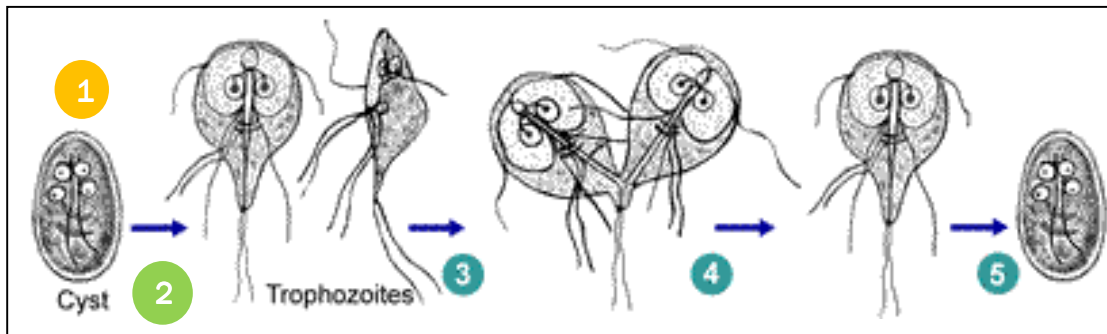


Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*. Los quistes son las formas resistentes de *Giardia* y son las responsables para la transmisión de la enfermedad. ①. Los quistes sobreviven por varios meses en el medio ambiente. La infección ocurre por la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados o por la ruta fecal-oral, a través de manos o fómites sucios. ②. En el intestino delgado ocurre el proceso de exquistación al final del cual se producen los trofozoítos (cada quiste da origen a dos trofozoítos) ③. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal, permaneciendo en el lumen intestinal, al cual se adhieren a través del disco ventral ④. La enquistación ocurre a medida que el parásito transita hacia el colon. ⑤. Después de la exposición a fluidos biliares algunos de los trofozoítos forman quistes, los cuales son liberados al medio ambiente junto con las heces. Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>

2.1.3. Genoma

El genoma de *G. intestinalis* WB clon C6 (ATCC50803) es compacto, con ~11,7 MB en tamaño y está distribuido en cinco cromosomas. Morrison y colaboradores (2007) identificaron 6470 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frames*-ORFs) con una distancia intergénica promedio de 372 pares de bases (pb). Aunque el número total de ORFs es similar al de levadura, muchas vías específicas en *G. intestinalis* parecen simples en comparación con las de otros organismos eucariotas. Así el genoma de *G. intestinalis* codifica una forma simplificada de muchos procesos celulares, encontrando de forma característica: más subunidades básicas, incorporación de dominios bacteriales simples, enzimas similares a las de Archaea y un limitado repertorio metabólico. Sin embargo no se debe descartar que algunos componentes considerados ausentes en *G. intestinalis* pueden ser altamente divergentes y por esto difíciles de reconocer y otros pueden ser no esenciales o funcionalmente redundantes con otras proteínas de la misma vía o vías alternas.

La síntesis de ADN, transcripción, procesamiento del ARN y maquinaria del ciclo celular son simples. La presencia de solo dos complejos proteicos de reconocimiento (Orc4 y Orc1/Cdc6) en

Giardia y la ausencia de proteínas regulatorias de iniciación (Cdt1, Dpb11, Cdc45, MCM10, y Gemini) son comparables a Archaea. *G. intestinalis* tiene tres ADN polimerasas tipo B replicativas (Pol α , Pol β y Pol γ). La presencia de cuatro subunidades en el complejo primasa/Pol α es típica de otros eucariotas, mientras que la composición de Pol β y Pol γ se parecen más a las polimerasas de Archaea. La mayoría de las proteínas accesorias de ADN polimerasa son típicas de eucariotas (Morrison et al, 2007). Comparado con *Saccharomyces*, *G. intestinalis* ha retenido la mayoría de los péptidos centrales de ARN polimerasa I, ARN polimerasa II y ARN polimerasa III (Best et al, 2004). Además, *G. intestinalis* contiene solo cuatro de los 12 factores de iniciación de la transcripción presentes en *Saccharomyces* (Morrison et al, 2007).

Hay evidencia de recombinación en los telómeros de algunos cromosomas, sin embargo en las zonas internas de los cromosomas no hay evidencia de recombinación (Adam 2000). En el genoma de *G. intestinalis* se han identificado pocos intrones, el primer gen reportado fue la ferredoxina (Seshadri et al, 2003), posteriormente se reportaron los genes para la proteína ribosomal L7A, una proteína de cadena liviana dineína y una proteína desconocida (Russell et al, 2005; Morrison et al, 2007). Por otro lado, Hausmann y colaboradores (2005) demostraron que *Giardia* posee la maquinaria enzimática para la síntesis de Cap, modificando así el extremo 5' de sus mARNs. La mayoría de transcritos de *G. intestinalis* tienen UTRs 3' relativamente cortos y poseen colas poli(A) que inician aproximadamente 10 a 30 nucleótidos más allá del codón de parada (Adam 2001).

Otros organelos presentes en el citoplasma de los trofozoítos de *Giardia* son los ribosomas, los lisosomas que contienen hidrolasas, ADNasas, ARNasas y cisteína proteasas (Adam 2001).

2.1.4. Variación Antigénica

En trofozoítos de *G. intestinalis* se ha reconocido variación antigénica de una familia de antígenos de superficie inmunodominantes ricos en cisteína tanto *in vivo* como *in vitro* (Adam et al, 1988). Estos antígenos de superficie conocidos como VSP (*Variable Surface Protein*), varían en número y su tamaño va de 50 a 200 kDa (Nash et al, 1985). En el sistema de cultivo axénico la variación antigénica ocurre cada 6 a 13 generaciones (Nash et al, 2001). El genoma del parásito codifica un amplio repertorio de genes VSPs (Morrison et al, 2007), pero solo una VSP es expresada en determinado momento en la superficie de los trofozoítos (Nash 2002). Recientemente, Prucca y

colaboradores (2008) reportaron que la regulación de la expresión de las VSPs involucra la maquinaria de ARN interferente, con la participación de un sistema de ARN polimerasa dependiente de ARN, Dicer y Argonauta.

Las posibles razones biológicas de la variación antigénica son una respuesta a la reacción inmune del hospedador y la adaptación a diferentes ambientes intestinales. La variación antigénica también ha sido documentada durante la enquistación y la exquistación. *In vitro* la enquistación seguida por exquistación de trofozoítos que expresan la VSP, TSA417 resultaron en la pérdida de la membrana plasmática luego de comprobarse su presencia en las vacuolas citoplasmáticas periféricas similares a lisosomas (McCaffery y Gillin 1994). Durante la exquistación TSA417 fue reemplazada por otra variedad de VSP, lo que ocurre muy rápidamente y puede representar un cambio antigénico inducido. Esto puede promover la supervivencia de *Giardia* por evasión de la respuesta inmune o por adaptación a otros factores intestinales. Dos hipótesis que no son mutuamente excluyentes. (Adam 2001)

Análisis de las secuencias de las VSPs revelaron que son proteínas ricas en cisteína con motivos CXXC frecuentes (Adam et al, 1988), uno o dos motivos GGCY, una cola hidrofóbica conservada y un motivo Zn finger (Nash 2002). Después de su síntesis, las VSPs son transportadas a través del RE a la membrana, donde la recubren difusamente. También se han detectado pequeñas cantidades de VSPs en las vacuolas periféricas similares a lisosomas, sugiriendo la posibilidad de que estas vacuolas estén involucradas en el recambio de estas proteínas. Las VSPs tienen en su amino terminal un péptido señal de aproximadamente 14 a 17 aminoácidos que posiblemente representa la señal para su transporte en el RE (Aley y Gillin 1993). En el extremo carboxilo terminal tienen una región que atraviesa la membrana y la cual termina en CRGKA y una extensa señal de poliadenilación. Morrison y colaboradores (2007) estimaron un repertorio de 235 a 275 genes que codifican VSPs. Estos genes frecuentemente se agrupan de 2 a 9 en una orientación cabeza-cola. Las distancias intergénicas entre miembros de un grupo pueden ser muy cortas, con el extremo 5' de una VSP traslapando con el extremo 3' de la segunda.

2.1.5. Transporte de Proteínas y Degradación

G. intestinalis posee un RE convencional con chaperonas conservadas (BiP, Hsp90, DnaJ), pero tiene una característica particular, la presencia de cinco proteínas disulfido isomerasas, cada una con un solo sitio activo (McArthur et al, 2001) y sin la proteína Ero1 que es la encargada de dirigir la formación de disulfidos en el lumen del RE. El transporte de membrana en *G. intestinalis* es muy diferente al de otros parásitos protozoarios (Marti et al, 2003). A pesar de poseer una estructura celular altamente polarizada, no hay evidencia concluyente de la presencia de un aparato de Golgi real o cisterna para la maduración postranscripcional del cargo secretorio, excepto en células enquistantes (Gillin et al, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que el factor de ribosilación ADP (ARF), el cual es una proteína de unión necesaria para el recubrimiento y formación de las vesículas con COP y clatrina en el complejo de Golgi se expresa en los trofozoítos de *G. intestinalis* (Adam 2001). Solo unas pocas Rabs, SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) y un pequeño número de complejos de proteínas adaptadoras (PA) participan en el acoplamiento y fusión de membranas vesiculares. A diferencia de otros eucariotas que tienen al menos tres complejos PA, *G. intestinalis* codifica solo dos. Esto permite argumentar la presencia de un sistema de transporte de membranas simple en este parásito (Morrison et al, 2007).

Los trofozoítos tienen numerosas vacuolas en la periferia de la célula, las cuales tienen características que semejan endosomas y lisosomas. Estas vacuolas son ácidas, concentran ferritina exógena sugiriendo su papel en endocitosis y poseen una gran variedad de actividades hidrolasa, tales como fosfatasas, proteínasas y ARNasas, indicando sus características lisosomales (Adam 2001). Mientras los lisosomas degradan proteínas captadas por endocitosis el proteosoma degrada proteínas endógenas de forma específica y regulada a través de un sistema dependiente de ATP denominado Sistema Ubiquitina Proteosoma (SUP); el proteosoma de *G. intestinalis* muestra un patrón característico de eucariotas con 14 subunidades (Emmerlich et al, 1999), las proteínas son reconocidas por el proteosoma luego de su unión a ubiquitina, la cual está presente en *Giardia* y es codificada por dos tipos de genes, un gen de ubiquitina y genes de ubiquitina unida a una proteína ribosomal, lo que estaría de acuerdo con los numerosos reportes de múltiples genes que codifican ubiquitina en otros eucariotas (Gallego et al, 2007). Sin embargo, la caracterización bioquímica del SUP es incipiente y no existe información acerca de la

funcionalidad de este sistema de degradación específica de proteínas durante el ciclo de vida de *Giardia*.

2.1.6. Metabolismo

G. intestinalis es un parásito microaerófilico, que tiene un repertorio metabólico limitado. No tiene homólogos de las enzimas del ciclo de Krebs y excepto por las vías de salvamento, no hay evidencia de genes asociados a la biosíntesis de purina y pirimidina. El metabolismo de aminoácidos también es limitado, a pesar de que todas las sintetetas tARN están presentes. En cuanto al metabolismo de lípidos, el genoma de *G. intestinalis* tiene enzimas capaces de realizar una limitada extensión de ácidos grasos y ensamblaje de esfingomielina, también como modificación e intercambio de la cabeza polar de los fosfolípidos. Aunque este repertorio enzimático no es suficiente para la síntesis *de novo* de lípidos, estas enzimas permiten la remodelación de los componentes de membrana (Morrison et al, 2007). Los trofozoítos obtienen los lípidos a partir del colesterol y fosfatidilcolina del medio ambiente externo (Luján et al, 1996). Hernández y colaboradores (2007) encontraron que *Giardia* emplea vías dependientes de clatrina y filamentos de actina para la endocitosis de ceramida, los resultados de este trabajo sugieren que *G. intestinalis* posee una maquinaria especializada en el marcaje y transporte de lípidos provenientes del medio externo.

La glucosa es una fuente de energía importante en *Giardia* y contribuye significativamente a la producción de ATP, sus productos finales son alanina, etanol, acetato y CO₂ (Lindmark 1980; Schofield et al, 1991). Recientemente, Ladeira y colaboradores (2005) comprobaron la presencia de glicógeno como reserva energética en trofozoítos de *G. intestinalis*. Las actividades glicolíticas asociadas con enzimas involucradas en el procesamiento de hexosa y en la interconversión y fosforilación a glicolisis fructosa 1-6 fosfato son más similares a los procesos bacterianos que a los de eucariotas superiores (Suguri et al, 2001). *Giardia* metaboliza arginina por la vía anaerobia, arginina dihidrolasa, originalmente descrita en bacterias, pero no descrita en otros eucariotas excepto *Trichomonas* (Carlton et al, 2007). Las enzimas arginina deiminasa, ornitina carbamoiltransferasa y la quinasa carbamato son enzimas parecidas a las de Archaea y producen amonio, ornitina y ATP. De esta manera los trofozoítos consumen la arginina del medio intestinal para la biosíntesis de óxido nítrico (Li et al, 2006). Durante la enquistación, *G. intestinalis* sintetiza UDPGalNAc a partir de fructosa-6-fosfato, por una vía de cinco enzimas similar a la vía bacteriana.

La mayoría de los eucariotas usan la primera enzima, glucosamina-6-fosfato isomerasa para generar glucosamina-6-fosfato de fructosa-6-fosfato y amonio para glicolisis. Pero *G. intestinalis* usa el amonio del metabolismo de arginina para dirigir la síntesis de glucosamina-6-fosfato para la biosíntesis de los polisacáridos de la pared del quiste (Brown y Upcroft 1995)

2.2. SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSOMA

La degradación de las proteínas intracelulares es un proceso complejo, controlado temporalmente y fuertemente regulado que lleva a cabo la degradación específica de proteínas anormales y aquellas de vida media corta; es una vía dependiente de ATP denominada ubiquitina/proteosoma. La degradación de una proteína a través de esta vía es importante para la regulación de procesos celulares y para la eliminación de las proteínas defectuosas e involucra dos pasos sucesivos: a) identificación o marcaje del sustrato por la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina (Ub) y b) degradación de la proteína marcada por el complejo 26S proteosoma con liberación de ubiquitina libre y reutilizable (Glickman y Ciechanover 2002). Fig. 4

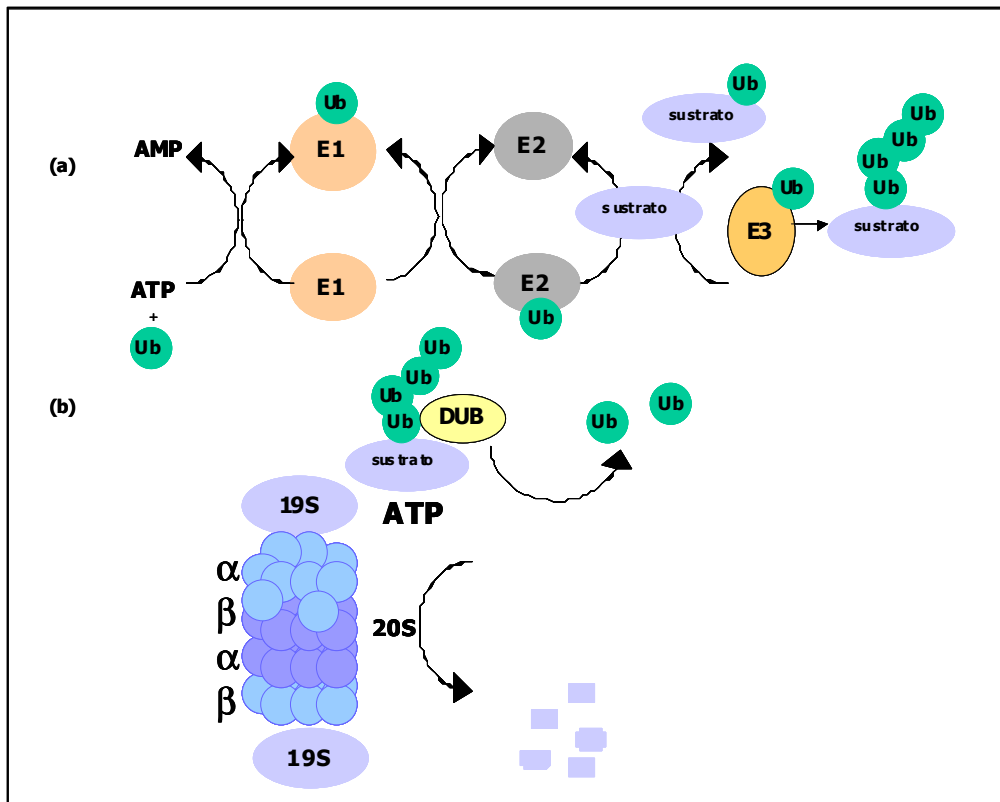


Figura 4. Sistema Ubiquitina- Proteosoma. E1 activa la Ub en una reacción que requiere de ATP generando un intermediario tiol-éster de alta energía, E1-S-ubiquitina. E2 transfiere la Ub activada desde E1, a través de un intermediario tioéster adicional de alta energía, E2-S-ubiquitina, al sustrato que está unido específicamente a E3. E3 cataliza la unión covalente de ubiquitina al sustrato. Luego, tienen lugar sucesivas adiciones de Ub activada a residuos internos de Lisina sobre la molécula de Ub previamente conjugada, que posteriormente serán reconocidas por el complejo proteosoma 26S.

2.2.1. Ubiquitina

La ubiquitina es un polipéptido de 76 residuos de aminoácidos con 8,5-kDa que constituye el componente esencial del sistema de proteólisis específica dependiente de ATP o Sistema Ubiquitina Proteosoma (SUP) (Ciechanover 2005). Además, la ubiquitina es el prototipo de una familia de proteínas que son muy conservadas desde el punto de vista estructural, pero que varían en su secuencia. Las formas maduras de la mayoría de proteínas de esta familia terminan en una secuencia característica diglicina, la cual es expuesta solo después de procesamiento proteolítico (Pickart y Eddins 2004).

En levadura, así como en la mayoría de eucariotas, ubiquitina se expresa en forma de tres precursores diferentes: 1) Como una proteína de fusión lineal que consta de cinco o más copias de ubiquitina, unidas en una configuración cabeza a cola, esta forma es llamada precursor poliubiquitina. 2 y 3) Ubiquitina codificada como una fusión amino terminal a las proteínas ribosomales S27a y L40, en este caso la ubiquitina actúa como una chaperona y contribuye a la formación del holoribosoma (Finley et al, 1989; Redman y Rechsteiner 1989; Spence et al, 2000; Catic y Ploegh 2005). Dentro de sus precursores la secuencia de ubiquitina es idéntica para cada especie (Catic et al, 2007).

La estructura de ubiquitina fue revelada por cristalografía de rayos X. La forma plegada de la ubiquitina se forma alrededor de un centro hidrofóbico. Esta consta de cinco hojas beta, una alfa hélice de 3,5 vueltas y una vuelta helical con estructura secundaria del tipo 3_{10} (Fig. 5). La primera y la última hoja beta están paralelas una a la otra. Las demás hojas beta son antiparalelas (Vijay-Kumar et al, 1985 y 1987). La ubiquitina es una de las proteínas más estables que se conoce y permanece adecuadamente plegada a temperaturas superiores a 85 °C y en un rango de pH de 1 a 13 (Lenkinski et al, 1977). Esta estabilidad se le atribuye a su fuerte plegamiento, conocido como "plegamiento comprimido beta", en donde las cuatro hojas beta se empaquetan alrededor de una alfa hélice central (Groettrup et al, 2008).

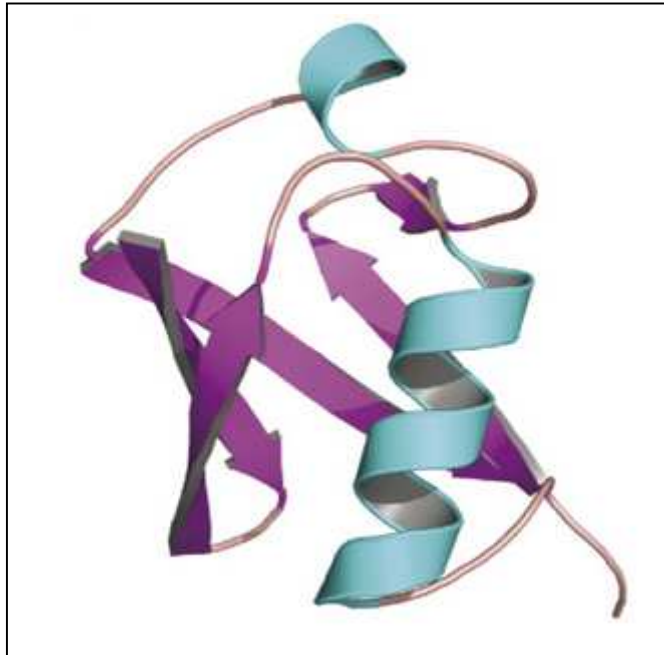


Figura 5. Diagrama de cintas de ubiquitina. Ubiquitina muestra su típico plegamiento comprimido beta, mientras una α hélice (azul) es rodeada por las hojas β (púrpura). Tomado de Groettrup et al, 2008.

2.2.2. La Vía de Ubiquitinación

La ubiquitinación ocurre como resultado de la actividad secuencial de tres clases de enzimas, E1 o enzima activadora de ubiquitina, E2 o enzima conjugadora de ubiquitina y E3 o enzima ubiquitina ligasa. E1 es la primera enzima de la vía de ubiquitinación y forma un enlace tiol-éster entre su sitio activo cisteína y la glicina carboxilo terminal de la ubiquitina. La ubiquitina activada sobre E1 es entonces transferida al sitio activo cisteína de una enzima E2 por transesterificación. E3 se une a la enzima E2 cargada con ubiquitina y al sustrato y facilita la formación de un enlace isopeptídico entre la glicina carboxilo terminal de ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo interno de lisina de la proteína sustrato o de una molécula de ubiquitina previamente conjugada a la proteína sustrato (Fang y Weissman 2004; Passmore y Barford 2004). En algunos casos la ubiquitina es conjugada al grupo α -amino libre del sustrato (Ciechanover y Ben-Saadon 2004)

2.2.3. Enzima Activadora de Ubiquitina (E1)

Hasta ahora se han identificado ocho enzimas E1, basados en su estructura de tres dominios conservados y la mayoría se han asociado a ubiquitina o a un modificador similar a ubiquitina (*Ubiquitin-like modifiers*-ULM) específico. Las enzimas E1 están formadas por una cadena de polipéptidos simples (UBA1) o pueden ser heterodímeros tales como las enzimas AOS1–UBA2 y la proteína de unión al precursor β -amiloide-1 (*β -amyloid precursor protein-binding protein*-APPBP), UBA3 para SUMO1–3 y NEDD8, respectivamente. Estas últimas tienen los dominios característicos de E1 en dos polipéptidos separados (Johnson et al, 1997; Liakopoulos et al, 1998). Las tareas principales de las enzimas E1 son: primero seleccionar y unir no covalentemente a su respectivo ULM, posteriormente realizan la activación del carboxilo terminal del ULM para que tenga la capacidad de formar un enlace isopeptídico. Esta activación se lleva a cabo a través de un mecanismo ordenado en el cual primero el ATP es unido por la enzima E1, seguido por la unión del ULM (Haas et al, 1982; Bohnsack y Haas 2003). El grupo carboxilo terminal del ULM ataca el fosfato α del ATP para formar con el AMP un acil-fosfato anhidro rico en energía. Posteriormente, el grupo carboxilo terminal glicina activado del ULM es sometido a un ataque nucleofílico por el átomo azufre de un residuo conservado cisteína en el sitio activo de todas las enzimas E1. Esta actividad resulta en la formación de un intermediario tio-éster E1-ULM rico en energía, el cual permanece covalentemente unido mientras un segundo ULM es reclutado al sitio de adenilación (Haas et al, 1982). De esta manera el ULM está listo para ser pasado a su respectiva enzima E2 en una reacción de transtiolación (Fig. 6).

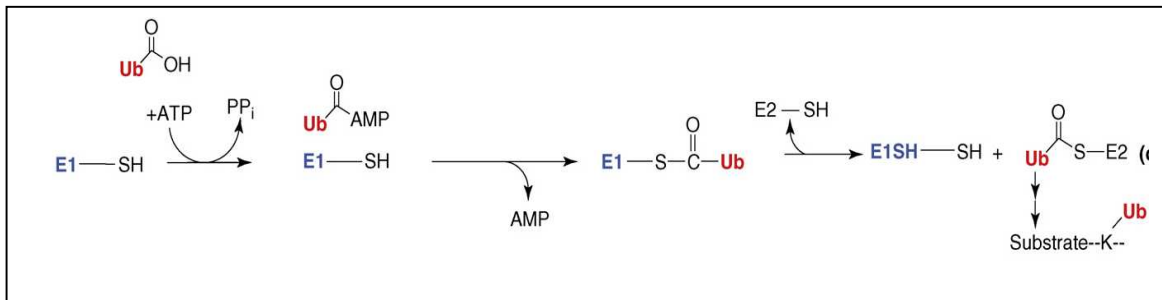


Figura 6. Activación de la enzima activadora de ubiquitina E1. La enzima E1 une ATP y Ub. El grupo C-terminal de Ub ataca el fosfato α del ATP para formar con el AMP un acil-fosfato anhidro rico en energía. Luego, el grupo C-terminal glicina activado de Ub es sometido a un ataque nucleofílico por el átomo azufre de un residuo conservado cisteína en el sitio activo de E1. Esto resulta en la formación de un intermediario tio-éster E1-Ub rico en energía, el cual permanece covalentemente unido mientras una segunda molécula de Ub es reclutada al sitio de adenilación. De esta manera Ub está lista para ser pasada a su respectiva enzima E2 en una reacción de transtiolación. Tomado y modificado de Groettrup et al, 2008.

Existe un alto grado de conservación entre las enzimas activadoras conocidas, por lo que se ha descrito que todas las enzimas E1 poseen dominios trimodulares, los cuales se encargan de regular su función. Los dominios están ordenados alrededor de dos hendiduras que coordinan la unión al nucleótido y a la proteína (Dye y Schulman 2007). La porción amino terminal de las enzimas E1 dirige la unión del ATP y el ULM o la ubiquitina. Este módulo está compuesto de dos motivos homólogos ThiF, los cuales se nombran de acuerdo a un dominio homólogo en la enzima bacteriana ThiF. El segundo dominio homólogo ThiF contiene el motivo consenso GxGxxGCE, el cual dirige la unión del ATP. El siguiente módulo posee el sitio activo cisteína entre el motivo consenso PxCTxxxP. La mayoría de los cien aminoácidos del extremo carboxilo terminal de las enzimas E1 constituyen el tercer módulo, es un dominio con plegamiento similar a ubiquitina, el cual se une a las enzimas E2 y por tanto está involucrado en la selectividad de las enzimas E1 por diferentes enzimas E2 (Huang et al, 2007; Jin et al, 2007).

Recientemente se describió que ubiquitina puede ser activada por dos enzimas diferentes E1, la enzima activadora de ubiquitina 1 (*Ubiquitin-Activating Enzyme 1-UBE1*) y UBA6 (Chiu et al, 2007, Pelzer et al, 2007), y que UBA6 puede activar dos diferentes ULMs (ubiquitina y FAT10) (Chiu et al, 2007). Lo cual permite sugerir que la tradicional cascada que incluía una única y específica enzima E1 para cada ULM no es del todo válida.

La enzima E1 activadora de Ubiquitina (UBE1) existe en dos isoformas en células humanas, "E1_{110kDa} y E1_{117kDa}", nombres que reflejan su masa molecular aparente en geles denaturantes de SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate-Polyacrilamide*) (Cook y Chock 1992). Esta enzima es fosforilada y posee una señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence-NLS*), esta última es esencial para que ocurra la fosforilación de la enzima (Cook y Chock 1995; Nagai et al, 1995; Stephen et al, 1997). Esta modificación parece jugar un papel importante en la localización nuclear de la enzima de una manera dependiente del ciclo celular (Stephen et al, 1997).

2.2.3.1. Inhibidores de la enzima E1: La actividad de la enzima E1 es el primer paso en el proceso de ubiquitinación y constituye un eslabón esencial para la adecuada funcionalidad del SUP. Por lo anterior, existe mucho interés en la búsqueda e identificación de inhibidores específicos de esta enzima, los cuales primordialmente serían empleados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones del SUP, pero que también permitirán profundizar en los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de este sistema en las células eucariotas.

- *Panepophenanthrin*: es un producto natural que inhibe la enzima activadora de ubiquitina E1 y fue aislado por Sekizawa y colaboradores 2002 de una cepa de champiñón, *Panus rudis* Fr. IFO8994. Estructuralmente, panepophenanthrin tiene una arquitectura compleja con un esqueleto tetracíclico altamente sustituido, el cual contiene 11 estero-centros contiguos y pertenece a la familia de productos naturales epoxiquinoide (Mehta e Islam 2005). El efecto inhibitorio de este compuesto ha sido probado con ensayos de ubiquitinación *in vitro*. Sin embargo no hay ensayos concluyentes en células vivas que permitan demostrar su permeabilidad en células eucariotas (Lei et al, 2003; Matsuzawa et al, 2006).

- *Acido Himeico*: este compuesto fue aislado de un cultivo de hongos de origen marino, *Aspergillus* sp. El ácido himeico existe en tres formas A, B y C. La forma A inhibe en un 65% la formación de un intermediario ubiquitina-E1 en ensayos *in vitro*, en una concentración de 50 μ M; mientras que los componentes relacionados B y C han mostrado poca actividad inhibitoria hasta en concentraciones de 100 μ M (Tsukamoto et al, 2005).

- *PYR-41 (UBE1-41)*: 4[4-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-3,5-dioxo-pyrazolidin-1-yl]-benzoic acid ethyl ester (PYR-41), este es el primer inhibidor de E1 permeable en células eucariotas y se caracteriza por tener un efecto colateral, incrementando la sumoilación total en las células. Las bases moleculares de este efecto son aún desconocidas. Desde el punto de vista funcional, PYR-41 atenúa la activación mediada por citoquinas del Factor Nuclear κ B (NF- κ B) a través de la inhibición de la ubiquitinación no asociada a degradación por el proteosoma (Lys63) de TRAF6, la cual es esencial para la activación de la quinasa I κ B. Además, PYR-41 inhibe la degradación de p53 y mejora la actividad transcripcional de este supresor de tumores. De acuerdo con esto, este inhibidor afecta diferencialmente células transformadas que expresan p53. Estos hallazgos sugieren su posibilidad como herramienta en el tratamiento de cáncer. Sin embargo, los estudios de especificidad y las bases moleculares de su mecanismo de acción aún no están bien definidos. Su estructura, la aparente naturaleza irreversible de su efecto y la reducción en su actividad por un exceso de tioles libres, genera evidencia circunstancial de que PYR-41 funciona por bloqueo del sitio activo cisteína de E1 (Yang et al, 2007).

- *Otros inhibidores:* se han identificado otros inhibidores de la enzima E1, pertenecientes a una familia de derivados benzotiazoles y que actúan previniendo la transferencia de la ubiquitina activada a las enzimas conjugadoras E2 (UbcH10 y UbcH5c) y su actividad ha sido demostrada en ensayos fluorescentes *in vitro* (Guédat y Colland 2007). Esta clase de inhibidores, compiten por el ATP y han sido patentados por Rigel: WO2005037845 (2005). De otro lado, Millenium Pharmaceuticals, Inc.: WO2006084281 (2006) han identificado y patentado inhibidores de la enzima activadora de ubiquitina E1 de ratón (UBE1) por monitoreo de la formación del complejo ubiquitina-E2 (Ubc2) empleando ensayos de fluorescencia (HTRF®). Estos dos tipos de inhibidores requieren más investigación relacionada con especificidad y farmacología (Guedat y Colland 2007).

2.2.4. Enzimas Conjugadoras de Ubiquitina (E2)

Las enzimas conjugadoras de ubiquitina (UBCs), también llamadas proteínas portadoras de ubiquitina (E2) catalizan la unión covalente de ubiquitina a las proteínas sustrato o cuando actúan con una E3 con dominio HECT, E2s transfieren la ubiquitina activada a un intermediario de alta energía E3-ubiquitina. Estas enzimas tienen un sitio activo cisteína, el cual recibe la ubiquitina de E1 y se distinguen por la presencia de un dominio UBC (16 kDa) requerido para la unión de distintas E3s, el cual contiene una cisteína conservada. Algunas E2 tienen extensiones amino y carboxilo terminal e inserciones en el dominio UBC, las cuales pueden facilitar su interacción con E3s (Mathias et al, 1998). Las características estructurales de E2s son similares en todas las E2s analizadas, tienen una estructura central elongada de una hoja β y hélices en los flancos (Huang et al, 1999). En pocas ocasiones, las E2s pueden interactuar con el sustrato, pero el significado fisiológico de esta interacción no se conoce. En el genoma de levadura han sido identificadas once enzimas E2s (Ubc 1-8, 10, 11, 13). Dos enzimas adicionales, Ubc9 y Ubc12, son miembros de la familia UBC y conjugan proteínas similares a ubiquitina Smt3 y Rub1, respectivamente, pero no ubiquitina. El genoma de mamíferos incluye más de 30 dominios E2. Generalmente cada E2 interactúa con un número de ligasas, involucrándose así en el marcaje de numerosos sustratos. (Glickman y Ciechanover 2002).

Existen dos hipótesis que sustentan la existencia y necesidad de E2s. La primera dice que si una determinada E3 funciona con una E2 específica, entonces el paso de conjugación con E2 provee un punto adicional para la regulación del proceso, por ejemplo por cambio en la actividad o

concentración de E2s. La segunda propone la existencia de muchas E2s con lo cual se puede diversificar aún más la especificidad de la ubiquitinación. En esta última hipótesis la identidad de E2 puede modular la selección de la proteína sustrato o la estructura de la modificación por ubiquitina (Pickart y Eddins 2004).

2.2.5. Enzimas Ubiquitina Ligasas (E3s)

Las enzimas ligadoras o ligasas de ubiquitina (E3s), son las responsables del reconocimiento específico de una multitud de sustratos del sistema de ubiquitinación. Las E3s son proteínas o complejo de proteínas que se unen tanto a E2 como al sustrato, la interacción con el sustrato puede ser directa o a través de proteínas auxiliares (Glickman y Ciechanover 2002).

Las E3s son heterogéneas y pueden ser clasificadas dentro de tres grupos o familias: E3s con dominio HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*), las que poseen dominio RING *finger* (*Really Interesting New Gene*) y UFD2 homólogos de las proteínas U-box (Pickart 2004; revisado por Weissman 2001 y Fang y Weissman 2004):

2.2.5.1. E3 con dominio HECT: albergan una secuencia homóloga de ~350 residuos de aminoácidos en el dominio carboxilo terminal del miembro prototipo de la familia E6-AP (proteína asociada-E6). Este dominio contiene un residuo de cisteína conservado, ubicado aproximadamente 35 aminoácidos corriente arriba del carboxilo terminal y es el residuo al cual la ubiquitina activada es transferida desde E2. El dominio amino terminal, el cual varía entre las diferentes proteínas con dominio HECT, está probablemente involucrado en el reconocimiento específico del sustrato y en su localización subcelular (Weissman 2001). Estas E3s forman un enlace transitorio entre la cisteína de su sitio activo y la ubiquitina como consecuencia de un proceso de transesterificación de E2. Las E3 HECT entonces catalizan la transferencia de ubiquitina al sustrato o a una naciente cadena de poliubiquitina. Hay seis E3s HECT en *S. cerevisiae* y aproximadamente 27 codificadas en el genoma humano (Kostova et al, 2007).

2.2.5.2. E3s que contienen dominios RING- *finger*: por muchos años, se pensó que los dominios RING *finger* jugaban un papel en la dimerización de proteínas. Solo recientemente las proteínas que contienen dominio RING *finger* fueron identificadas como enzimas ligadoras de

ubiquitina, estas enzimas transfieren ubiquitina tanto a sustratos heterólogos, así como a las mismas proteínas RING. Los dominios RING están clasificados en RING-HC y RING-H2, dependiendo de si una cisteína o una histidina ocupa el quinto sitio de coordinación, respectivamente. Esta clase de E3s utilizan el dominio RING finger para unirse a su E2 correspondiente, sugiriendo que el dominio RING de E3 puede funcionar como una plataforma que posiciona al sustrato y a la E2 para la transferencia de ubiquitina (Glickman y Ciechanover 2002).

Estas E3s han sido divididas en dos subclases: E3s simples y E3s multisubunidad. Las E3s simples contienen el elemento de reconocimiento del sustrato y el RING finger sobre el mismo polipéptido. Dentro de esta subclase se destacan la oncoproteína Mdm2, la cual ubiquitina p53 (Fang et al, 2000), la protooncoproteína c-Cbl, la cual ubiquitina receptores del factor de crecimiento (Duan et al, 2004) y los inhibidores de apoptosis (IAPs) (Yang et al, 2000). Todas las E3s multisubunidad tienen una proteína pequeña RING finger, un miembro de la familia de proteínas CULLIN y algunas otras subunidades con funciones de adaptador y encargadas de reconocer los sustratos (Weissman 2001; Hotton y Callis 2008). Dentro de esta subclase se encuentran los complejos SCF y el APC (*Anaphase-Promoting Complex*) o ciclosoma, los cuales incluyen al menos 12 subunidades distintas (Weissman 2001).

2.2.5.3. Proteínas U-Box: un dominio de unión a E2 llamado U-box define una familia relativamente pequeña de E3s. Las proteínas U-box pueden adoptar una conformación parecida a la de dominio RING interactuando así con E2s y sometándose a autoubiquitinación. El miembro mejor estudiado de la familia U-box es CHIP (*Carboxyl-terminus of Hsc70 Interacting Protein*), muchos de los sustratos conocidos de CHIP son proteínas mal plegadas cuyo reconocimiento por parte de CHIP depende de su asociación con las chaperonas Hsp70 o Hsp90 (Pickart 2004).

2.2.6. Selección del sustrato por E3s

Diversos tipos de motivos de reconocimiento proteína-proteína son usados por E3s para seleccionar sus sustratos. Por ejemplo, la E3 con dominio HECT, Rsp5/Nedd4 une sustratos a través de su dominios WW del amino terminal (Kanelis et al, 2001). La E3 con dominio RING, Mdm2 une una hélice anfifílica de su sustrato p53 en una hendidura hidrofóbica profunda (Kussie

et al, 1996). La E3 c-Cbl, selecciona sus sustratos, los cuales incluyen receptores de superficie celular activados, por la unión de un residuo fosfotirosina a su dominio SH2 (Zheng et al, 2000). Dominios de unión al sustrato de varias proteínas F-box poseen el motivo LRR (*Leucine-Rich Repeat*) o motivos de interacción WD-40 y generalmente unen sustratos que han sido seleccionados para ubiquitinación por fosforilación sobre serina o treonina de cadenas laterales (revisado por VanDermark y Hill 2002).

Otra modificación post-transduccional que conduce a ubiquitinación es el reconocimiento de N-glicosilación de algunas proteínas que son retranslocadas del RE al citoplasma (Yoshida et al, 2002). Un ejemplo de reconocimiento molecular es la interacción entre la subunidad pVHL (von Hippel-Lindau protein) de la E3, VCB y su sustrato, el factor de transcripción HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1). Este último induce la expresión de genes en respuesta a bajas tensiones de oxígeno. Los niveles normales de oxígeno reprimen la respuesta a hipoxia por la inducción de ubiquitinación y posterior degradación de HIF-1 α a través de la hidroxilación de una prolina de HIF-1 α usando una prolil-hidroxilasa estimulada por oxígeno (Ivan et al, 2001). El residuo hidroxiprolina es reconocido en el contexto de un polipéptido extendido que posiciona la cadena lateral hidroxiprolina en un bolsillo del dominio pVHL β (Min et al, 2002).

2.2.7. Ubiquitinación sin E3

Hoeller y colaboradores (2007) propusieron un modelo de monoubiquitinación acoplada de las proteínas que contienen dominios de unión a ubiquitina (*Ubiquitin Binding Domains*-UBD), según el cual, este proceso no requiere una ligasa E3. Este estudio demostró que para la ubiquitinación de algunas proteínas que poseen varios UBDs solo es necesaria la presencia de ubiquitina, E1, E2 y ATP, en ensayos *in vitro*. Además, demostraron que proteínas quiméricas fusionadas a un polipéptido no relacionado como glutatión S-transferasa (GST) pueden ser monoubiquitinadas sin la presencia de E3, en reacciones llevadas a cabo *in vitro*. Estos datos indican una baja especificidad de la ubiquitinación independiente de E3. Sin embargo, se observó cierta selectividad asociada a la potencia de diferentes enzimas E2 para realizar la ubiquitinación. Según Sorkin (2007), las dos formas de ubiquitinación de un mismo sustrato, independiente de E3 y dependiente de E3, pueden coexistir. Así la ubiquitinación independiente de E3 puede primordialmente controlar el nivel constitutivo de monoubiquitinación de proteínas que poseen

UBDs, mientras la ubiquitinación dependiente de E3 puede ser responsable de la regulación de la monoubiquitinación por varios procesos de señalización.

2.2.8. Enzimas E4

La ubiquitinación generalmente involucra las enzimas E1, E2 y E3. Sin embargo, en algunos casos la poliubiquitinación requiere la actividad de una enzima adicional o factor de elongación de la cadena de ubiquitina, conocida como enzima E4 (Koepl et al, 1999). La primera familia identificada de enzimas E4 se caracteriza por tener un dominio homólogo a UFD2 o dominio U-box en su carboxilo terminal de ~70 aminoácidos, el cual está estructuralmente relacionado al motivo RING-finger encontrado en las E3 ligasas de la familia RING-finger (revisado por Hoppe 2005). El mecanismo molecular por el cual las enzimas E4 aseguran la elongación de algunas cadenas de ubiquitina no se ha esclarecido. Las E4s pueden ser necesarias para determinar los residuos de lisina usados para la formación del conjugado ubiquitina-ubiquitina durante el ensamblaje de la cadena de poliubiquitina (Hoppe 2005).

2.2.9. Enzimas Deubiquitinadoras (DUB)

Las enzimas deubiquitinadoras (DUBs) pueden hidrolizar enlaces peptídicos, amida, éster o tio-éster después del carboxilo terminal del último residuo de glicina de ubiquitina (G76). DUBs pueden clivar productos lineales de la traducción de genes ubiquitina (Baker et al, 1992); remanentes ubiquitinados resultado de la degradación mediada por el proteosoma (Pickart y Rose 1985); el enlace peptídico de las ramificaciones post-transduccionales en conjugados mono y multiubiquitina (Matsui et al, 1982) y otros enlaces amida o éster (Mayer y Wilkinson 1989).

Las enzimas DUBs tienen dos funciones principales: mantienen niveles estables de ubiquitina libre y afectan la estabilidad del conjugado ubiquitina-proteína. Estas funciones incluyen entonces: la generación de ubiquitina, reciclaje de ubiquitina, edición de las cadenas de poliubiquitina y contribución a la degradación dependiente del proteosoma (Ciechanover y Glickman, 2002). Además de las DUBs se han identificado un gran número de enzimas conocidas como proteasas específicas de proteínas similares a ubiquitina (*Ubl specific protease*-ULP) (Nijman et al, 2005a; Ha y Kim 2008).

2.2.9.1. Clasificación de las Enzimas DUBs: en mamíferos hay entre 80–90 DUBs, clasificadas con base en la similaridad de sus secuencias y en su mecanismo de acción, en cinco familias, las cuatro primeras son cisteína peptidasas, mientras que las proteínas JAMM son zinc metalopeptidasas (Singhal et al, 2008):

- *Ubiquitina C-terminal hidrolasas (ubiquitin carboxy-terminal hydrolases-UCHs):* son proteínas pequeñas (20-30 kDa) las cuales fueron identificadas por su habilidad para hidrolizar pequeñas amidas y ésteres en el extremo carboxilo de ubiquitina (Amerik y Hochstrasser 2004). Aunque estas fueron las primeras DUBs descritas, sus funciones específicas aún son pobremente comprendidas. Las UCHs participan en el reciclaje de la ubiquitina que es conjugada inadecuadamente a nucleófilos intracelulares como glutatión o poliaminas. Estas enzimas también están involucradas en el procesamiento de la ubiquitina sintetizada *de novo*, la cual es traducida como un precursor poliubiquitina o fusionada a proteínas ribosomales (Nijman et al, 2005a).
- *Peptidasas específicas de ubiquitina (ubiquitin-specific processing protease- USPs/UBPs):* es la familia más grande y diversa de enzimas DUBs. Estas cisteína proteasas poseen dos motivos cortos, bien conservados, conocidos como cajas Cys y His y que son los que contienen los residuos de la triada catalítica (Amerik y Hochstrasser 2004). Su tamaño varía de 300 a 800 aminoácidos con un dominio catalítico de aproximadamente 40 kDa. La función y la estructura de dominios de extensión en el amino y carboxilo terminal es aún desconocida, pero se cree que tienen un papel regulatorio (Ha y Kim 2008). Por otro lado se ha identificado un subgrupo de estas enzimas DUBs que carecen de algunos residuos catalíticos previamente considerados críticos para la actividad peptidasa, pero que conservan la actividad deubiquitinadora en sustratos modelo (Nijman et al, 2005a). Recientemente, Zhu y colaboradores (2007) reportaron la presencia muy frecuente de dominios similares a ubiquitina (*ubiquitin-like domains-ULBs*) en esta familia de enzimas, lo cual puede representar una característica importante dentro de la actividad y regulación de estas enzimas. Sin embargo, el papel funcional de estos dominios dentro de las enzimas DUB no es aún claro.
- *Proteasas relacionadas con tumor de ovario (ovarian tumor-related proteases-OTU):* estas proteínas son similares estructuralmente en un dominio central catalítico conservado que

contiene residuos Cys, His y Asp. Estos residuos parece que conforman la triada catalítica (Amerik y Hochstrasser 2004). Varias proteínas de esta familia han sido identificadas: otubain1 y 2, cezanne y A20 (Nanao et al, 2004; Ha y Kim 2008; Komander y Barford 2008).

- *Proteínas de la enfermedad Josephin (Machado-Joseph disease-MJD)*: se caracterizan por el dominio *Josephin*. Ataxin-3 es la única enzima descrita en esta familia y tiene propiedades típicas de una enzima DUB, se encarga del desensamble de conjugados ubiquitina-lisozima, escinde conjugados ubiquitina-AMC (ubiquitina-7-amido-4-methylcoumarin), y se une al inhibidor de DUBs ubiquitina aldehído (Burnett y Pittman 2003). El dominio *Josephin* se ha encontrado en más de 30 proteínas putativas de función desconocida y muestra segmentos con una baja similitud con las cajas His y Cys de las UBPs y las UCHs (Amerik y Hochstrasser 2004). Sin embargo al realizar estudios estructurales con Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se observó que el arreglo general de la triada catalítica es conservado (Mao et al, 2005; Nicastro et al, 2005).
- *Proteínas con dominio JAMM (domain-associated metalloisopeptidase Jab1/MPN)*: esta es la última familia descrita de enzimas DUBs, está representada por una subunidad del proteosoma, Rpn11/POH1, la cual tiene características de una metaloproteasa específica para ubiquitina unida a proteínas (Verma et al, 2002). De esta familia también se ha identificado la proteína con el motivo MPN+/JAMM, es la proteína AMSH (*associated molecule with the SH3 domain of STAM*) (McCullough et al, 2004). El motivo metaloproteasa incluye dos residuos conservados His y un residuo Asp que junto con un ion Zinc coordinado son esenciales para la actividad proteolítica (Amerik y Hochstrasser 2004).

2.2.9.2. Mecanismo de Acción de las Enzimas DUBs: la mayoría de las enzimas DUBs son cisteína proteasas. La actividad enzimática de estas enzimas depende del grupo tiol, de una cisteína en el sitio activo. Deprotonación de esta cisteína es asistida por una histidina contigua, la cual es polarizada por un residuo aspartato. Estos tres residuos constituyen la triada catalítica. Durante la catálisis, la cisteína realiza un ataque nucleofílico sobre el carboxilo de escisión del enlace peptídico, el cual en el caso de DUBs está entre el blanco y la ubiquitina. El intermediario,

el cual contiene un oxianión es estabilizado en el llamado “agujero oxianión”. Este agujero oxianión es generalmente proveído por un residuo glutamina, glutamato o asparagina y la cadena principal de la cisteína catalítica. El resultado de la reacción es la liberación de la proteína sustrato y la formación de un intermediario covalente con la ubiquitina. La reacción de este intermediario con una molécula de agua resulta en la liberación de la enzima libre y la ubiquitina (Nijman et al, 2005a).

Por su parte las metaloproteasas generalmente usan una molécula de agua polarizada unida a Zn^{2+} para generar un intermediario no covalente con el sustrato. El átomo metal es estabilizado por un residuo aspartato y dos residuos histidina (Ambroggio et al, 2004). El intermediario es roto por transferencia del protón de una molécula de agua causando la liberación de la enzima DUB.

2.2.9.3. Regulación de la Actividad de las Enzimas DUBs: generalmente las enzimas DUBs son producidas como enzimas activas. En el caso de las UCHs y USPs, análisis estructurales han señalado que la unión a ubiquitina es necesaria para su actividad proteasa, lo cual previene la actividad contra otros sustratos. Para el caso de las proteínas con dominio JAMM (POH1 y CSN5), parece que es necesaria la incorporación de estructuras proteicas altamente organizadas como el proteosoma 19S y el signalosoma COP9, respectivamente, para su actividad peptidasa (Cope et al, 2002; Verma et al., 2002). Las enzimas DUBs son frecuentemente degradadas por el proteosoma, lo que indica que su abundancia es un mecanismo regulatorio importante. Además, varias DUBs son reguladas transcripcionalmente, algunas veces esta regulación está asociada a la regulación del ciclo celular (USP1) o como parte de una retroalimentación negativa (CYLD) (Jono et al, 2004; Nijman et al, 2005b). Finalmente, hay evidencia de que modificaciones como la fosforilación puede regular directamente la actividad de algunas DUBs por un mecanismo aún no esclarecido (Reiley et al, 2005).

2.2.10. Cadenas de Poliubiquitina

El mecanismo de ensamblaje de las cadenas de poliubiquitina incluye cuatro pasos: 1) activación de ubiquitina por la enzima E1, 2) transferencia de la ubiquitina activada de E1 a la cisteína del sitio activo de la enzima E2, 3) monoubiquitinación del sustrato, mediado o no por las enzimas E3 y 4) extensión de la cadena sobre el sustrato con la participación de las enzimas E1 y/o E4 (Koegl et al, 1999; Hoppe 2005; Huzil et al, 2007). El papel de la enzima E1 como factor importante en la elongación de algunas cadenas de poliubiquitina (K48) fue descubierto recientemente por Huzil y

colaboradores (2007) e indica la posibilidad de mecanismos regulatorios adicionales a los conocidos hasta hoy. Los siete residuos de lisina de la ubiquitina pueden participar en la formación de uniones ubiquitina-ubiquitina, con un orden en abundancia relativa de: Lys 48 > Lys 11 y Lys 63 > Lys 6, Lys 27, Lys 29 y Lys 33 (Peng et al, 2003). Además, el carboxilo terminal de ubiquitina puede ser conjugado al grupo amino terminal de otra molécula de ubiquitina para formar una cadena de ubiquitina lineal (Kirisako et al, 2006). Aunque la relevancia fisiológica de la diversidad de cadenas de ubiquitina no ha sido demostrada completamente, la modificación de sustratos con diferentes clases de cadenas de ubiquitina puede expandir significativamente el repertorio funcional de las señales de poliubiquitinación (Li y Ye 2008).

2.2.10.1. Cadenas de poliubiquitina Lys48: la función clásica de la poliubiquitinación en Lys48 es el reconocimiento y degradación por el proteosoma. Sin embargo, actualmente se conocen ejemplos de funciones no proteolíticas para este tipo de cadenas de poliubiquitina. Un ejemplo de estas funciones no clásicas es la actividad del factor de transcripción Met4 en *S. cerevisiae*. Met4 activa la expresión de genes de la biosíntesis de metionina. La actividad de Met4 es regulada por el nivel de metionina. De esta manera, cuando las células son expuestas a medio repleto de metionina, Met4 es rápidamente poliubiquitinado y pierde sus actividades transcripcionales (Kaiser et al, 2000). Sin embargo este Met4 poliubiquitinado con cadenas de tipo Lys48 tiene una vida larga y no es degradado por el proteosoma debido a que tiene un dominio de unión a ubiquitina que interactúa con su propia cadena de poliubiquitina, evitando que la cadena alcance la longitud requerida para ser reconocida por el proteosoma (Flick et al, 2006). Aún no es claro como la poliubiquitinación reduce la actividad transcripcional de Met4, pero es un ejemplo de poliubiquitinación en Lys48 sin reclutamiento para degradación por el proteosoma.

2.2.10.2. Cadenas atípicas de ubiquitina: recientemente se ha revelado la importancia de las cadenas conjugadas a las otras seis lisinas (diferentes de Lys48) presentes en ubiquitina y conocidas como cadenas atípicas de ubiquitina. Estas cadenas atípicas pueden ser clasificadas en: 1) Homotípicas: las que secuencialmente usan el mismo residuo de lisina en la conjugación de la ubiquitina. 2) Con unión mixta: las cuales utilizan varias lisinas para conectar consecutivas moléculas de ubiquitina; estas cadenas mixtas forman bifurcaciones, así se encuentran cadenas que contienen dos tipos diferentes de unión: Lys 6/11, Lys 27/29, Lys 29/48 o Lys 29/33. 3) Heterólogas: las cuales conectan ubiquitina con otros ULM, como SUMO o NEDD8 y 4) Muchas monoubiquitinas pueden conjugarse a un sustrato y cuando las monoubiquitinas están muy

próximas, pueden ser consideradas señales atípicas de ubiquitinación (Kim et al, 2007; Ikeda y Dikic 2008).

2.2.10.3. Papel fisiológico de cadenas atípicas de ubiquitina:

- *Cadenas de poliubiquitina del tipo Lys63:* Las cadenas formadas a partir de Lys63, se sabe que desempeñan un papel muy importante en diversos procesos: transducción de señales por la vía de NF- κ B, en endocitosis de receptores y reparación de ADN (Hayden y Gosh 2008; Bennett y Harper, 2008), así mismo están involucradas en función ribosomal (Spence et al, 2000), respuesta a estrés, y recientemente se conoció su participación en el proceso de autofagia (Li y Ye 2008). En este último proceso, existe evidencia experimental que sugiere que las cadenas de poliubiquitina del tipo Lys63 son competentes en el reclutamiento de proteínas sustrato para degradación a través de un mecanismo independiente del proteosoma y llamado autofagia. La autofagia es un mecanismo celular por el cual orgánulas o partes del citosol dañado son incorporadas a vesículas de doble membrana, formando el autofagosoma, el cual posteriormente se fusiona con los lisosomas para degradar su contenido y realizar el reciclaje de componentes bioenergéticos (Kundu y Thompson 2008). Es bien conocido que la formación de los autofagosomas requiere de dos ULMs (Atg8 y Atg12) y reportes recientes sugieren que una proteína llamada p62 (sequestrosoma 1), la cual pertenece a la familia de proteínas Ubl/UBA pues tiene un plegamiento similar a ubiquitina (*ubiquitin-like fold* -Ubl) y un dominio de unión a ubiquitina (*ubiquitin-binding domain*-UBD) UBA. p62 pueden dirigir sustratos ubiquitinados al proteosoma para degradación vía su dominio Ubl (Pankiv et al, 2007). El dominio UBA de p62 en células reconoce cadenas de poliubiquitina Lys48 y Lys 63, con preferencia por las cadenas Lys63 (Seibenhener et al, 2004). Estos sustratos poliubiquitinados y unidos a p62 son dirigidos principalmente hacia una estructura inducida similar al agresoma (*aggresome-like induced structure*–ALIS), la cual es degradada por la vía de autofagia (Lelouard et al, 2004).
- *Otros tipos de cadena poliubiquitina:* aunque todos los residuos de ubiquitina han mostrado que participan en la formación de cadenas *in vivo*, bajo diferentes condiciones, hay muy pocos estudios que explican su significado biológico en células. Las cadenas de tipo Lys6 o Lys11 pueden unirse a la subunidad Rpn10/S5a del proteosoma (Baboshina y Haas

1996). Cadenas del tipo Lys29 han sido involucradas en el marcaje de proteínas para degradación lisosomal (Chastagner et al, 2006). Cadenas mixtas Lys 29/Lys 33 han sido implicadas en la regulación de las quinasas asociadas a la proteína quinasa activada por AMP cíclico (*AMP-activated protein kinase-AMPK*) (Al-Hakim et al, 2008). La formación de cadenas de ubiquitina mixtas participa en la activación de la proteína Polycomb Complejo ubiquitina ligasa Ring1B (Ben-Saadon et al, 2006). Cadenas heterólogas entre ubiquitina y ULMs al parecer desempeñan papeles fisiológicos importantes. Un estudio reciente mostró que la proteína RING finger 4 (RNF4), una ubiquitina ligasa E3 que tiene varios motivos de interacción con SUMO, puede reclutar la proteína Promielocítica de Leucemia (PML) sumoilada para su ubiquitinación, generando así cadenas heterólogas SUMO-Ubiquitina (Tatham et al, 2008). Este procesamiento conduce al reconocimiento y posterior degradación de la proteína PLM sumoilada por el proteosoma (Lallemand-Breitenbach et al, 2008; Tatham et al, 2008).

2.2.10.4. Monoubiquitinación: o la conjugación covalente de una sola molécula de ubiquitina, es una señal suficiente para la internalización de receptores, la señalización a través de la vía de endocitosis y activación transcripcional (Hicke 2001). Específicamente, la monoubiquitinación es utilizada en la regulación de la función de las histonas y en vías de reparación del ADN y es considerada central en el transporte intracelular de proteínas de membrana (Mosesson y Yarden 2006). La función más notable de la monoubiquitinación dentro de la célula eucariota se relaciona con su papel en el tráfico de proteínas de membrana a través de varios compartimentos celulares. Diferentes clases de proteínas de membrana (receptores principalmente) son monoubiquitinados y esta modificación regula tanto su endocitosis en la membrana plasmática, como su transporte en los endosomas para su posterior liberación a los lisosomas o vacuolas. El mecanismo de reconocimiento de la señal de monoubiquitinación está asociado con la presencia de UBDs en una variedad de proteínas dentro de la maquinaria de endocitosis (Haglund et al, 2003; Mosesson y Yarden 2006). Por otro lado, Hoeller y colaboradores (2006) encontraron que la monoubiquitinación de proteínas que poseen UBDs ejerce una función de regulación, mediante la inhibición de su capacidad de unión a sus contrapartes ubiquitinados, de esta manera la ubiquitinación tiene dos papeles importantes en la vía de endocitosis: actúa como una señal importante sobre el cargo durante el tráfico y es además una señal regulatoria sobre las proteínas que poseen UBDs.

2.2.10.5. Regulación de la Formación de Cadenas de Poliubiquitina: en el proceso de ubiquitinación y formación de cadenas de poliubiquitina las enzimas E3 o ubiquitina ligasas son determinantes esenciales de la selección del sustrato y por tanto son consideradas elementos de control y regulación de la formación de las cadenas de ubiquitina (Kee et al, 2005; Wang et al, 2006; Huang et al, 2006). Además de las enzimas ligasas E3, Las enzimas conjugadoras E2, en casos específicos, pueden estar estructuradas para controlar la especificidad de selección de la lisina durante el ensamblaje de las cadenas de ubiquitina (Brzovic et al, 2006). Asimismo la combinación de enzimas E2 con enzimas E3 puede direccionar la síntesis de diferentes cadenas atípicas de ubiquitina (Kim et al, 2007). Además, el mecanismo aceptado hasta ahora, según el cual las cadenas de ubiquitina son ensambladas por la adición secuencial de monómeros de ubiquitina a un residuo de lisina en la proteína blanco ha sido reevaluado luego de comprobarse que es posible la formación de polímeros de ubiquitina sobre las enzimas E2/E3 antes de su conjugación al sustrato (Wu-Baer et al, 2003; Ben-Saadon et al, 2006; Li et al, 2007). El tipo de conjugación de ubiquitina puede también ser determinado por proteínas de unión a ubiquitina. Di Fiore y colaboradores (2003), propusieron que UBDs, tales como los motivos de interacción a ubiquitina (UIMs) o el dominio homólogo a Cue-1 (CUE) están relacionados con una frecuente monoubiquitinación de las proteínas que los contienen. Finalmente, la ubiquitinación es un proceso dinámico y reversible, la rápida deconjugación de la ubiquitina es mediada por la actividad de las enzimas DUBs. Así es muy probable que exista un balance entre la actividad y la localización de las enzimas DUBs y las enzimas ubiquitina ligasas que contribuya a determinar si una proteína específica es mono o poliubiquitinada (Haglund et al, 2003).

2.2.10.6. Reconocimiento de Cadenas de Poliubiquitina: la conformación estructural dependiente del tipo de conjugación de una cadena de poliubiquitina determina su funcionalidad o por la presentación de un patrón de sitios hidrofóbicos específico de la conjugación o por la habilidad de la cadena para restringir la adopción de ciertas conformaciones. El enlace isopeptídico ubiquitina-ubiquitina puede también contribuir, extendiendo la superficie hidrofóbica o proporcionando un elemento de reconocimiento adicional. Entonces, la especificidad de la interacción de un ligando dado estará determinada por su habilidad para seleccionar una conformación de cadena sobre otra o por discriminar entre diferentes conformaciones (Pickart y Fushman, 2004).

Por otro lado, la afinidad de unión *in vitro* entre un UBD y ubiquitina está alrededor de $K_d = 10\text{--}500\ \mu\text{M}$, este rango es relativamente bajo para una interacción fisiológica. Por el contrario, el nivel de ubiquitina libre en células es bastante alto, $2\ \mu\text{M}$ en tejido muscular y $10\text{--}20\ \mu\text{M}$ en diferentes cultivos celulares (Haas y Bright 1985). Estas cifras indican que las interacciones fisiológicas ubiquitina-UBDs son reguladas por la avidez de unión, la cual puede ser mediada a través de interacciones multivalentes entre sustratos ubiquitinados y proteínas de unión a ubiquitina. Estas interacciones permiten una unión selectiva del UBD a un conjugado ubiquitina-proteína y no a la ubiquitina libre. Este nivel regulatorio puede lograrse de varias maneras: por multiplicación de UBDs en proteínas adaptadoras, oligomerización de proteínas de unión a ubiquitina o por acumulación de las proteínas de interacción en compartimentos celulares definidos (Ikeda y Dikic 2008).

2.2.11. Proteínas Similares a Ubiquitina (*Ubiquitin-like proteins-Ubls*)

Las proteínas similares a ubiquitina pueden ser divididas en dos grupos:

1. Modificadores similares a ubiquitina, (*ubiquitin-like modifiers-ULMs*, generalmente se conocen como Ubls): los cuales forman enlaces isopeptídicos con proteínas blanco, a través de una cascada similar a la empleada por la ubiquitina para conjugarse a las proteínas sustrato. Cada Ubl contiene un dominio plegado de manera muy similar a la ubiquitina y en este dominio, estas proteínas tienen uno o dos residuos glicina en su carboxilo terminal, el cual es usado para formar el enlace isopeptídico con las proteínas blanco. La mayoría (excepto FAT10, Atg12 y Urm1) son sintetizados como precursores cuya conjugación requiere el clivaje de esta glicina a través de proteasas específicas. (Groettrup et al, 2008).
2. Proteínas con dominios ubiquitina: las cuales contienen dominios similares a ubiquitina (*ubiquitin-like proteins*) como dominios de interacción proteína-proteína, pero que no llegan a ser conjugadas a proteínas blanco.

2.2.11.1. Modificadores Similares a Ubiquitina, Ubls o ULMs: la conjugación covalente de ubiquitina y Ubls es considerada como un mecanismo de regulación celular muy importante en

control de: división celular, transducción de señales, desarrollo embrionario, tráfico endocítico y respuesta inmune. Los Ubls trabajan para la remodelación de la superficie de sus proteínas blanco, cambiando así: la vida media de sus sustratos, la actividad enzimática, las interacciones proteína-proteína, la localización celular y otras propiedades (Huang et al, 2004; Hochstrasser 2009). Existen al menos 13 Ubls en mamíferos (Ubiquitina, ISG15, Atg7, Atg12, NEDD8, SUMO-1, -2, & -3, HUB1, FAT10, Urm1, Ufm1, MNSF, y Ufm1) y su conjugación a sus proteínas sustrato conlleva diferentes consecuencias biológicas. Todos ellos comparten la estructura comprimida β o plegamiento similar a ubiquitina y pueden ser conjugados a proteínas o lípidos a través de su carboxilo terminal (Jentsch y Pyrowolakis 2000; Rosas-Acosta et al, 2005; Keischer et al, 2006; Kirkin y Dikic 2007).

2.2.11.2. Activación y Conjugación de Ubls: todos los Ubls se conjugan a sus sustratos mediante vías enzimáticas relacionadas, muy similares a la cascada de conjugación de la ubiquitina. La mayoría de los Ubls son sintetizados como precursores inactivos que requieren del procesamiento de su carboxilo terminal para exponer la glicina del extremo carboxilo, que es el sitio de conjugación al sustrato. Las proteasas específicas de Ubls (ULPs) son responsables de este procesamiento. Brevemente, la conjugación de Ubls requiere la activación a través de una enzima activadora similar a E1 (*E1 like enzyme*) (Haas et al, 1982). Se forma entonces un enlace tio-éster entre E1 y el Ubl. Posteriormente el modificador Ubl es transferido al sitio activo cisteína de una enzima similar a E2 (*E2-like enzyme*) o enzima conjugadora de Ubl. Finalmente y sólo en algunos casos el modificador es conjugado a su sustrato con la ayuda de enzimas similares a E3 ligasas, resultando en la conjugación covalente del Ubl a un grupo ϵ -amino de un residuo interno de lisina del sustrato mediante un enlace isopeptídico. El papel de las E3 en estas reacciones es menos claro. En la mayoría de los casos no se han identificado E3 para los Ubls y las E2s son capaces de interactuar directamente con el sustrato (Welchman et al, 2005). Aunque las lisinas son los residuos sustrato más frecuentes para la conjugación de Ubls, existen ejemplos de conjugación en otros residuos (Kerscher et al, 2006). El único Ubl que se sabe forma cadenas luego de su conjugación al sustrato es SUMO. Las cadenas de SUMO han sido detectadas *in vitro* e *in vivo* tanto en células mamíferas como en levaduras, pero su función no ha sido completamente elucidada (Bylebyl et al, 2003; Vertegaal 2007).

2.2.12. Ubiquitina y Ubls en Parásitos Protozoarios

A pesar de que las vías de conjugación de ubiquitina y Ubls han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas en células de mamíferos y de levaduras, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo estos sistemas son usados por parásitos protozoarios. Ponder y Bogyo (2007) empleando herramientas bioinformáticas identificaron homólogos para seis de las 13 familias de Ubls, incluyendo: ubiquitina, Nedd8, SUMO, Hub1, Urm1 y Atg8. Estos datos son corroborados por el estudio de Ponts y colaboradores (2008) en el genoma de parásitos Apicomplexa. No se han identificado homólogos de ISG15, FAT10 o Atg12 en protozoarios.

Las modificaciones asociadas a la conjugación de ubiquitina y Ubls han sido más ampliamente estudiadas en *Trypanosoma spp.* Genes que codifican ubiquitina fueron primero identificados en *Trypanosoma cruzi* (Kirkchhoff et al, 1988). A diferencia de humanos, en donde se ha descrito la presencia de dos genes para poliubiquitina y dos para proteínas de fusión con ubiquitina, *Trypanosoma cruzi* tiene al menos cinco genes que codifican proteínas de fusión a ubiquitina y cinco genes que codifican poliubiquitina (Kirkchhoff et al, 1988). Otros estudios del sistema ubiquitina proteosoma (SUP) en *Trypanosoma cruzi* demostraron la degradación dependiente de ubiquitina de proteínas del citoesqueleto, las cuales son importantes durante la transformación de tripomastigote a amastigote (de Diego et al, 2001). Los genes de poliubiquitina de *Plasmodium falciparum* son regulados de una manera dependiente del ciclo de vida del parásito (Horrocks y Newbold 2000) y recientemente Lacount y colaboradores (2005) asociaron proteínas relacionadas con ubiquitina con la estabilidad del mRNA y regulación transcripcional. En parásitos Apicomplexa la ubiquitina es codificada por uno de tres tipos de precursores: poliubiquitina y ubiquitina fusionada a dos tipos de proteínas ribosomales, S27a y S52 (Ponts et al, 2008).

Los Ubls varían mucho en su grado de conservación entre especies. El Ubl más estrechamente relacionado con ubiquitina es Nedd8, el cual tiene una identidad del 49% con la ubiquitina de mamíferos (Larsen y Wang 2002). Un homólogo para Nedd8 fue identificado en *Plasmodium spp* y aún no se han realizado estudios de funcionalidad en este parásito. Por su parte Ponts y colaboradores (2008) identificaron genes simples que codifican para Nedd8 en parásitos de los géneros *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*. Probablemente Nedd8 no ha sido identificado en otros protozoarios debido a la alta homología en secuencia con ubiquitina dentro

de una misma especie, lo cual sugiere que los homólogos de Nedd8 en parásitos pueden estar siendo identificados como copias de ubiquitina (Ponder y Bogyo 2007).

SUMO está involucrado en la regulación transcripcional y regulación de la interacción y localización de sus proteínas blanco (Johnson 2004). Homólogos de SUMO han sido identificados en varios parásitos protozoarios excepto en *Giardia spp.* A diferencia de humanos donde se han identificado cuatro formas de SUMO, en todos los protozoarios analizados hasta ahora hay un solo homólogo de SUMO, similar a lo que ocurre en levaduras (Ponder y Bogyo, 2007; Ponts et al, 2008). En *Plasmodium falciparum* un ensayo de dos híbridos en levadura evidenció la interacción de SUMO y el antígeno repetido serina 4, una proteasa esencial ubicada en la vacuola parasitófora (LaCount et al, 2005).

Homólogos de Atg8 en parásitos protozoarios mostraron 30-50% de conservación comparados con los de levadura. Los homólogos en quinetoplastidos, la familia que incluye a *Trypanosoma* y *Leishmania spp.*, tienen uno o más residuos diglicina después del carboxilo terminal, lo cual indica que deben ser procesados antes de su conjugación. Sin embargo, en Apicomplexa, la familia que incluye a *Plasmodium* y *Toxoplasma spp.*, no existen estos residuos adicionales (Ponder y Bogyo 2007).

La ausencia en parásitos protozoarios de Ubls como FAT10 y ISG15, podría explicarse ya que estos modificadores están involucrados en procesos especializados propios de eucariotas superiores como son la respuesta inmune y las vías de señalización del cáncer (Poder y Bogyo 2007).

2.2.13. Enzimas de la Vía de Ubiquitinación en Parásitos Protozoarios

El estudio *in silico* de Ponts y colaboradores (2008) identificó más de 114 proteínas que se predice están involucradas en el sistema ubiquitina proteosoma de *Plasmodium falciparum* y otros parásitos Apicomplexa. Según este trabajo todos los apicomplexa poseen la maquinaria completa que es requerida para la ubiquitinación de proteínas (ubiquitina, Ubls, enzimas E1, E2, E3 y DUBs).

2.2.13.1. E1: datos de perfiles proteómicos del transcriptoma para *P. falciparum* tienen amplia evidencia de la expresión de E1 a lo largo del ciclo de vida de este parásito y se sugiere un patrón

de acumulación transcripcional en el estado de trofozoíto temprano (Bozdech et al, 2003; Le Roch et al, 2003). Datos muy similares para *T. gondii* sugieren una expresión constitutiva de E1 en el ciclo de vida de los parásitos Apicomplexa (Ponts et al, 2008).

2.2.13.2. E2: el estudio de Ponts y colaboradores (2008) reveló la presencia de 8 a 14 proteínas E2 en el genoma de varios Apicomplexa, esta cifra es similar a la reportada para otros eucariotas (*S. cerevisiae*). El número de isoformas de E2s tiende a incrementarse a medida que se incrementa la complejidad del genoma del parásito estudiado. Datos de expresión génica para 9 de las 14 E2s identificadas en *P. falciparum* sugieren un patrón de acumulación estable de mRNA en diferentes estados de desarrollo intraeritrocítico. Lo cual sugiere que diferentes isoformas de E2s son expresadas durante el ciclo de vida de este parásito.

2.2.13.3. E3: el 48% de los componentes que se predice participan en el SUP corresponden a proteínas de la familia ubiquitina ligasa E3 (Ponts et al, 2008). Este alto porcentaje de E3s refleja la especificidad que se requiere en el reconocimiento del sustrato. Ponts y colaboradores identificaron cuatro proteínas que contienen dominio HECT en *P. falciparum* y otros Apicomplexa; dos proteínas con dominio U-box, presentes en todos los Apicomplexa del estudio: el homólogo de UFD2 de *S. cerevisiae*, UFD2 (PF08_0020 en *P. falciparum*, y 72.m00386 en *T. gondii*) y el homólogo de PRP19 (PFC0365w en *P. falciparum*, y 641.m01564 en *T. gondii*). UFD2 es una ubiquitina ligasa. Una tercera ubiquitina ligasa que no se encuentra en levadura fue identificada en especies de *Plasmodium* (PF07_0026 en *P. falciparum*) y tiene homología con la proteína CHIP humana. En *P. falciparum*, el homólogo de CHIP, PF07_0026 se expresa principalmente en el estado de esporozoíto. También se identificaron homólogos de CHIP en *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vivax* y *P. yoelii* y no se identificaron homólogos para esta proteína en levadura, *Cryptosporidium spp.* y *T. gondii*. Finalmente en este mismo trabajo se encontró un homólogo de CDC53 en *P. falciparum*, y *T. gondii*. CDC53 (Cullin1) que es estabilizado por Nedd8, junto con las subunidades RING E3 RBX1, la proteína adaptadora Skp1 y la proteína Fbox para el reconocimiento del sustrato conforman el regulador del ciclo celular SCF. Este estudio confirmó la presencia de proteínas homólogas de F-box, Nedd8, Skp1 y RBX1 en el genoma de Apicomplexa. En conclusión los componentes mínimos para la conformación SCF están presentes en los genomas de parásitos Apicomplexa. Además, también reportan la presencia de varias proteínas con dominio RING en los genomas de Apicomplexa y las cuales no tienen homólogos en otros organismos. En *P. falciparum*, PF14_0054 y PF13_0188 son dos ejemplos, PF14_0054 se