

Programa de Doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Bienni 2001-2003

L'ENZIM DEUBIQUÏTINANT USP25: CERCA DE SUBSTRATS I RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ

Memòria presentada per
Anna Bosch Comas

Per optar al títol de
Doctora

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Gemma Marfany Nadal i la Dra. Roser Gonzàlez Duarte al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Les directores,

L'autora,

Dra. G. Marfany
Nadal

Dra. R. Gonzàlez
Duarte

Anna Bosch
Comas

Barcelona, Gener de 2007

A LA MEVA FAMÍLIA

AGRAÏMENTS

El primer agraïment d'aquesta tesi és per la **Roser**. Sense cap mena de dubte, ella és la responsable de que jo hagi començat i acabat aquesta experiència, el doctorat. Ja des de l'inici, les seves classes explicant els transposons i la recombinació em van embadalir, i després, durant tots aquests anys, ha estat capaç de transmetre en tot moment una passió vers el desconegut, necessària en qualsevol persona que es dediqui a la ciència.

I la **Gemma**... són tantes coses les que li he d'agraïr, que em costa sintetitzar-ho en unes quantes ratlles. Primer de tot li he d'agraïr que acceptés ser la meva codirectora de tesi, tenint en compte que no em coneixia de res. A partir d'aquell moment, va començar una relació que ha anat més enllà de la feina. En tancar els ulls em venen a la memòria imatges dels sopars (amb curry de pollastre inclòs), els cines i les rebaixes... però també de les discussions sobre les cèl·lules, l'efecte del *knockdown* o la Tm, els positius dels llevats i les fotos del confo... Moltes gràcies Gemma, crec que hem fet un bon equip.

Vull agrair a la **Rebe** que em deixés en herència aquest fantàstic tema que és la USP25. Mai vaig imaginar que m'arribaria a agradar tant!! Tot i que a l'inici no acabavem de congeniar (de debò que jo no recordo haver marxat de classe!), et vas convertir en la meva "germana gran" del laboratori. Llàstima que vam coincidir molt poquet temps... juntes haguéssim aconseguit el famós NatCellSci!! T'he trobat molt a faltar!!

Tots els membres del Departament de Genètica han contribuït amb el seu granet de sorra a que aquests cinc anys siguin inoblidables. Començant pels Epis, especialment la **Mette**, la **Loli**, la **Senda**, el **Salvatore**, el **Champi** i tots els mosques. Moltes gràcies per acollir-me a les calçotades, als sopars i a les festes!! Gràcies també pels anticossos, els plàsmids, els enzims i els antibiòtics que ens deixeu sempre de bon grat!! I l'**Iñaki** (tot i que no sé si és Epi o no...) quina pena que tu tornis quan jo me'n vaig!!! Ens ho havíem passat tan bé... balls, tennis, autobus... tot el depar t'ha trobat a faltar!!! ... i no em puc descuidar el **Jordi Solana**... són ja tants anys!!!! Aviat en farà 10 (quina por!!). Muchas gracias por aguantarme en todo momento, independientemente de mi estado de ánimo (pero tengo que decir que yo también te he escuchado siempre tus preocupaciones, eh?)... Se me va a hacer extraño trabajar lejos de ti! Espero que continuemos haciendo cafés (interminables) de vez en cuando.

A tota la gent de Mol, moltes gràcies. Particularment, gràcies al **Jon**, sempre disposat a ajudar, fins i tot quan li demanes un favor a les 10 de la nit! També vull agrair a la **Laura G** i el **Jordi D**, per amenitzar el lab en l'època del duo

pimpinela, a la **Mariona**, per tenir sempre un moment i per la seva predisposició a ajudar, i a l'**Anna Di**, la **Noe** i el **Raül** el seu bon sentit de l'humor i la capacitat que tenen de convertir en còmica la situació més desesperant. Gràcies al **Marc** pels esmorzars i al **Ricard** pels berenars (al seu despatx...).

Mari, gracias por los centenares de litros de PBS que me has preparado... incluso cuando los necesitaba urgentemente, y tú estabas liada haciendo otras cosas!! y **Ana**, gracias por las gradillas de tubos vacíos y las excursiones al nitrógeno!

A la gent del Lab 4 (o Lab G...): **Esther** (àlies xispes o P.A.), quants moments hem compartit!! espero que de tant en tant continuem fent escapades a esquiar!! **Olga** (l'altre xispes), la super-artista!! no he conegut ningú amb tantes respostes i solucions als problemes del lab!! molta sort amb el patchwork!! Un agraïment especial a l'**Alex**, l'**Amanda** i el **Victor** per aguantar els meus estressos durant aquests últims temps.

Un record pels que han marxat lluny. Gràcies a na **Marta** per les seves bronques que em feien baixar dels núvols de cop... al **Miquel** per tants moments compartits, des de les primeres sortides com a companys de feina, fins als últims viatges com amics... prepara't que un dia d'aquests vinc a veure't!!... i a l'**Eva**, moltes gràcies per tants moments de riures i de mofes, de conferències telefòniques i de converses surrealistes... a tots tres, us trobo moltíssim a faltar.

A tota la gent que han enriqueit d'alguna manera la meva formació. A la **Dori** i al **Xavi** del CSIC, per la paciència necessària dels inicis. To **Maria Masucci**, for giving me the great opportunity of working in her lab. To **Nico**, for the nice discussions and journal clubs. To my dearest friends **Kristina**, **Lisette**, **Ulrika**, **Elio**, **Anna C**, **Andre** and **Victoria**. I will never, never forget you. You all were my sunshine in the darkness of Stockholm. Un agradecimiento especial para **Manuel Rodríguez** y **Fernando Lopitz**, del CICBioGUNE, por toda vuestra ayuda prestada y vuestra cálida acogida en Bilbo. A la **Pura Muñoz** i a tot el seu grup, particularment la **Mercè**, l'**Antonio** i el **Bernat**, per iniciar-me en el complicat món de l'*in vivo*. Gracias también a **Josefin** "chica bonita", por los cafés suecoñoles delante de la playa.

A les companyes de Biologia. Juntes vam començar aquesta aventura, i juntes, més o menys, l'anem acabant. Gràcies a la **Gemma** per fer-nos de guia a les excursions. Gràcies a l'**Olga** per la seva vessant organitzadora, i al **Jose** per ser l'alegria de la huerta. A la **Neus** i n'**Antònia**, us he d'agraïr tantes coses... se'm enterboleixen els ulls només de pensar-hi... el nostre projecte paral·lel a la tesi també ha passat per dificultats, però crec que ens n'hem sortit prou bé. Una abraçada per al **Pedri**!! tu també formes part de Bordeus 33!! I un beso muy fuerte

para **Laurita**, la última incorporación del equipo... gracias por ser la alegría de la huerta!!

Moltíssimes gràcies a la meva família, en especial a les meves avies, al **Jordi** i la **Fanny** (i a Standby Studio... per ajudar-me en el disseny de la portada!!), per escoltar amb paciència les meves històries sobre les proteïnes, tot i no entendre gran cosa, i per animar-me sempre en els moments difícils. Gràcies a la **M^aAntonia** per la seva ingenuïtat i per proposar de fer la *lletra proteïna*. Gràcies a l'**Oriol** pel seu "sí" incondicional en temes informàtics. Sense tu, *xispes* no existiria!!

Gràcies, mil gràcies al **Roger**. Amb tu vaig iniciar-me en el laboratori ja fa mil anys. Em vas ensenyar a utilitzar les pipetes i a fer un gel d'agarosa... i junts hem recorregut aquest últim tram de la tesi. Han estat uns mesos inoblidables, i sóc molt feliç d'haver-te retrobat.

Finalment, un agraïment especial i molt sentit als meus pares, **Albert** i **Cristina**, pels vostres consells (que no sempre he seguit) i suport. Gràcies per l'educació que m'heu donat (i pels viatges!!). Sou uns pares fantàstics!

Moltíssimes gràcies a tots
Gener 2007

ÍNDIX	3
ABREVIATURES	7
PRÒLEG	11
INTRODUCCIÓ	15
1. LA UBIQUITINA	17
2. LES PROTEÏNES <i>UBIQUITIN-LIKE</i>	18
2.1. SUMO: L'Ubl més ben caracteritzada	19
3. LA PROTEÒLISI PER MITJÀ DE LA UBIQUITINA I EL PROTEASOMA	20
3.1. La història	20
3.2. Els senyals de degradació	21
3.3. Els motius d'estabilització	22
3.4. El proteasoma 26S	22
4. UNA MODIFICACIÓ, MOLTES SENYALITZACIONS	24
4.1. Efecte en la localització subcel·lular	24
4.2. Modificació de l'activitat	24
4.3. Modulació de les interaccions proteïna-proteïna	24
5. ELS DIFERENTS TIPUS D'ENLLAÇ: MONOUBIQUITINACIÓ VS POLIUBIQUITINACIÓ	25
6. LA MAQUINÀRIA DE CONJUGACIÓ: UNA ESTRUCTURA JERÀRQUICA	27
6.1. Lligases E3 d'ubiquitina: les responsables de l'especificitat	28
6.2. L'especificitat de substrat	29
7. ELS ENZIMS DEUBIQUITINANTS	31
7.1. Les activitats bioquímiques dels enzims deubiquitinants	31
7.1.1. Processament dels precursors d'ubiquitina	32
7.1.2. Edició i rescat de substrats ubiquitinats	32
7.1.3. Acoblament de la deubiquitinació i de la degradació mitjançant el proteasoma	32
7.1.4. Hidròlisi dels oligòmers d'ubiquitina	33
7.2. Classificació: la gran diversitat de la família dels enzims deubiquitinants	34
7.2.1. Proteases específiques d'ubiquitina	36
7.2.2. Hidrolases a C-terminal d'ubiquitina	37

7.2.3. Proteases amb dominis OTU	37
7.2.4. Proteases amb dominis <i>Machado-Joseph Disease</i>	38
7.2.5. Proteases amb dominis JAMM	38
7.3. L'estructura	39
7.4. L'especificitat de substrat	40
7.4.1. Regulació de l'activitat del proteasoma	42
7.4.2. Creixement cel·lular i diferenciació	42
7.4.3. Desenvolupament	43
7.4.4. Regulació de l'estructura de la cromatina i de l'activitat transcripcional	44
7.4.5. Endocitosi	44
7.4.6. Oncogènesi	45
7.4.7. Malalties neuronals	46
7.4.8. Altres funcions dels enzims deubiquitinants	47
7.5. USP25: un enzim deubiquitinant humà	48
8. ELS DOMINIS D'INTERACCIÓ AMB UBIQUÏTINA	49
8.1. UBA: <i>Ubiquitin associated domain</i>	50
8.2. UIM: <i>Ubiquitin interacting motif</i>	52
9. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC I LA VIA UPS	54
9.1. L'estructura del múscul esquelètic	54
9.2. El múscul i la cèl·lula muscular com a models d'estudi pel sistema de les ubiquïtines	55
OBJECTIUS	57
RESULTATS	61
CAPÍTOL 1	63
Publicació: <i>The ubiquitin-specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins</i>	65
Material i mètodes suplementaris	81
Resultats suplementaris	91
CAPÍTOL 2	103
Publicació en preparació: <i>Domain dissection and post-translational modifications of USP25</i>	105
Resultats suplementaris	121

RESUM GLOBAL	127
<hr/>	
1. <i>USP25</i> , UN GEN LOCALITZAT AL CROMOSOMA 21 QUE CODIFICA PER UNA PROTEASA ESPECÍFICA D'UBIQUÏTINES	129
2. UN GEN, DIVERSOS TRANSCRITS, DIVERSES PROTEÏNES, DIVERSOS PATRONS D'EXPRESSION	131
3. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'USP25m: CERCA DE SUBSTRATS	135
3.1. Cerca de substrats d'USP25m mitjançant el mètode del doble híbrid	136
3.2. Especificitat tissular de les interaccions	138
3.3. Rellevància funcional de les interaccions	139
3.4. Altres interaccions proteiques amb USP25m	140
4. CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL D'USP25 I USP25m	141
5. MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS D'USP25	142
6. ELS DOMINIS D'UNIÓ A UBIQUÏTINA	145
7. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'USP25 AL LLARG DEL DESENVOLUPAMENT	149
7.1. Expressió d'USP25 durant els primers dies de diferenciació	149
7.2. USP25m; una proteïna de localització nuclear?	150
7.3. Patró reticular d'USP25 en miotubs diferenciats	151
8. USP25 I CICLE CEL·LULAR	152
9. EPÍLEG: SÓN NECESSARIS MÉS D'UN CENTENAR D'ENZIMS DEUBIQUÏTINANTS?	155
CONCLUSIONS	157
<hr/>	
1. CATALÀ	159
2. ANGLÈS	161
REFERÈNCIES	163
<hr/>	
ANNEX	185
<hr/>	

ABREVIATURES

- ACTA1:** actina α -1
- Ala:** alanina
- APC:** complex promotor de l'anafase (*anaphase promoting factor*)
- Asn:** asparagina
- Asp:** àcid aspàrtic
- BAP1:** proteïna associada a BRCA1-1 (*BRCA1-associated protein1*)
- CDK:** quinasa dependent de ciclina (*cyclin dependent kinase*)
- C-ter:** carboxiterminal
- CKI:** inhibidor de CDK (*cyclin dependent kinase inhibitor*)
- Cys:** cisteïna
- DUB:** enzim deubiquitinant (*deubiquitinating enzyme*)
- E1:** enzim activador E1
- E2:** enzim conjugador E2
- E3:** lligasa E3 d'ubiquitines
- E4:** factor d'elongació de la cadena de poliubiquitina
- EBNA-1:** antígen nuclear1 del virus de l'Epstein-Barr (*Epstein-Barr nuclear antigen1*)
- EGF:** factor de creixement epidermic (*epidermic growth factor*)
- EGFR:** receptor de l'EGF (*epidermic growth factor receptor*)
- Faf:** *fat facets*
- FAS:** sintasa d'àcids grassos (*fatty acid synthase*)
- FLNC:** filamina C
- GFP:** proteïna verda fluorescent (*green fluorescent protein*)
- Gln:** glutamina
- Glu:** àcid glutàmic
- Gly:** glicina
- HECT:** homòleg al fragment C-ter d'E6-AP (*homologues to E6-AP C-terminus*)
- His:** histidina
- IR:** radiació ionitzant
- JAMM:** domini Jab1/MPN d'una metal·lo-proteasa (*Jab1/MPN domain metalloenzyme*)

Lqf: *liquid facets*

Lys: lisina

MATH: domini d'homologia a meprina i TRAF (*meprin and TRAF homology*)

MDa: mega Dalton

MJD: malaltia de Machado-Joseph (*Machado-Joseph Disease*)

MyBPC-1: proteïna d'unió a la miosina C-1 (*Myosin binding protein C-1*)

NMR: ressonància magnètica nuclear (*nuclear magnetic resonance*)

N-ter: aminoterminal

OTU: *ovarian tumor*

RING: *really interesting new gene*

RNAi: interferència d'RNA

RTK: receptors tirosina quinasa

SCF: *Skp/Cullin/E-box*

SD: *síndrome de Down*

SUMO: *small ubiquitin related modifier*

TNF: factor de necrosi tumoral (*tumor necrosis factor*)

Trp: triptòfan

Ub: ubiquitina

UBA: domini associat a Ub (*ubiquitin associated domain*)

UBD: domini d'unió a Ub (*ubiquitin binding domain*)

UbL: proteïna similar a Ub (*ubiquitin-like protein*)

UBP: proteasa específica d'Ub (*ubiquitin specific protease*)

UCH: hidrolases a C-terminal d'Ub (*ubiquitin carboxi-terminal hydrolases*)

UIM: motiu d'interacció amb Ub (*ubiquitin interacting motif*)

UPS: sistema de la ubiquitina i el proteasoma (*ubiquitin proteasome system*)

USP: proteasa específica d'ubiquitines (*ubiquitin specific protease*)

Y2H: doble híbrid (*yeast 2 hybrid*)

YFP: proteïna groga fluorescent (*yellow fluorescent protein*)

PRÒLEG

LA UBIQÜITINACIÓ

La ubiqüitinació és una modificació posttraduccional mitjançant la qual una o varies molècules d'ubiqüitina (Ub) s'enllacen covalentment a un substrat. Generalment, l'aminoàcid acceptor de la modificació és una lisina (Lys) interna de la proteïna diana.

Actualment, resulta difícil aprofundir en qualsevol procés fisiològic sense trobar-hi implicat algun tipus de senyalització mitjançant Ub ja que, entre d'altres, la ubiqüitinació ha mostrat tenir importància cabdal en la progressió del cicle cel·lular, la diferenciació, el control de qualitat al reticle endoplasmàtic, el transport de proteïnes, el processament d'antigen, la reparació del DNA i la resposta a l'estrès. Tanmateix, la degradació de proteïnes ubiqüitinades mitjançant el proteasoma és el procés més ben caracteritzat, ja que va ser el primer que es va descriure.

Sovint s'ha comparat la ubiqüitinació amb la fosforilació, atès que ambdues es troben presents en infinitat de mecanismes i, a més, aquestes dues modificacions posttraduccionalment estan íntimament interconnectades, ja que la fosforilació pot facilitar o inhibir la ubiqüitinació, bé modificant el substrat que ha de ser ubiqüitinat, o bé els enzims que catalitzen l'addició de monòmers d'Ub.

Es podria dir que la ubiqüitinació es troba present en tots els processos cel·lulars eucariotes, i una regulació defectiva d'aquests fenòmens es manifesta en patologies que van des d'anormalitats en el desenvolupament fins a autoimmunitat, malalties neurodegeneratives o càncer.

§§

INTRODUCCIÓ

*One could write a history of science in reverse
by assembling the solemn pronouncements
of highest authority
about what could not be done
and could never happen.*

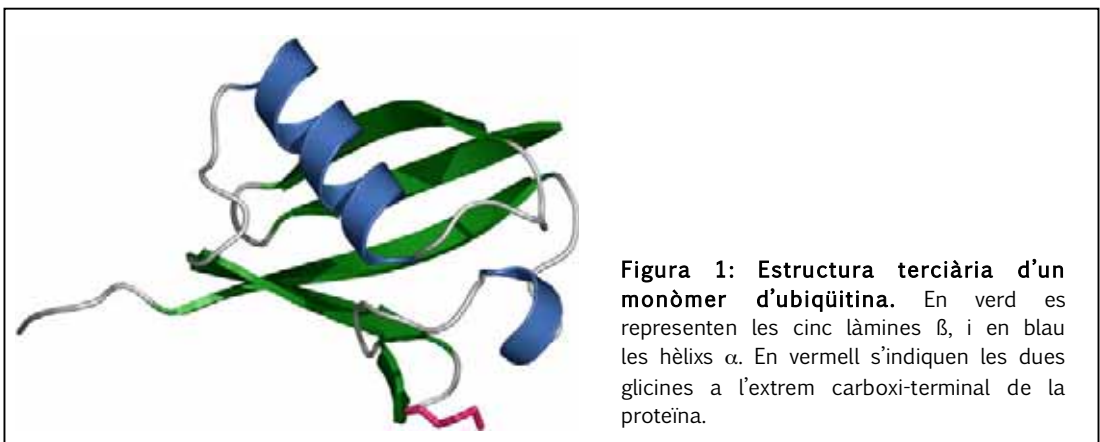
Robert Heinlein

1. LA UBIQUÏTINA

A mitjans dels anys setanta, Goldstein i col·laboradors van descobrir la molècula d'Ub mentre estudiaven la bioquímica de la *myastenia gravis*. A partir de timòcits de vedell van aïllar una nova proteïna i van creure que es tractava d'una hormona no descrita. Posteriorment, es va veure que aquesta proteïna es trobava en nombrosos tipus cel·lulars i es va anomenar “ubiquitous immunopoietic polypeptide”, UBIP. Aquest nom ràpidament es va escurçar i en va resultar el nom d'“ubiquitina” (Ub) (Schlesinger i col., 1975).

La Ub és una proteïna globular de tan sols 76 aminoàcids que es troba altament conservada al llarg de l'escala evolutiva eucariota, amb només tres canvis aminoacídics entre llevats i humans (Glickman i Ciechanover, 2002). Està codificada per una família multigènica i s'expressa com a precursor, ja sigui en forma d'un multímer de repeticions en tàndem o fusionada a proteïnes ribosomals (Jentsch i col., 1991). Aquestes proteïnes precursors són processades posttraduccionament mitjançant el tall de les proteases anomenades “hidrolases a C-terminal d'ubiquitina” (UCHs), que generen els monòmers d'Ub (Baek, 2003).

El fet de trobar diversos gens que codifiquen per la Ub, bé de còpia única o de còpia múltiple, conjuntament amb el reciclatge dels monòmers d'Ub alliberats d'un substrat, asseguren que en tot moment hi hagi una elevada disponibilitat d'Ub a la cèl·lula. Sorprenentment, la majoria d'Ub no està en forma lliure sinó conjugada a substrats, tot i que es troba en un equilibri dinàmic que és modulats en funció d'estímuls ambientals (Dantuma i col., 2006).



La Ub presenta un plegament característic, anomenat “*Ub-fold*”, que consta de cinc làmines beta que flanquegen un nucli central d’hèlix alfa (**Figura 1**). Posteriorment s’ha vist que aquest tipus de plegament és relativament abundant en el proteoma, i que sovint es troba inclòs en estructures més complexes.

La Ub és una proteïna extremadament estable, i es caracteritza per tenir una elevada resistència a valors extrems de pH i de temperatura. Aquesta estabilitat és deguda principalment a la presència de nombrosos ponts d’hidrogen i a l’absència de ponts disulfur, ions metàl·lics coordinats o cofactors.

§§

2. LES PROTEÏNES *UBIQUITIN-LIKE*

Existeixen altres sistemes similars de marcatge proteic que han evolucionat al llarg del procés de l’evolució i que fan servir modificadors relacionats amb la Ub (*Ubiquitin Like proteins*, UbLs) i components similars de les vies de conjugació i deconjugació (**Figura 2**).

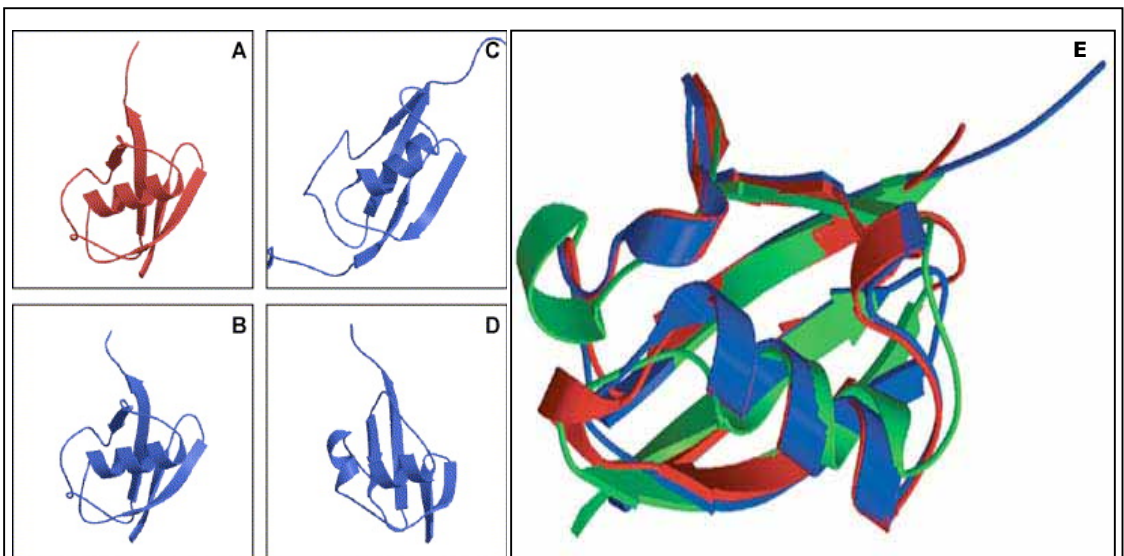


Figura 2: Membres de la família de la ubiquitina. (A) Ubiquitina, (B) Nedd8, (C) SUMO-1, (D) ThiS. Tots ells presenten el plegament característic de l’*Ub-fold*. Extret de (Pickart and Eddins, 2004). (E) Superposició de la ubiquitina (en blau), SUMO-1 (en verd) i Nedd8 (en vermell). Extret de (Welchman i col., 2005).

Algun d’aquests sistemes de marcatge, com per exemple Smt3/Sumo, es va descobrir abans de la era de la bioinformàtica (Matunis i col., 1996), però els

cribratges a escala genòmica han posat de manifest l'existència de fins a nou sistemes de modificació relacionats d'alguna manera amb la Ub (**Taula 1**).

Taula1: Modificadors proteics relacionats estructuralment amb la Ub

MODIFICADOR	SUBSTRAT	PROCÉS
Ubiquitina	Molts i diversos	Degradació, regulació
Nedd8 (Rub1)	Cul·lines	Regulació del complex SCF
SUMO (Smt3)	Molts i diversos	Transport nuclear, localització, regulació
ISG15 (UCRP)	Stat1, altres	Resposta immune (Interferó)
Hub1	Hbt1, Sbh1	Morfogènesi polaritzada
Fat10	Desconeguts	Apoptosi, resposta a interferó
MNSF (FUBI, FAU)	Bcl-G, altres?	Activació cèl·lules T
Urm1	Ahp1	Estrés, creixement invasiu (en llevats)
Apg8 (Atg8, Aut7)	Fosfatidiletanolamina	Autofàgia
Apg12 (Atg12)	Apg5	Autofàgia

Alguns membres d'aquesta família, com Nedd8 o SUMO, es troben presents en tots els organismes eucariotes. Altres, com per exemple Fat10, ISG15 o Ufm1, van aparèixer més recentment i es troben només en mamífers (Pickart, 2000; Komatsu i col., 2004; Ritchie i Zhang, 2004). Tots ells es troben relacionats amb la Ub, però per alguns la homologia és molt subtil, i per obtenir alineaments productius es requereixen, bé comparacions estructurals, o bé mètodes bioinformàtics basats en sofisticades anàlisis de perfils aminoacídics.

Un dels trets comuns entre tots els membres de la família és l'*Ub-fold*. L'altre aspecte que comparteixen és el mecanisme bioquímic: en tots els casos es forma un enllaç isopeptídic entre la glicina (Gly) terminal del modificador i un grup amino de la proteïna diana. Fins a l'actualitat, la Ub és l'únic modificador del qual es coneix la formació de cadenes (tot i que existeix certa controvèrsia al voltant de la possible formació de cadenes de SUMO (Tatham i col., 2001)), però existeixen determinades peculiaritats entre certs membres de la família com, per exemple, ISG15. Aquest pèptid modificador conté dos dominis d'homologia a Ub. Les proteïnes "ISGilades", per tant, són modificades amb l'equivalent de dos monòmers d'Ub units per un enllaç peptídic convencional (Kim i Zhang, 2003).

Encara no es coneixen els efectes funcionals de la majoria de modificacions per UbLs, i la seva maquinària de conjugació resta encara per caracteritzar.

2.1. SUMO: l'UbL més ben caracteritzada

L'*Small ubiquitin-like modifier*, SUMO, és una proteïna de 97 aminoàcids estructuralment similar a la Ub (**Figura 2**), tot i que la homologia de seqüència entre ambdues és tan sols del 20% (Seeler i Dejean, 2001). Paral·lelament al que succeeix amb la Ub, SUMO s'enllaça covalentment a certs residus Lys d'un substrat

específic (Melchior i col., 2003), però contràriament a la ubiquitinació, la sumoïlació no promou degradació de proteïnes, sinó que altera diversos paràmetres funcionals de les proteïnes, com ara la localització subcel·lular, les interaccions proteïna-proteïna, la unió al DNA o la transactivació dels factors de transcripció (Schwartz i Hochstrasser, 2003; Johnson, 2004).

En mamífers, existeixen tres isoformes codificades per diferents gens: SUMO-1, SUMO-2 i SUMO-3, i la modificació per SUMO es dona gairebé sempre en els llocs consens Ψ KXE (on Ψ representa un aminoàcid hidrofòbic gran, i X representa qualsevol aminoàcid) (Schwartz i Hochstrasser, 2003; Johnson, 2004). Tal i com hem esmentat anteriorment, és probable que SUMO formi cadenes similars a les de poliubiquitina, ja que SUMO-2 i SUMO-3 contenen llocs interns de sumoïlació (Tatham i col., 2001), però no està clar que aquest fenomen es pugui produir realment *in vivo*.

§§

3. LA PROTEÒLISI PER MITJÀ DE LA UBIQUÏTINA I EL PROTEASOMA

La proteòlisi intracel·lular, a diferència de l'extracel·lular -ja sigui extracorpòrea, com al tracte intestinal, o intracorpòrea, com per exemple al sistema de coagulació de la sang-, és un procés termodinàmicament desfavorable, és a dir, requereix energia. Aquest fet és degut a que en la proteòlisi intracel·lular s'ha d'assolir un control acurat i un elevat grau d'especificitat per evitar que es degradin erròniament determinades proteïnes.

Les dues funcions principals de la proteòlisi intracel·lular són el control de qualitat de proteïnes mal plegades o aberrants, i el control d'esdeveniments mitjançant la inhibició d'un procés, accelerant la destrucció de determinades proteïnes activadores, o activant-lo mitjançant la hidròlisi d'una proteïna inhibidora.

3.1. La història

L'any 1955 Christian de Duve va descobrir el lisosoma, i el va definir com un orgànul envoltat de membrana que contenia diverses activitats proteàsiques. Aleshores es va generalitzar la idea que el lisosoma era el lloc de proteòlisi intracel·lular, tant de proteïnes extracel·lulars, que eren conduïdes al lisosoma mitjançant endocitosi, com de proteïnes intracel·lulars, que, mitjançant autofàgia, també acabaven al lumen lisosomal.

A l'inici dels anys 70 es va començar a qüestionar que el lisosoma fos l'únic orgànul on s'hidrolitzaven les proteïnes intracel·lulars, en observar que existien proteïnes relativament estables i amb diferències de vida mitjana, que podia variar en ordres de magnitud. Fins i tot, es va veure que l'estabilitat d'una determinada proteïna podia oscil·lar àmpliament en condicions patofisiològiques. Aquests fets eren inexplicables si només es tenia en compte el mecanisme d'acció dels lisosomes, ja que l'autofàgia opera sobre una representació equitativa de totes les proteïnes cel·lulars.

Mitjançant experiments de marcatge diferencial de les proteïnes extracel·lulars i intracel·lulars, Brian Poole va determinar l'any 1978 que les proteïnes exògenes eren hidrolitzades al lisosoma, mentre que les proteïnes intracel·lulars ho feien en un altre lloc, i que aquest procés requeria energia. Pocs mesos després, Avram Herskko i Aaron Ciechanover, cercant un sistema de proteòlisi intracel·lular dependent d'ATP que no fos lisosomal, van recórrer a una estratègia de fraccionaments cel·lulars a partir d'eritròcits, cèl·lules proteolíticament actives, però mancades de lisosomes. D'aquesta manera van descriure un sistema de proteòlisi on, a més d'una proteasa i un substrat, eren necessaris altres components prèviament no descrits. Un d'aquests components va ser anomenat "*ATP-dependent proteolysis factor 1 of rabbit reticulocytes*, APF-1" que, posteriorment, es va identificar com a la molècula d'Ub.

Una gran part de la proteòlisi intracel·lular citosòlica té lloc mitjançant el sistema de les ubiquïtines i el proteasoma (*ubiquitin-proteasome system*, UPS). Segons aquest, les proteïnes cel·lulars que han de ser degradades incorporen quatre o més monòmers d'Ub, i són dirigides cap al 26S proteasoma, un complex multimèric d'elevat pes molecular que funciona com a proteasa citosòlica.

Actualment es coneix que el nombre de components del sistema de les ubiquïtines és de més d'un miler i que, aproximadament, un 3-5% del genoma codifica per proteïnes relacionades amb aquest procés.

3.2. Els senyals de degradació

Quins són els esdeveniments inicials que especifiquen que una determinada proteïna sigui degradada mitjançant el proteasoma? Sembla que hi juguen molts factors, que determinen la unió Ub-substrat. S'han descrit seqüències específiques (com les seqüències PEST o les "*destruction box*" de les ciclins) que són senyals de degradació proteica. També s'ha proposat que les proteïnes, a mesura que "envelleixen", es tornarien més hidrofòbiques degut a la seva progressiva desnaturalització i, per tant, més susceptibles d'ésser degradades en el proteasoma.

Un altre element que en certs casos és considerat important en la determinació de la ubiquitinació d'una proteïna és la naturalesa del seu aminoàcid aminoterminal (N-ter), ja que proteïnes amb un aminoàcid bàsic a N-ter són menys estables que aquelles que hi contenen aminoàcids petits. En les primeres, la Ub s'enllaça directament a l'aminoàcid terminal, i el procés es coneix amb el nom d'"N-end rule". Tot i que fins ara només s'han trobat com a màxim una desena de substrats que seguirien aquest camí, alguns autors no descarten que sigui un mecanisme relativament freqüent, malgrat que d'altres fins i tot qüestionen la seva existència *in vivo* (Ciechanover i Ben-Saadon, 2004).

A més, s'ha de tenir en compte que els requeriments proteics poden variar al llarg de la vida d'una cèl·lula, depenent del seu estat fisiològic. No és estrany, doncs, que modificacions posttraduccionals –com ara la fosforilació, oxidació, acetilació...- o productes de resposta envers una varietat d'estímuls, afavoreixin també la unió d'una o varies molècules d'Ub a un substrat (Varshavsky, 2005).

3.3. Els motius d'estabilització

Certs motius contraresten l'efecte dels senyals de degradació, ja que diverses proteïnes són resistents al proteasoma, fins i tot en presència d'elements desestabilitzadors.

S'han caracteritzat alguns d'aquests motius d'estabilització com, per exemple, les repeticions glicina-alanina (Gly-Ala) presents a l'antigen nuclear 1 del virus de l'Epstein-Barr (EBNA1), que el protegeix de la seva degradació (Levitskaya i col., 1995).

Recentment, s'ha demostrat que un dels dominis UBA (*Ubiquitin associated domain*) de Rad23, proteïna que interacciona de manera transitòria amb una de les subunitats del proteasoma, evita que aquesta sigui degradada (Heessen i col., 2005), i actua, per tant, com a motiu d'estabilització.

S'han postulat dues funcions per als motius d'estabilització: en primer lloc, permetrien que una proteïna dugués a terme la seva funció, fins i tot estant ubiquitinada o interaccionant amb el proteasoma. En segon lloc, podrien constituir un mecanisme general de regulació de l'estabilitat proteica, generant un factor de regulació addicional.

3.4. El proteasoma 26S

El proteasoma és una gran proteasa multicatalítica (aproximadament 2 MDa) dependent d'ATP, que degrada proteïnes poliubiquitinades en petits pèptids. Està format per dos subcomplexos; el 20S, que conté el nucli catalític, on hi resideixen

tres activitats proteolítiques diferents; i el 19S, que és el subcomplex regulador que està implicat en la unió, el desplegament i la translocació d'un determinat substrat fins a la cavitat del 20S (Glickman i Ciechanover, 2002). Els proteasomes funcionals 26S consten d'un 20S unit a dos 19S, un a cada extrem (Figura 3).

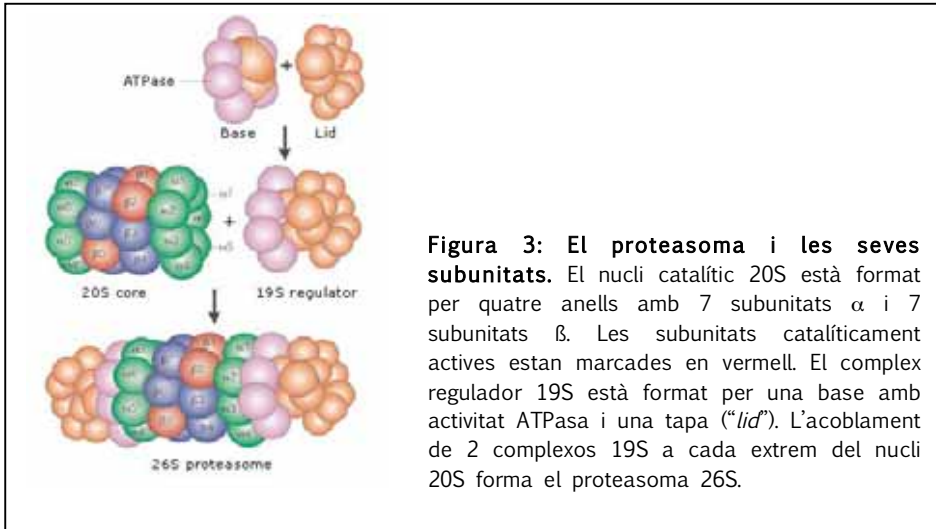


Figura 3: El proteasoma i les seves subunitats. El nucli catalític 20S està format per quatre anells amb 7 subunitats α i 7 subunitats β . Les subunitats catalíticament actives estan marcades en vermell. El complex regulador 19S està format per una base amb activitat ATPasa i una tapa ("lid"). L'acoblament de 2 complexos 19S a cada extrem del nucli 20S forma el proteasoma 26S.

El proteasoma 26S és responsable de la degradació de proteïnes aberrants o malplegades, del manteniment d'un *pool* d'aminoàcids lliures, de la generació de pèptids que tenen una funció hormonal o antigènica, i de la degradació de proteïnes els nivells de les quals han d'estar finament regulats.

§§

4. UNA MODIFICACIÓ, MOLTES SENYALITZACIONS

El marcatge de proteïnes que han de ser degradades mitjançant el proteasoma és indubtablement una de les principals tasques de la Ub, però moltes altres funcions cel·lulars estan també controlades per aquest petit, i aparentment simple, polipèptid.

4.1. Efecte en la localització subcel·lular

Una de les funcions més estudiades de la ubiquitinació és la regulació del tràfic de proteïnes localitzades a la membrana plasmàtica. De fet, tant en llevat com en cèl·lules de mamífer, la ubiquitinació és un senyal necessari i suficient per a la internalització de molts receptors de membrana cap a la via endocítica. De la mateixa manera, la ubiquitinació és també un senyal pel reciclatge d'aquests receptors, determinant la seva relocalització a la membrana i evitant que siguin degradats al lisosoma (revisat a Hicke i Dunn, 2003).

4.2. Modificació de l'activitat

La ubiquitinació modifica l'activitat de moltes proteïnes, com s'ha observat en les proteïnes transreguladores de la via endocítica. En aquests casos, la ubiquitinació del substrat pot conduir a la via degradativa mitjançant el proteasoma o el lisosoma, depenent del tipus de cadena d'Ub. En d'altres, però, la ubiquitinació de les mateixes proteïnes no genera degradació, sinó que, per mecanismes encara no gaire coneguts, és un senyal de redireccionament de les vesícules d'endocitosi (revisat a Schnell i Hicke, 2003).

També s'ha demostrat que l'enllaç d'un monòmer d'Ub a certs factors de transcripció és necessari per a l'activitat transactivadora. En canvi, el mateix factor de transcripció es pot inactivar ràpidament quan s'afegeixen molècules addicionals d'Ub al monòmer inicial (revisat a Muratani i Tansey, 2003).

4.3. Modulació de les interaccions proteïna-proteïna

La ubiquitinació modifica l'arquitectura molecular del substrat ja que, alhora que crea canvis conformacionals, genera nous dominis d'interacció. Aquest mecanisme és clau per entendre com la Ub pot regular diversos processos cel·lulars, influenciant l'habilitat d'una proteïna per interaccionar amb altres proteïnes

Fins ara s'han descrit setze dominis d'unió a Ub (que comentem més endavant). Les interaccions dinàmiques entre substrats ubiquitinats i proteïnes amb

dominis d'unió a Ub formen, enriqueixen i regulen les xarxes proteiques cel·lulars (revisat a Haglund i Dikic, 2005).

§§

5. ELS DIFERENTS TIPUS D'ENLLAÇ: MONOUBIQÜITINACIÓ VS POLIUBIQÜITINACIÓ

Inicialment, el descobriment de que els monòmers d'Ub s'enllaçaven entre ells per generar cadenes de poliubiquitina ancorades en un substrat va comportar un avenç molt important en el camp de la ubiquitinació (Chau i col., 1989).

Una qüestió important que restava encara per desxifrar tan sols fa deu anys era com la Ub senyalitzava cap a degradació mitjançant el proteasoma, mentre que en d'altres situacions podia conduir a efectes tan diferents com eren l'activació de la traducció o el canvi de localització subcel·lular.

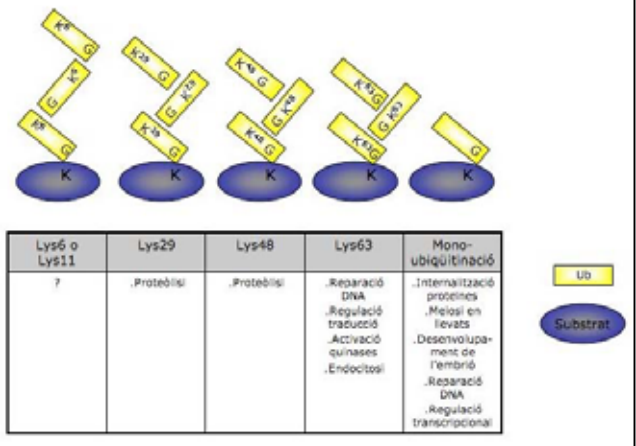
Al llarg dels darrers anys s'ha demostrat que l'especificitat del sistema és deguda en part als enzims que reconeixen els diversos substrats ubiquitinats, i que el destí de les proteïnes ubiquitinades ve determinat pel nombre de monòmers d'Ub i el tipus d'enllaç mitjançant el qual s'uneix al substrat.

Els monòmers d'Ub formen enllaços amida (o isopeptídics) entre el grup ϵ -amino d'una Lys de la Ub amb el grup carboxílic del següent aminoàcid carboxiterminal (C-ter) de l'altre molècula d'Ub. Com que la molècula d'Ub conté set lisines (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 i Lys63), tots aquests residus poden servir potencialment com a lloc d'ancoratge per a la síntesi de poliubiquitina. De fet, *in vitro* s'han pogut sintetitzar tots els possibles tipus de cadena.

Generalment, les cadenes de poliubiquitina s'enllacen per la Lys48, i constitueixen el senyal canònic per a la proteòlisi per mitjà del proteasoma (**Figura 4**). Les cadenes formades mitjançant la Lys29, tot i que són menys freqüents, també s'han trobat *in vivo* com a senyalitzadores de degradació en determinats substrats (Johnson i col., 1995; Lindsten i col., 2002).

Un altre tipus de cadenes de poliubiquitines que han estat vastament estudiades són aquelles formades mitjançant enllaços a la Lys63. Aquestes cadenes s'han trobat en nombrosos processos fisiològics com ara l'endocitosi (Galan i Haguenaer-Tsapis, 1997), la reparació del DNA (Hofmann i Pickart, 1999) o la regulació de la traducció (Spence i col., 2000), però en cap cas s'han relacionat amb la proteòlisi (**Figura 4**).

Figura 4: Funcions de les cadenes de poliubiquitina. La Ub conté 7 lisines. Potencialment totes elles poden formar cadenes. Cadenes per la Lys29 i la Lys48 marquen els substrats per a ser degradats pel proteasoma. La senyalització per cadenes de Lys63 o la mono-ubiquitinació no tenen efectes proteolítics, sinó que estan contribueixen a d'altres processos cel·lulars. Fins ara no s'han descrit funcions de les cadenes mitjançant Lys6 o Lys11 (K: Lys, G: Gly).



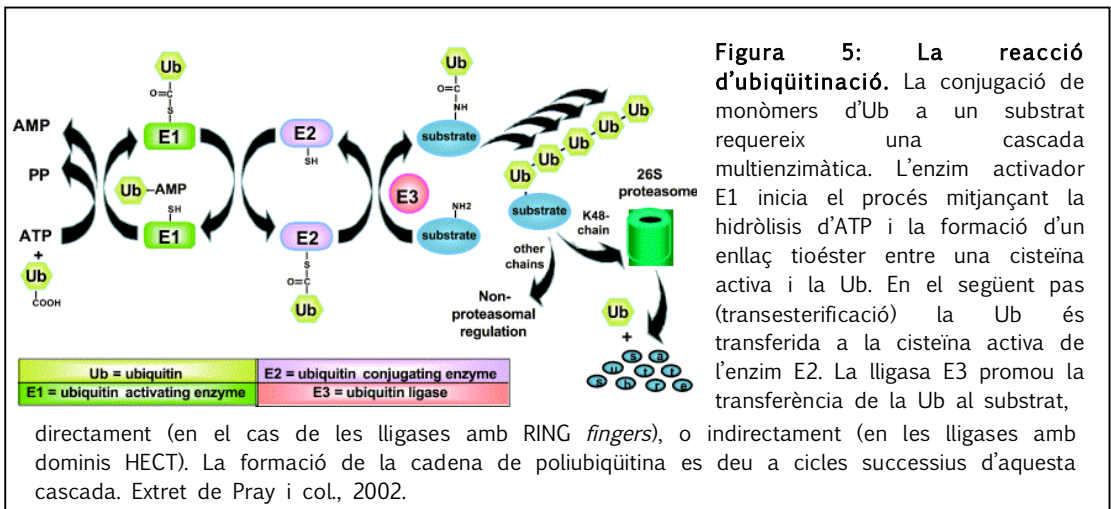
L'enllaç d'un monòmer d'Ub a una Lys interna d'un determinat substrat es coneix com monoubiquitinació (**Figura 4**). Els complexos Ub-substrat regulen una gran diversitat de processos com ara l'endocitosi, la reparació del DNA, la meiosi del llevat, i el desenvolupament embrionari, entre d'altres. A més, la monoubiquitinació dels receptors de membrana plasmàtica contribueix a la seva internalització i posterior degradació en el lisosoma. Per tant, com ja s'ha comentat en l'apartat 4.2, la senyalització mitjançant Ub pot conduir no només a degradació proteasomal, sinó també lisosomal (Hicke, 2001).

§§

6. LA MAQUINÀRIA DE CONJUGACIÓ: UNA ESTRUCTURA JERÀRQUICA

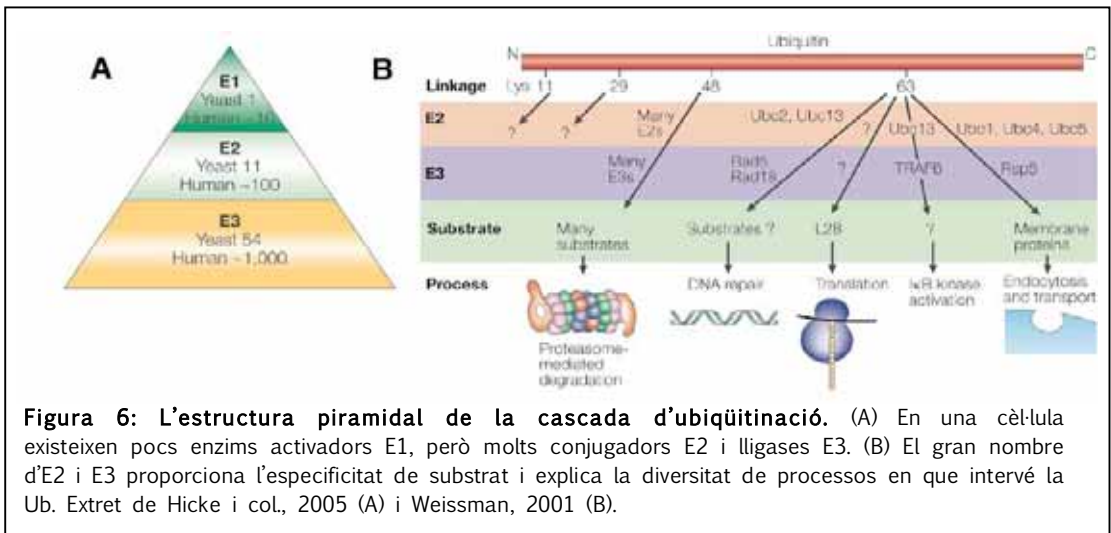
En un pas previ, la Ub reacciona amb una molècula d'ATP i s'enllaça a AMP, alliberant dos fosfats. La reacció d'ubiquitinació continua amb l'activació de la Ub-AMP mitjançant la formació d'un enllaç tioèster entre la Gly C-ter i la cisteïna (Cys) del lloc actiu de l'enzim activador E1. Aquesta reacció allibera AMP.

En el següent pas, la Ub és transferida a la Cys de l'enzim conjugador E2 i, finalment, forma un enllaç isopeptídic amb el grup ϵ -amino d'una Lys del substrat. Aquest últim pas és catalitzat per les E3, lligases d'Ub específiques de substrat (Figura 5).



Un cop s'ha enllaçat la primera Ub al substrat, el procés es repeteix successivament i els monòmers formen enllaços Gly-Lys intermoleculars que formen les cadenes de poliubiquitina (Figures 4, 5) (per revisió, vegeu Glickman i Ciechanover, 2002).

La complexitat dels mecanismes d'ubiquitinació opera de forma piramidal. Un o pocs enzims E1 activen i enllacen la Ub a aproximadament una dotzena d'enzims E2 que, a la vegada, transfereixen la Ub a nombroses lligases E3 per a la modificació dels substrats. D'aquesta manera, a cada pas en la reacció d'ubiquitinació augmenta el nombre de proteïnes potencialment implicades. S'incrementa, així, l'especificitat d'unió al proper component de la cascada i, per tant, els possibles punts de regulació (Figura 6).



6.1. Lligases E3 d'ubiquitina: les responsables de l'especificitat

Les lligases E3 d'Ub poden ser proteïnes monomèriques o poden estar formades per complexos multiproteics. Són les responsables de l'especificitat del sistema, ja que reconeixen els substrats gràcies a senyals d'ubiquitinació o de degradació. Tenint en compte el gran nombre de substrats que s'ubiquïtinen, no resulta massa sorprenent que les anàlisis *in silico* de les bases de dades prediguin centenars de lligases E3 d'Ub (Fang i Weissman, 2004).

Les E3 es divideixen en dos grans grups: les lligases amb dominis HECT (*Homologues to E6-AP C-Terminus*) i les lligases de la família dels RING (*Really Interesting New Gene*) fingers (**Figura 7**). Tot i que l'efecte final dels diferents tipus d'E3 és el mateix, existeixen algunes diferències fonamentals entre les seves activitats enzimàtiques.

Els dominis HECT, altament conservats, contenen aproximadament 350 aminoàcids, i es troben invariablement localitzats a l'extrem C-ter de la proteïna. L'aminoàcid catalític és un residu Cys que s'enllaça a la Ub prèviament unida a l'E2 que, posteriorment, serà transferida al substrat (**Figura 7**). Els segments N-ter d'aquestes lligases E3 no sols serveixen per reconèixer el substrat, sinó que determinen també la seva pròpia localització subcel·lular (Weissman, 2001).

La família de lligases E3 amb dominis RING *finger* constitueix, ara per ara, la família enzimàtica amb més membres pel que fa als enzims relacionats amb ubiquitinació i/o deubiquitinació (Freemont, 2000). Els RING *fingers* es caracteritzen per vuit cisteïnes i histidines molt conservades que coordinen dos ions de zinc amb

una estructura creuada (Borden i Freemont, 1996). Contràriament al mecanisme d'acció de les lligases tipus HECT, les lligases amb RING *finger* enllacen directament la ubiquïtina al substrat sense la necessitat de formar un enllaç intermediari (Joazeiro i Weissman, 2000), i són susceptibles d'autoubiquitinació en una Lys interna (Pickart, 2001) (**Figura 7**).

En alguns, casos les lligases de tipus RING *finger* formen complexos multimèrics, com ara els complexos Skp1/Cul1/F-box (SCF) i el complex promotor de l'anafase (APC) (**Figura 7**).

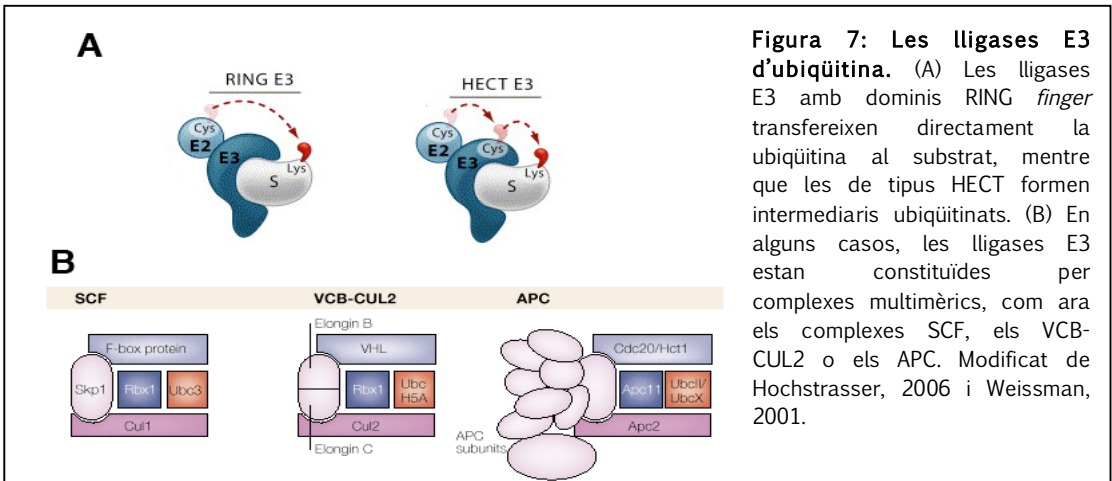


Figura 7: Les lligases E3 d'ubiquïtina. (A) Les lligases E3 amb dominis RING *finger* transfereixen directament la ubiquïtina al substrat, mentre que les de tipus HECT formen intermediaris ubiquitinats. (B) En alguns casos, les lligases E3 estan constituïdes per complexos multimèrics, com ara els complexos SCF, els VCB-CUL2 o els APC. Modificat de Hochstrasser, 2006 i Weissman, 2001.

Actualment, nombroses dades apunten cap a l'existència d'una nova família enzimàtica: els factors d'elongació E4. Aquests, contenen els dominis *U-box*, que mostren una homologia distant amb els dominis RING *finger* (tot i que no contenen els residus conservats de coordinació de zinc). Els dominis *U-box* es van descriure per primera vegada en la proteïna UFD2, necessària per a que es doni una eficient poliubiquitinació del substrat. Aquesta proteïna requereix l'activitat d'una altra lligasa E3 per exercir la seva funció (Hetz i col., 2003). És per aquest motiu que es classifica dins la família enzimàtica dels E4 (*Ubiquitin chain elongation factors*).

6.2. L'especificitat de substrat

Quins trets necessita una proteïna per a ser reconeguda com a substrat d'ubiquitinació? En principi, qualsevol interacció molecular que posicionés de manera adient una lligasa E3 amb un lloc potencial d'ubiquitinació podria generar una interacció productiva, resultant en la ubiquitinació del substrat. Però per tal que es doni la ubiquitinació en el substrat correcte, i en el moment adient, es requereixen un gran nombre d'interaccions proteïna-proteïna (revisat a Fang i Weissman, 2004) freqüentment regulades per modificacions posttraduccionals del substrat,

principalment, fosforilació (particularment, en regulació del cicle cel·lular), glicosilació, acetilació i hidroxilació.

Un bon exemple d'aquest fenomen és la regulació d'aquelles proteïnes els nivells de les quals han d'estar molt finament controlats en funció de l'ambient, de l'estadi del desenvolupament o del cicle cel·lular. Aquestes generalment es fosforilen en resposta a cascades de transducció de senyal, i esdevenen substrats de les lligases E3 de tipus SCF (Yaron i col., 1998; Laney i Hochstrasser, 1999).

Un altre exemple de la modulació de la degradació el trobem en proteïnes que contenen superfícies hidrofòbiques que promouen el seu reconeixement mitjançant les lligases E3. Aquestes regions només estan exposades en estat lliure, mentre que deixen d'ésser accessibles en unir-se a una altra proteïna. La modulació de les taxes de degradació mitjançant plegament o interaccions proteïna-proteïna generalment no té la mateixa precisió temporal que la regulació mitjançant fosforilació, i és per aquest motiu que es creu que el reconeixement de senyals de degradació hidrofòbics serveix primàriament per el control de qualitat del plegament de les proteïnes (Johnson i col., 1998; Laney i Hochstrasser, 1999).

§§

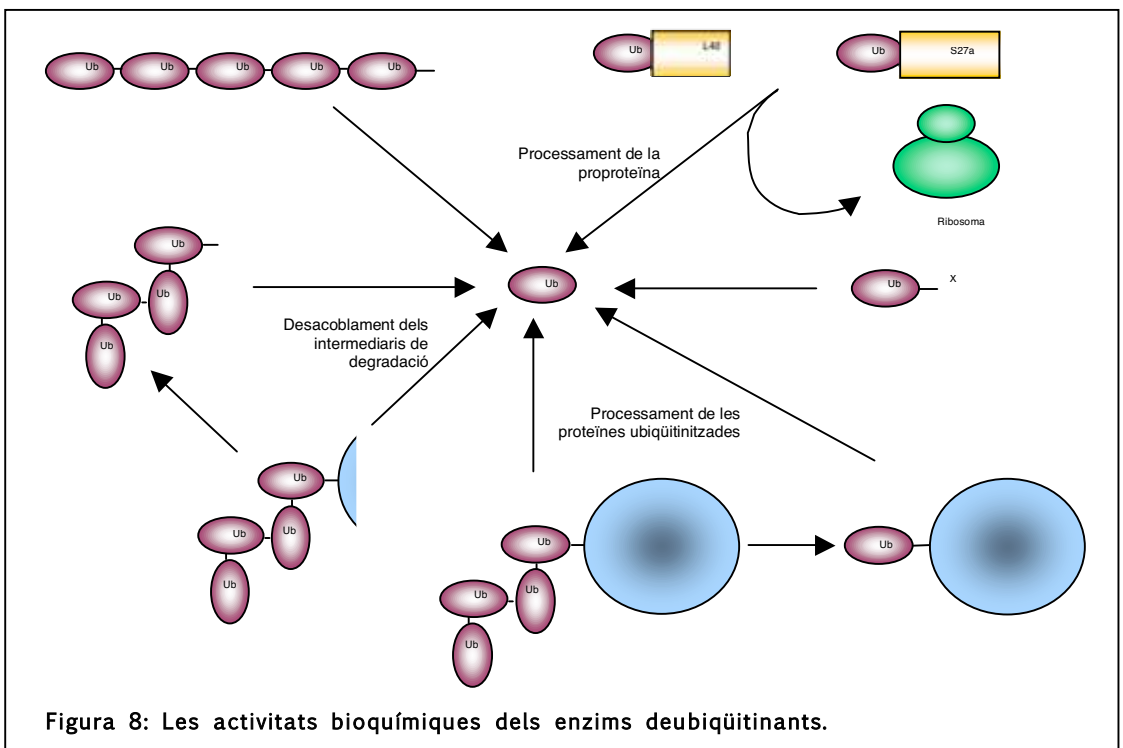
7. ELS ENZIMS DEUBIQUÏTINANTS

Els conjugats proteïna-ubiquitina formen unes estructures altament dinàmiques. De la mateixa manera que existeixen un gran nombre d'enzims encarregats d'enllaçar un monòmer d'Ub a un substrat, hi ha també centenars d'enzims deubiquitinants (*Deubiquitinating enzymes, DUBs*), necessaris per catalitzar la reacció contrària.

7.1. Les activitats bioquímiques dels enzims deubiquitinants

Tradicionalment, el focus d'estudi en el camp de la ubiquitinació s'ha centrat en la degradació proteica mitjançant el proteasoma. És per això que, actualment, gran part del coneixement sobre les activitats bioquímiques dels enzims deubiquitinants es basa en els efectes en l'estabilitat metabòlica.

En general, els DUBs poden realitzar una o varies de les activitats següents: processament dels precursors d'Ub, edició i rescat de substrats, acoblament de la deubiquitinació i de la degradació i hidròlisi dels oligòmers d'Ub (**Figura 8**).



7.1.1. Processament dels precursors d'ubiquitina

Com ja hem esmentat anteriorment, la Ub es sintetitza en forma de precursor. Aquests precursors són, bé fusions amb determinades proteïnes ribosomals, o bé multímers enllaçats de forma concatamèrica que contenen un aminoàcid addicional després de l'últim monòmer d'Ub (Finley i Chau, 1991). Es va demostrar en llevat que diversos DUBs hidrolitzaven *in vitro* l'enllaç peptídic entre la Ub i les diferents extensions a C-ter (Amerik i col., 2000a). Tot i això, s'ha verificat *in vivo* que existeixen diferències en les eficiències i en les afinitats entre els diferents membres de la família.

7.1.2. Edició i rescat de substrats ubiquitinats

En el moment en que un substrat entra dins la cambra proteolítica del proteasoma, aquest serà irreversiblement degradat. És per això que l'especificitat del sistema ha d'estar altament regulada i, abans d'arribar al proteasoma, diversos enzims deubiquitinants que selectivament reconeixeran aquelles proteïnes que han estat erròniament senyalitzades per ser degradats. Alguns dels DUBs que realitzen aquesta funció es poden trobar solubles al citoplasma, mentre que d'altres es troben ancorats al proteasoma.

Els DUBs intervenen, alhora, en els altres mecanismes de senyalització mitjançant Ub que no estan relacionats amb processos degradatius. Així, mitjançant deubiquitinació es poden revertir, i per tant regular, senyals d'endocitosi, reparació de DNA, transcripció, etc.

7.1.3. Acoblament de la deubiquitinació i de la degradació mitjançant el proteasoma

Al proteasoma, les cadenes de poliubiquitina s'han d'alliberar del substrat per evitar que també siguin degradades per la maquinària proteasomal, o que impedeixin la entrada correcta del substrat a la cambra proteolítica. Existeixen com a mínim quatre enzims deubiquitinants que podrien realitzar aquesta funció: Doa4, Rpn11/POH1, Ubp6/USP14 i UCH-L5 (**Figura 9**).

El primer DUB descrit associat al proteasoma és Doa4 (Papa i col., 1999). Aquest enzim afavoreix el procés de proteòlisi de determinats substrats mitjançant el desacoblament de cadenes de poliubiquitina abans, o just després, de l'inici de la proteòlisi (Papa i Hochstrasser, 1993).

La metal·lo-proteasa Rpn11/POH1 sembla ser la responsable de la principal activitat deubiquitinant del proteasoma, ja que la deleció d'aquest gen en llevat genera una degradació proteica defectuosa i és letal (Amerik i col., 2000a). Rpn11/POH1, de la mateixa manera que Doa4, desacobla tota la cadena de poliubiquitina del substrat, afavorint d'aquesta manera la correcta degradació del substrat.

Ubp6/USP14 també interacciona amb el proteasoma, i aquesta interacció incrementa la seva activitat deubiquitinant en més de dos ordres de magnitud (Leggett i col., 2002). Molt recentment s'ha descrit que, contràriament a l'efecte de RPN11/POH1 i Doa4, Ubp6/USP14 no facilita la degradació sinó que té la capacitat de retrassar-la mitjançant un mecanisme, encara desconegut, independent de l'activitat deubiquitinant de l'enzim (Hanna i col., 2006).

UCH-L5, de la mateixa manera que Doa4, RPN11/POH1 i Ubp6/USP14, és responsable de l'activitat isopeptidasa de la subunitat reguladora 19S. UCH-L5, però, hidrolitza, un a un, monòmers d'ubiquitina de cadenes de poliubiquitina a partir del seu extrem distal, i s'ha postulat que tindria una funció de "neteja" de substrats poc ubiquitinats o units de manera anòmala al proteasoma, per evitar possibles col·lapses (Yao i col., 2006).

7.1.4. Hidròlisi dels oligòmers d'ubiquitina

En la majoria de cèl·lules eucariotes es troben nivells elevats no tan sols d'Ub lliure, sinó també de cadenes lliures de poliubiquitina. Aquestes poden ser generades *de novo* per lligases E3 d'Ub, o bé per hidròlisi de les cadenes a partir d'un substrat poliubiquitinat (Pickart, 2000). Tot i això, l'acumulació en excés de cadenes de poliubiquitina pot inhibir els processos dependents d'Ub, particularment, la degradació mitjançant el proteasoma (Amerik i col., 1997).

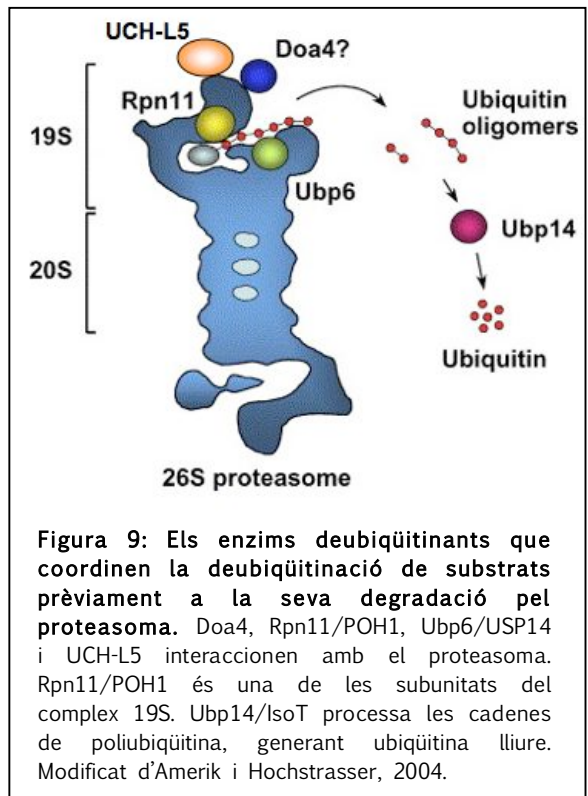


Figura 9: Els enzims deubiquitinants que coordinen la deubiquitinació de substrats prèviament a la seva degradació pel proteasoma. Doa4, Rpn11/POH1, Ubp6/USP14 i UCH-L5 interaccionen amb el proteasoma. Rpn11/POH1 és una de les subunitats del complex 19S. Ubp14/IsoT processa les cadenes de poliubiquitina, generant ubiquitina lliure. Modificat d'Amerik i Hochstrasser, 2004.

Sorprenentment, un sol enzim deubiquitinant és responsable de la hidròlisi de les cadenes de poliubiquitina lliures. Aquest DUB, anomenat Ubp14 en llevat i isopeptidasa T en mamífers (**Figura 9**), és dels més ben caracteritzats bioquímicament (Falquet i col., 1995). *In vitro*, la isopeptidasa T actua exclusivament sobre cadenes lliures de poliubiquitina, i no en substrats poliubiquitinats. Contràriament a la resta d'enzims deubiquitinants, Ubp14 hidrolitza els oligòmers d'Ub a partir de l'extrem proximal de la cadena, és a dir, l'extrem amb la Gly 76 lliure (Falquet i col., 1995; Wilkinson i col., 1995).

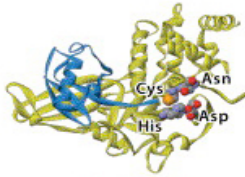
7.2. Classificació: la gran diversitat de la família dels enzims deubiquitinants.

Els DUBs pertanyen a la superfamília enzimàtica de les proteases. En un gran estudi a escala genòmica es va estimar que existien 561 membres d'aquesta superfamília al genoma humà (Puente i Lopez-Otin, 2004). En funció del mecanisme de catàlisi, les proteases es divideixen en cinc classes: aspartat-proteases, metal·lo-proteases, serina-proteases, treonina-proteases i cisteïna-proteases. Dues de les classes de proteases contenen membres de la família dels DUBs (cisteïna-, metal·lo-). Les cisteïna-proteases tenen tres aminoàcids claus per a la seva funció, que constitueixen la tríada catalítica: cisteïna, histidina i aspàrtic. La seva activitat enzimàtica recau en el grup tiol d'aquesta Cys.

Basant-se en l'homologia de seqüència i en la similaritat de mecanismes d'acció, els enzims deubiquitinants es divideixen en cinc subfamílies: i) proteases específiques d'Ub, ii) hidrolases a carboxiterminal d'Ub, iii) proteases amb dominis OTU, iv) proteases amb dominis *Machado-Joseph Disease* (MJD), i v) proteases amb dominis JAMM (**Figura 10**). Les quatre primeres subfamílies corresponen a tipus especialitzats de cisteïna-proteases, mentre que la cinquena està formada per metal·lo-proteases dependents de zinc. L'estructura tridimensional dels dominis catalítics de cada subfamília ha estat resolta, tant en la seva conformació lliure com conjugats amb un monòmer d'Ub, i en alguns casos es revelen similituds sorprenents entre enzims de diferents subfamílies, com per exemple en el plegament que adopen en unir la Ub (**Figura 10**).

Figura 10: Les cinc famílies d'enzims deubiquitinants. Estructures terciàries i seqüències aminoacídiques dels dominis conservats de les cinc famílies d'enzims deubiquitinants. Els aminoàcids conservats responsables de la hidròlisi del substrat estan indicats com a esferes de Van der Waals en l'estructura terciària i amb asteriscs en els alineaments. Modificat d'Amerik i Hochstrasser, 2004 i Nijman i col., 2005.

A. UBP

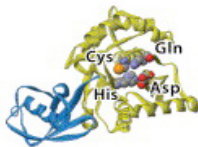


USP domain

Protein	Residue	Sequence
HAUSP	214	VGLK NG GATCYMNSL LL QT IFF
ISOT	326	TGHR NL GN SC Y LN SVV Q VL FS
Ubp14	345	CGL IN LG NS CY LN SV IQ SL VN
Ubp3	460	RGL IN NR ANI CFM SS V LQ V LLY
Doa4	562	VGL EN LG NS CY MN CI IQ CL IG
Ubp6	109	VG FK NG NT CY LN AT LQ AL YR
Ubp10	362	RGL LN HG VT CT IN AA VQ AM LH
Faf	1668	CGL KN AG AT CY MN SV LQ Q LYM
UBP43	55	VGL EN IG QT C LN SL IQ V FVM
Consensus		GlkNlgntCymnslIQ lv

Protein	Residue	Sequence
HAUSP	445	P AN Y IL H AV L V H S G-D NH G G H Y V V Y L N P K G ---D G K W C K F DD D V V
ISOT	775	P G K Y O L F A F I S H M G T S T M C G H Y V C H L K K ----E G R N V I Y N D Q K V
Ubp14	741	P-- Y A L T A V I C H K G N S V H S G H Y V V F I R K L V A D --K W K W V I Y N D E K L
Ubp3	841	D R R Y K L T C V I Y H H C V S S D G G H Y T A D V H S ---E H N K W Y R I D D V N I
Doa4	861	P F K Y E L Y C V A C H F G -T L Y G H Y T A Y V K G --L--K K G L Y F D D T K Y
Ubp6	427	S C V Y N L I C V I T H O C A N S E S G H Y Q A F I R D E L D--E N K W Y K F N D D K V
Ubp10	671	V K Y Q L S V V V H E C R S L S S G H Y I A H C K Q P----D G S A T Y D D E Y I
Faf	1967	T T K Y E L T G I V V H S G -Q A S G H Y F S Y I L S K N P A N G K C Q W Y K F D D G E V
UBP43	299	G G Q E L F A V I A H V E--M A D S G H Y C V I R N A V ----D G K W F C F N D S N I
Consensus		P kY L avi H G s GHY yik d kW fdD v

B. UCH



UCH domain

Protein	Residue	Sequence
Yuh1	79	V I W F K Q S V K N A C G L Y A I L H S L S N N Q S
UCH-L1	79	V Y F M K Q T I S N A C G T I G L H A V A N N Q D
UCH-L3	84	V Y F M K Q T I S N A C G T I G L H A I A N N K D
UCH37	77	V I F A K Q V I N N A C T Q A I V S V L L N C T H
Consensus		vyfmKQti NaCgtiaiihalaNnqd

Protein	Residue	Sequence
Yuh1	165	L H Y I T V Y E N G G I F E L D G R N L S G P L Y L C K S
UCH-L1	160	F H F I L F N N V D G H L Y E L D G R--M P F P V N H G A S
UCH-L3	168	L H F I A L V H V D G H L Y E L D G R--K P F P I N H G E T
UCH37	163	F H F V S Y V P V N G R L Y E L D G L--R E G P I D L G A C
Consensus		Hfityv v GhlyELDGr p Pin Gas

C. OTU/Cezanne



OTU domain

Protein	Residue	Sequence
Otubain 1	80	S Y I R K T R P D G N C F Y R A F G F S H L --
Otubain 2	40	T A I R K T K G D G N C F Y R A L G Y S Y L --
Cezanne	198	L L P L A T T G D G N C L D H A S L G M W G F
A20	92	L V A L K T N G D G N C L H A T S Q Y M W C V
VCIPI35	207	L L P V H V D G D G C L V H A V S R A L V R
Consensus		ll lkt gDgNcllha s mlg

Protein	Residue	Sequence
Otubain 1	249	F P E G S E P K V Y L Y R P C H Y D I L Y K
Otubain 2	208	F P E A A T P S V Y L Y K T S H Y N I L Y A
Cezanne	363	S P -----L V L A V D Q H F S A L V S
A20	246	Y P -----I V L G Y D S H E V P L V T
VCIPI35	348	S S -----G R N H Y I P L V G
Consensus		fp v l y Hy Lv

D. Ataxin-3/Josephin



MJD domain

Protein	Residue	Sequence
Ataxin-3 (H.sapiens)	2	E S I F H E K Q E G S L C A Q H C L N N L L O G E
Ataxin-3 (C.elegans)	8	N S I F F H E H Q E A L C A Q H A L N M L L O D A
Ataxin-3 (A.thaliana)	8	G M L Y H E V Q E S N L C A V H C V N T V L O G P
Consensus		sifhEkQEG LCAQHclN lLQg

Protein	Residue	Sequence
Ataxin-3 (H.sapiens)	108	N E R S F I C N Y K E H W F T V R K L G K
Ataxin-3 (C.elegans)	106	T A R A Y I C N L R E H W F V L R K F C N
Ataxin-3 (A.thaliana)	115	L E S A F I C H L D H W E C I R K V G
Consensus		eraficNlkeHWF vRKlg

E. MPN+/ JAMM



JAMM domain

Protein	Residue	Sequence
Rpn11	74	--T G R--D M V V G W Y H S H G--G C W S S--V D V N T K S----N S R A V A V V D L --
POH1	101	- Q T G R P E M V V G W Y H S H P G E G C W L S G V D I N T Q S F E A L S R A V A V V D P E
Rri1	166	D Y K G A K L N V V G W Y H S H P G Y D C W L S N I D I Q T O D L N Q R F O D P Y V A V V D P E
Csn5	126	- Q V G R L E N A G W Y H S H P G Y G C W L S C H D V S T Q M L N Q F O F E P F V A V V I D P T
Consensus		qtGr e vvGwYHSHpgygCWLsgvDvntQ lmq fqe aVAvVvDpi

La gran varietat de conjugats ubiquitinats fa pensar que cada tipus de DUB tindrà especificitat per hidrolitzar compostos diferents, com ara precursors inactius d'Ub, o bé Ub enllaçada a un substrat mitjançant un enllaç isopeptídic. S'ha pogut veure que molts DUBs poden hidrolitzar diferents tipus d'enllaç, tot i que no amb la mateixa eficiència (Mayer i Wilkinson, 1989).

LES CINQ SUBFAMÍLIES D'ENZIMS DEUBIQUÏTINANTS

7.2.1. Proteases específiques d'ubiquitina

Les funcions de les proteases específiques d'ubiquitina (*Ubiquitin Proteases*, UBPs) comprenen tots els tipus de reaccions que s'han descrit fins ara per als enzims deubiquitinants, des del processament de precursors d'Ub, fins al desacoblament de les cadenes lliures de poliubiquitina. No és d'estranyar, doncs, que aquestes proteases representin la subclasse més gran i diversa de la superfamília dels DUBs. De la mateixa manera que el nombre de lligases E3 d'Ub va augmentar al llarg de l'evolució, també ho va fer el nombre d'UBPs, fet que suggereix una coevolució entre els dos tipus enzimàtics (Semple, 2003).

Degut a que el genoma humà conté el nombre més gran de seqüències amb dominis UBP, el Comité de Nomenclatura de l'Organització del Genoma Humà (HUGO) va proposar una nomenclatura sistemàtica, fent servir l'abreviació "USP" per *Ubiquitin Specific Protease* (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>). La numeració és essencialment arbitrària, i fins ara s'han descrit 58 USPs (Kay Hofmann, no publicat).

El domini catalític de les UBPs està format per dos motius curts i ben conservats, anomenats caixa Cys i caixa His, que inclouen els tres residus crítics per a la catàlisi (**Figura 10**). En estudis recents s'han caracteritzat algunes USPs que no contenen algun d'aquests residus. Aquest és el cas d'USP30 i USP16, que tot i que no tenen l'aspàrtic (Asp) de la tríada catalítica retenen encara l'activitat enzimàtica envers un substrat model artificial (Nijman i col., 2005).

La longitud del domini complet pot variar entre 300 i 800 aminoàcids, aproximadament, degut a la diversitat de la seqüència que es troba entre els dos motius. La funció d'aquestes seqüències internes roman encara incerta, tot i que s'ha suggerit que podrien tenir un paper regulador en la funció de la proteïna, similar a la contribució de les extensions aminoacídiques dels extrems amino- i carboxiterminals. Dites seqüències actuarien en col·laboració per determinar el reconeixement de substrat, la localització subcel·lular o les interaccions proteïna-proteïna (Kim i col., 2003).

7.2.2. Hidrolases a C-terminal d'ubiquitina

Les “hidrolases a C-terminal d'ubiquitina”, (*Ubiquitin carboxi-terminal hydrolases*, UCHs) constitueixen una família de proteïnes relativament petites, amb pesos moleculars que oscil·len entre 20 i 30 kDa (amb comptades excepcions). El domini catalític, d'aproximadament 230 aminoàcids, conté els tres aminoàcids de la tríada catalítica en posicions estructuralment conservades (Larsen i col., 1996). En humans s'han trobat tan sols quatre representants d'aquesta subclasse, i tots ells presenten una alta homologia en els seus dominis catalítics (**Figura 10**).

La majoria de les UCHs no poden hidrolitzar la Ub dels conjugats Ub-substrat ni hidrolitzar cadenes de poliubiquitina lliures. En canvi, tenen un paper en la síntesi d'Ub lliure monomèrica a partir dels seus precursors (Pickart i Rose, 1985).

UCH-L1 ha estat la proteasa més estudiada d'aquesta subfamília. L'any 1998 es va descriure una correlació entre la reducció de la seva activitat i la malaltia de Parkinson (Leroy i col., 1998). Posteriorment, es va observar que les variants d'UCH-L1 associades amb l'elevada susceptibilitat a la malaltia causaven l'acumulació d' α -sinucleïna. Aquest efecte, que no podia ser explicat segons l'activitat d'hidrolasa d'Ub (la manca de deubiquitinació hauria de promoure la degradació del substrat), va comportar la caracterització d'una segona activitat per aquest enzim, la de lligasa E3 d'ubiquitines (Liu i col., 2002).

7.2.3. Proteases amb dominis OTU

Mitjançant anàlisis bioinformàtiques per cercar proteïnes relacionades amb el gen OTU (*Ovarian Tumor*) -implicat en la morfogènesi de l'òocit de *Drosophila*- es va detectar un domini (anomenat OTU) de funció desconeguda que contenia una cisteïna i una histidina i, en la majoria dels casos, també un aspàrtic, i mostrava els trets característics d'una proteasa (**Figura 10**) (Makarova i col., 2000). Posteriorment, es van aïllar dues proteases que contenien el domini OTU (otubain-1 i otubain-2), i es va demostrar que eren capaces d'hidrolitzar l'enllaç isopeptídic d'una cadena de poliubiquitina (Balakirev i col., 2003). Paral·lelament, en un assaig de doble híbrid per trobar proteïnes interaccionants amb cadenes de poliubiquitina, s'aïllà Cezanne (*cellular zinc finger anti-NF- κ B*), una altra de les proteïnes amb un domini OTU, que també presentava activitat deubiquitinant *in vitro* (Evans i col., 2003).

A20, una proteïna estructuralment similar a Cezanne, és un membre particular de la família dels DUBs, ja que hidrolitza enllaços isopeptídics formats per les Lys48 i Lys63 de la Ub. Conté, a més del domini OTU, un domini de dits de zinc que confereix a la proteïna l'activitat de lligasa E3. A20 exemplifica un cas de l'elevada coordinació entre els processos regulats per Ub, on l'activitat de lligasa E3 i la

deubiquitinasa cooperen per silenciar la senyalització mitjançant NF- κ B. (Figura 11) (Wertz i col., 2004).

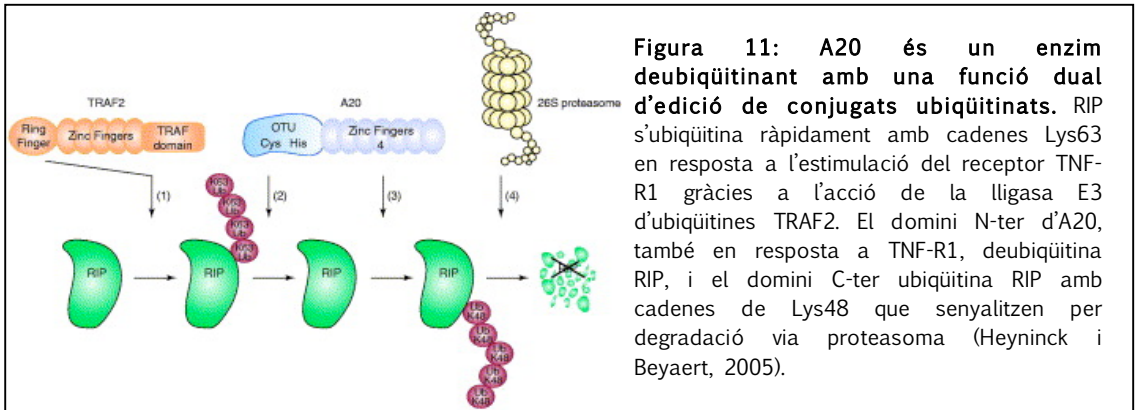


Figura 11: A20 és un enzim deubiquitinant amb una funció dual d'edició de conjugats ubiquitinats. RIP s'ubiquitina ràpidament amb cadenes Lys63 en resposta a l'estimulació del receptor TNF-R1 gràcies a l'acció de la lligasa E3 d'ubiquitines TRAF2. El domini N-ter d'A20, també en resposta a TNF-R1, deubiquitina RIP, i el domini C-ter ubiquitina RIP amb cadenes de Lys48 que senyalitzen per degradació via proteasoma (Heyninck i Beyaert, 2005).

Malgrat tot, resta encara per investigar el fet de si totes les proteïnes amb dominis OTU són realment enzims deubiquitinants, així com quina és la seva funció fisiològica.

7.2.4 Proteases amb dominis *Machado-Joseph Disease*

La quarta família de DUBs està formada fins ara per un sol membre: l'ataxina-3 (proteïna mutada en l'atàxia espinocerebel·lar de tipus tres, o malaltia de Machado-Joseph). Aquesta proteïna es caracteritza per la presència del domini Josephin, que va ser identificat en cerques bioinformàtiques que tractaven de trobar noves classes de proteases específiques d'Ub (Scheel i col., 2003). El domini catalític de l'ataxina-3 i el de les altres DUBs són poc homòlegs, però estudis estructurals recents de ressonància magnètica nuclear (NMR) mostren que l'organització global de les caixes Cys i His està conservada (Figura 10) (Mao i col., 2005; Nicastro i col., 2005).

7.2.5 Proteases amb dominis JAMM

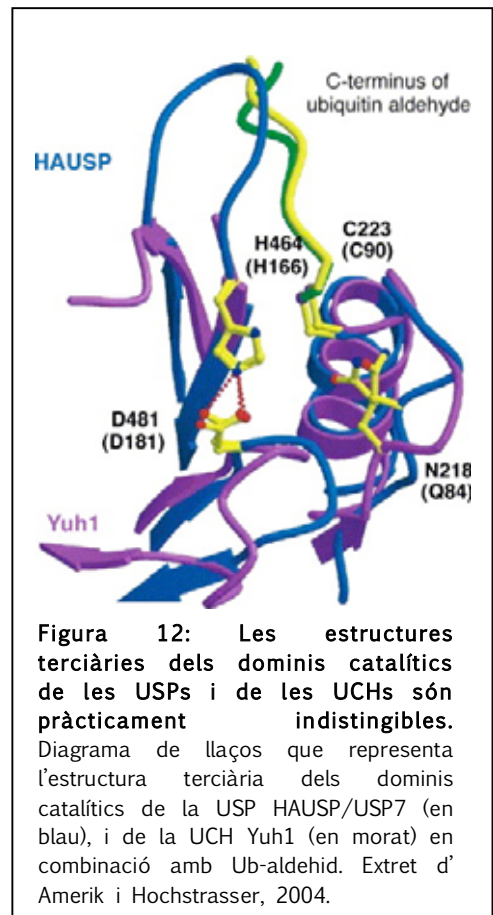
El representant principal de la última família de DUBs és la subunitat del proteasoma Rpn11/POH1. És una metallo-proteasa específica per proteïnes conjugades a Ub, i el motiu JAMM (*Jab1/MPN domain metalloenzyme*) és el responsable de la seva activitat bioquímica (Verma i col., 2002). Els bacteris no contenen activitat proteasa d'Ub (i per ara no s'ha descrit cap sistema anàleg a la conjugació d'Ub), però tenen proteïnes amb dominis JAMM. Aquest fet fa pensar que els dominis JAMM han adquirit noves funcions durant l'evolució i que encara podrien contribuir a d'altres mecanismes no necessàriament relacionats amb el processament d'Ub (Nijman i col., 2005).

7.3. L'estructura

S'han descrit les estructures terciàries dels dominis catalítics dels cinc tipus de DUBs, algunes d'elles en complex amb derivats d'Ub (**Figura 10**). Aquests estudis han revelat una diversitat inesperada, però també, algunes similituds sorprenents. Entre aquestes, hem de destacar les semblances entre el nucli catalític de les UCHs i de les UBPs. De fet, les estructures terciàries d'un representant de les UCHs i un de les UBPs resulten pràcticament indistingibles, malgrat la manca d'homologia de seqüència (Johnston i col., 1999; Hu i col., 2002) (**Figura 12**), i són pràcticament idèntiques a l'estructura del nucli catalític de les cisteïna-proteases clàssiques, com ara la papaina.

Fins ara, s'han cristal·litzat dos membres de la família de les USPs: HAUSP/USP7 (HAUSP correspon a la nomenclatura clàssica, USP7 correspon a la nomenclatura sistemàtica) (Hu i col., 2002) i USP14 (Hu i col., 2005), i s'han definit tres elements estructurals del domini catalític: el "palmell", els "dits" i el "polze" (**Figura 13**. Palmell: P, dits: F, polze: T). Aquesta nomenclatura és la mateixa que es fa servir habitualment per definir l'estructura de les polimerases.

Els "dits" estan formats per làmines β que es pleguen per coordinar el lligand. El "polze" inclou la Cys activa i l'hèlix central catalítica, i el "palmell" conté l'Asp i la Histidina (His) de la tríada catalítica, així com la làmina β conservada del nucli de la proteasa.



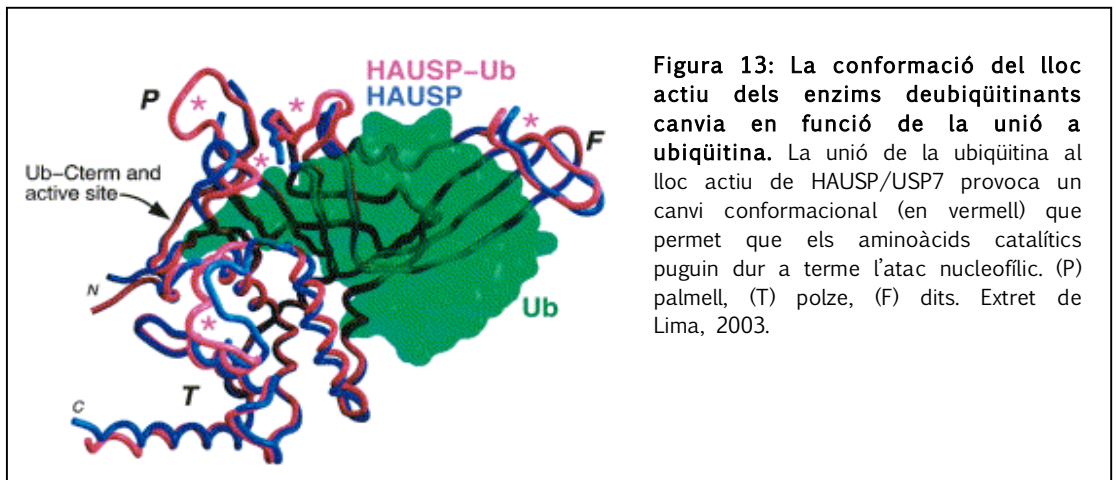


Figura 13: La conformació del lloc actiu dels enzims deubiquitinants canvia en funció de la unió a ubiquitina. La unió de la ubiquitina al lloc actiu de HAUSP/USP7 provoca un canvi conformacional (en vermell) que permet que els aminoàcids catalítics puguin dur a terme l'atac nucleofílic. (P) palmell, (T) polze, (F) dits. Extret de Lima, 2003.

L'estructura de HAUSP/USP7 conjugada a Ub-aldehid va mostrar diversos canvis conformacionals importants respecte a l'estructura de la forma lliure (**Figura 13**), el més important dels quals és que els elements necessaris per la catàlisi es localitzen en les posicions òptimes per realitzar l'atac nucleofílic. Aquesta és una de les característiques compartides entre les UBPs i les UCHs, ja que l'avantatge de l'activació dependent d'Ub és que, d'aquesta manera, els enzims seran proteolíticament inerts front la majoria de proteïnes cel·lulars, i només seran actius quan els substrats estiguin ubiquitinats.

7.4. L' especificitat de substrat

Potencialment, totes les proteïnes ubiquitinades podrien ser substrat per als enzims deubiquitinants però, evidentment, ha d'existir una especificitat per tal de mantenir el correcte funcionament del sistema.

En els cas dels enzims deubiquitinants, s'ha de tenir en compte que l'especificitat es pot referir al monòmer d'Ub o al tipus de cadena de poliubiquitina, o també a la proteïna diana a la qual s'hi ha unit la Ub. Tanmateix, no és possible separar ambdós tipus d'especificitat. És probable que en la majoria de casos, la combinatòria entre el substrat i el tipus de modificació és la que determina l'especificitat de l'enzim.

Altres mecanismes, com la localització subcel·lular, la interacció amb altres proteïnes, l'estructura de les proteïnes diana, l'abundància relativa o les extensions aminoacídiques que es troben a ambdós extrems del domini catalític de l'enzim, poden contribuir a l'especificitat *in vivo*.

El gran repte pel que fa a la recerca sobre els enzims deubiquitinants és el d'assignar funcions fisiològiques específiques a cada membre de la família. Mitjançant estudis genètics s'han pogut determinar unes quantes funcions per a algun dels enzims però, així i tot, encara no es coneixen gaire els seus veritables substrats. En la majoria de casos aquests han estat identificats indirectament, és a dir, en cribratges a gran escala per identificar complexos proteics.

CASOS CONEGUTS DE FUNCIÓ I D'ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT DELS DUBS: RELLEVÀNCIA BIOLÒGICA I IMPLICACIÓ EN MALALTIES

En la següent taula s'indiquen els casos coneguts de funció i substrats d'enzims deubiquitinants humans. Alguns d'ells es comenten més endavant.

Taula 2: Casos coneguts de funció i especificitat de substrat

NOM	SUBSTRAT(S)	PROCÉS/MALALTIA	PROPIETATS
UCHs			
UCH-L1	-	Malaltia de Parkinson	L'homodímer té activitat lligasa E3. Mutants en ratolí presenten atàxia
BAP1	-	-	S'uneix a BRCA1
UCH-L5		Edició Ub, senyalització TGF β	Unió al proteasoma
USPs			
CYLD	TRAF2/6, NEMO	Senyalització NF- κ B i JNK	Supressor de tumors
USP1	FANC2	Reparació DNA	
USP2	<i>Fatty acid synthase</i>	Senyalització per andrògens Apoptosi	Regulada de manera circadiana
USP4	-	-	Té activitat transformant
USP5	-	-	Uneix cadenes d'Ub per Lys29 i també ISG15
USP6	-	Possible oncogèn, remodelació d'actina	Té activitat transformant. En càncer s'han trobat rearranjaments gènics i fusions
USP7	HDM2, p53, H2B	Senyalització per p53, silenciament per Polycomb	S'uneix a la proteïna Vmw10 de l'HSV
USP8	NRDP1	Endocitosi Creixement cel·lular	Fusió oncogènica amb p85-PI3K
USP9X	β -catenina, epsines, AF-6	Senyalització per Wnt i per Notch. Endocitosi	
USP9Y	-	Espermatogènesi	Mutants han estat associats amb azoospermia
USP11	BRCA2	Reparació DNA?	Interacciona amb RanBPM
USP14	-	Funció sinàptica	Ratolins mutants presenten atàxia. S'uneix al proteasoma
USP15	RBX1	Signalosoma COP9	
USP16	H2A?	Condensació cromosòmica?	

USP18	-	Senyalització JAK/STAT. Immunitat	Específica per ISG15. Induïda per interferó
USP20	DIO2?	Metabolisme de les hormones de la tiroides. Senyalització per hipòxia	Interacciona amb pVHL
USP21	-	Aturada del cicle cel·lular	Hidrolitza Ub i Nedd8, però no SUMO
USP25	MyBPC1	-	Existeix isoforma específica de múscul. També interacciona amb ACTA1 i FLN2.
USP26	-	Espermatogènesi	Existeix isoforma específica de testicle
USP28	Chk2, 53BP1	Resposta al dany al DNA	Existeix isoforma específica de múscul
USP33	HIF1- α , DIO2?	Senyalització d'hipòxia	Interacciona amb pVHL
MJDs			
Ataxina-3	-	Malaltia MJD	Conté repeticions CAG
OTUs			
A20	RIP	Senyalització NF- κ B	També és lligasa E3
VCIP135	-	Desmuntatge de l'aparell de Golgi	
JAMM			
POH1	-	Proteasoma	
AMSH	EGFR?	Endocitosi	
CSN5	Cul·lines	Signalosoma COP9	Majoritàriament hidrolitza Nedd8
BRCC36	-	Control transició G2/M	Potencia l'activitat lligasa E3 de BRCA1/BARD1

7.4.1. Regulació de l'activitat del proteasoma

La deubiquitinació de les proteïnes que arriben al proteasoma és un procés que ha estat estudiat de manera exhaustiva, i ja l'hem comentat anteriorment a l'apartat 7.1.

7.4.2. Creixement cel·lular i diferenciació

Alguns enzims deubiquitinants semblen estar involucrats en la divisió cel·lular i la diferenciació. Per exemple, la sobreexpressió d'UBP41, l'homòleg murí d'USP2, indueix tots els trets característics de l'apoptosi en cèl·lules en cultiu, incloent la fragmentació del DNA i l'activació de la caspasa-3 (Gewies i Grimm, 2003). A partir d'aquests resultats, s'ha proposat que UBP41 tindria una activitat proapoptòtica mitjançant l'estabilització de substrats implicats en l'activació de l'apoptosi. Aquestes afirmacions són bastant controvertides atès que en cèl·lules de càncer de pròstata,

en canvi, USP2 inhibeix l'apoptosi mitjançant l'estabilització de FAS (*Fatty acid synthase*) (Graner i col., 2004).

També s'ha descrit la contribució d'UBPY (USP8) en el control del creixement cel·lular, ja que la inhibició d'aquest enzim per RNAi impedeix que les cèl·lules entrin en fase S i queden aturades en G1 (Naviglio i col., 1998). USP21, en canvi, promouria l'efecte contrari, ja que és la seva sobreexpressió la que inhibeix el creixement cel·lular en cèl·lules en cultiu (Gong i col., 2000).

Un bon exemple d'enzims deubiquitinants implicats en la regulació del creixement cel·lular i la diferenciació són UBP45 i UBP69. Aquestes dues proteïnes de rata són productes de diferents processos d'*splicing* a partir d'un mateix gen, i comparteixen els extrems C-ter, mentre que difereixen en els extrems N-ter (Park i col., 2002). Malgrat la seva semblança estructural, UBP45 i UBP69 realitzen funcions antagòniques en la regulació de la miogènesi. Mentre que UBP69 provoca la fusió de mioblastos i l'expressió de marcadors musculars, UBP45 bloqueja ambdós fenòmens (Park i col., 2002). Els autors d'aquest treball suggereixen que les extensions a l'extrem N-ter d'UBP45 i UBP69 determinen la seva especificitat o preferència de substrat, probablement mitjançant diferències en la seva localització subcel·lular.

7.4.3. Desenvolupament

El primer exemple de deubiquitinació específica de substrat es va trobar en *Drosophila*, amb la proteïna *fat facets* (Faf) (USP9X/Y a humans) (Huang i col., 1995). Aquesta proteïna havia estat relacionada amb vies de comunicació intercel·lular durant el desenvolupament de l'ull per limitar a vuit el nombre de fotoreceptors en cada ommatidi. Chen i col·laboradors van demostrar l'any 2002 que Faf deubiquitinava *liquid facets* (Lqf), una proteïna senyalitzadora associada amb el complex endocític de clatrina, i n'impedia la seva degradació (Chen i col., 2002). D'aquesta manera es genera un senyal inhibitori que evita que es formin fotoreceptors ectòpics.

Posteriorment, es va veure que la sobreexpressió de Faf en cèl·lules neuronals produïa malformacions en el creixement i la transmissió sinàptica, i que Faf interaccionava genèticament amb *highwire*, una lligasa E3 (DiAntonio i col., 2001). Aquests fets indicaven que el desenvolupament sinàptic depenia del balanç entre la regulació positiva i negativa per ubiquitinació de Lqf.

L'homòleg muri de Faf, Fam, mostra especificitat per AF-6 i per β -catenina (Taya i col., 1998; Taya i col., 1999), dues proteïnes que participen en adhesió cel·lular i en transducció de senyal durant el desenvolupament de l'embrió. *In vivo*, la inhibició de Fam mitjançant RNAi causa una disminució del nombre de divisions

cel·lulars i d'adhesió, així com la desaparició de β -catenina i la localització incorrecta d'AF-6. Aquestes observacions suggereixen que Fam està implicat en la implantació de l'embrió durant el desenvolupament.

7.4.4. Regulació de l'estructura de la cromatina i de l'activitat transcripcional

Evidències recents impliquen la ubiquïtinació dinàmica de les histones en la regulació de la transcripció (Yamashita i col., 2004). Tot i que la majoria de les histones s'ubiquïtinen, el fenomen més estudiat és la monoubiquïtinació de la histona H2B.

En llevat, hi intervenen dues UBPs: la deubiquïtinació d'H2B mitjançant Ubp10 és necessària pel silenciament gènic dels telòmers ja que recluta el factor Sir2 (Emre i col., 2005), mentre que la deubiquïtinació mitjançant Ubp8 està relacionada amb l'efecte contrari: l'activació transcripcional (Henry i col., 2003). És important subratllar que tant la ubiquïtinació com la deubiquïtinació d'H2B estan finament regulades al llarg del temps (Henry i col., 2003) i són necessàries per a una activitat transcripcional òptima.

A *Drosophila*, de forma similar al que es dona en llevats, HAUSP/USP7 interacciona preferiblement amb regions gèniques silenciades, incloent els dominis telomèrics, i s'ha suggerit que podria deubiquïtinar i contribuir al silenciament provocat per gens de la família Polycomb (van der Knaap i col., 2005). En mamífers, HAUSP/USP7 interacciona amb p53 i amb la seva lligasa E3 d'Ub, HDM2 (Li i col., 2004). Recentment, s'ha descrit que HDM2 pot facilitar la ubiquïtinació de la histona H2B (Minsky i Oren, 2004). Aquestes dades suggereixen un model on els complexos HDM2/p53/HAUSP/USP7 faciliten la repressió transcripcional mitjançant la ubiquïtinació d'H2B.

7.4.5. Endocitosis

Tant la monoubiquïtinació com la diubiquïtinació (unió de dues molècules d'Ub) mitjançant el residu Lys63 de la Ub tenen papers importants en l'endocitosis de receptors transmembrana i el direccionament de les proteïnes internalitzades (Hicke i Dunn, 2003). La internalització dels receptors tirosina quinasa (RTKs) es produeix per la monoubiquïtinació en diverses lisines (multiubiquïtinació) en resposta a la unió als seus lligands. En altres casos, aquests receptors poden ser poliubiquïtinats mitjançant Lys48 i conseqüentment degradats mitjançant el proteasoma.

Els DUBs intervenen en la regulació de la via endocítica a molts nivells, alhora que també han estat implicats en altres tipus de tràfic intracel·lular. En humans, dos enzims deubiquïtinants interaccionen amb la maquinària endocítica: USP8/UBPY i

AMSH, amb efectes oposats en la regulació d'alguns RTKs, com ara el receptor de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (EGFR) (Clague i Urbe, 2006). La inhibició d'USP8/UBPY (l'homòleg humà de Doa4) causa un retard en la degradació de l'EGFR i d'altres RTK, mantenint actiu el receptor (Row i col., 2006). En canvi, el silenciament d'AMSH (DUB amb domini JAMM), promou l'acumulació d'Ub a l'endosoma i l'endocitosi d'EGFR, inhibint-ne la senyalització (McCullough i col., 2004).

7.4.6. Oncogènesi

CYLD, USP6, BAP1 i HAUSP/USP7 són alguns dels DUBs que han estat associats amb processos d'oncogènesi. A continuació exposem detalladament els mecanismes on intervenen aquests enzims, així com el tipus de càncer en que es troben implicats.

La cilindromatosi familiar és un desordre autosòmic dominant que causa predisposició a la formació de tumors a la pell, i va ser el primer síndrome hereditari associat a mutacions en un enzim deubiquitinant: CYLD (Bignell i col., 2000). Aquest DUB deubiquitina específicament TRAF2, una lligasa E3 d'Ub que activa la via d'NF- κ B (només quan està ubiquitinada amb cadenes d'Ub enllaçades per residus Lys63) (Kovalenko i col., 2003). Mutacions en CYLD que inhibeixen la seva unió a TRAF2 augmenten els nivells de TRAF2 poliubiquitinada i, consegüentment, s'incrementa l'activitat de la via d'NF- κ B. L'inhibició de l'apoptosi deguda a l'augment d'activitat d'NF- κ B és el mecanisme patogènic més probable causant de la cilindromatosi (Brummelkamp i col., 2003).

USP6, també anomenat TRE17 o tre-2, és un altre DUB que va ser identificat inicialment com a oncogèn degut a la seva capacitat per induir la transformació de fibroblasts murins (Nakamura i col., 1992). En humans és també capaç de generar creixement neoplàsic, i s'han trobat reordenaments cromosòmics que afecten aquest gen en gairebé un 70% dels casos de quist ossi aneurismàtic (Oliveira i col., 2004). Recentment, s'ha descrit que USP6 regula el tràfic de vesícules d'endocitosi (Martinu i col., 2004) i que es pot ubiquitinar en resposta a la interacció amb calmodulina (Shen i col., 2005). Així i tot, el mecanisme mitjançant el qual produeix transformació resta encara per resoldre.

BAP1 (*BRCA1-associated protein1*) és un DUB que s'uneix a BRCA1 i n'afavoreix la seva activitat lligasa E3. Degut a que la pèrdua de l'activitat de BRCA1 provoca inestabilitat cromosòmica (mitjançant mecanismes desconeguts), es creu que BAP1 està també associat a processos oncogènics, ja que aquest enzim potencia la inhibició del creixement cel·lular provocat per BRCA1 (Jensen i col., 1998). Tot i això, fins ara no s'han trobat mutacions deletèries d'aquest gen en casos familiars de càncer de mama (Coupier i col., 2005).

HAUSP/USP7 és possiblement la USP més estudiada. Descrita inicialment com a proteïna que interacciona amb Vmw110 (proteïna viral de HSV, necessària pel cicle lític) (Everett i col., 1997), va ser identificada posteriorment com a proteïna d'unió a p53 (Li i col., 2002a). HAUSP/USP7 deubiquïtina i estabilitza específicament p53, provocant una aturada del cicle cel·lular i apoptosi dependent de p53. Tot i això, la història és bastant més complexa, ja que HAUSP/USP7 també interacciona i estabilitza HDM2, la lligasa E3 encarregada d'ubiquïtinar i degradar p53 (Li i col., 2004) i també MDMX, un inhibidor de la transcripció activada per p53 (Meulmeester i col., 2005). Aquestes dades deixen entreveure un cicle de regulació dels nivells de p53 molt dinàmic, que encara no es coneix en la seva totalitat. Experiments molt recents indiquen que HAUSP/USP7 no és l'únic DUB implicat en les respostes cel·lulars de p53. Zhang i col·laboradors han desvetllat USP28 com un enzim clau en l'apoptosi induïda pel dany al DNA mitjançada per p53 (Zhang i col., 2006).

Existeixen altres exemples d'enzims deubiquïtinants relacionats amb processos d'oncogènesi com, per exemple, els d'USP20 i USP33, proteïnes que interaccionen amb pVHL, que es troba mutada en el síndrome hereditari de la malaltia de von Hippel-Lindau (Li i col., 2002b). Molt probablement, la llista d'UBPs relacionades amb mecanismes oncogènics anirà incrementant en els propers anys degut a que moltes de les proteïnes reguladores de cicle i diferenciació cel·lular tenen una vida mitjana molt curta i es troben regulades pel UPS. Els grans esforços i pressuposts que s'estan dedicant a temes relacionats amb processos cancerígens faciliten que es duguin a terme aquests estudis.

7.4.7. Malalties neuronals

Diversos enzims deubiquïtinants han estat relacionats de manera directa o indirecta amb desordres neuronals, com ara la malaltia de Parkinson, l'atàxia o la síndrome de Down.

Tal i com ja hem esmentat anteriorment en parlar de les UCHs (apartat 7.2.2), l'any 1998 es va descriure una correlació entre una mutació puntual que causava un descens d'activitat d'UCH-L1 i la malaltia de Parkinson (Leroy i col., 1998). Posteriorment, altres mutacions o polimorfismes en UCH-L1 han estat també relacionats amb malalties neurodegeneratives: l'atàxia espinocerebel·lar (Fernandez-Funez i col., 2000) i la malaltia de Huntington (Naze i col., 2002).

L'any 2002 es va demostrar que el gen *ataxia*, que en cas d'estar mutat en ratolins causava tremolors severs, paràlisi de les extremitats i mort de l'animal, codificava per USP14 (Wilson i col., 2002). El fet que els ratolins amb atàxia mostren alteracions greus en la transmissió sinàptica, aparentment degut a defectes en l'alliberament de neurotransmissors a les unions neuromusculars, sembla indicar que USP14 tindria una funció en la regulació de l'activitat sinàptica (Kim i col., 2003).

Un tipus específic d'ataxies, les atàxies espinocerebel·lars, estan causades per l'expansió de triplets CAG en un nombre de gens aparentment no relacionats entre ells. Mitjançant tècniques bioinformàtiques es va poder determinar que l'ataxina-3, mutada en l'ataxia de tipus tres o la malaltia de Machado-Joseph (MJD), constituïa el primer membre d'una nova família d'enzims deubiquitinants, la família de les proteases amb dominis MJD (Scheel i col., 2003), de les quals ja n'hem parlat anteriorment.

Dos dels membres de la família dels enzims deubiquitinants es troben localitzats al cromosoma 21: USP16 i USP25. Aquest cromosoma es troba triplicat en els individus amb síndrome de Down, i estudis d'expressió gènica en cervells fetals d'individus trisòmics van demostrar que USP25 es trobava sobreexpressat aproximadament 1,6 vegades respecte a individus control (Valero i col., 1999).

7.4.8. Altres funcions dels enzims deubiquitinants

Els cribratges genètics a gran escala, les dades d'interactomes o les prediccions de dominis, han obert noves perspectives sobre funcions dels DUBs. A tall d'exemple, cribratges en *C.elegans* han suggerit recentment la implicació d'una USP i d'una UCH en la regulació de la interferència d'RNA i de la longevitat, respectivament (Hamilton i col., 2005; Kim i col., 2005). També s'ha descrit, en aquest organisme, la proteïna Duo-2, que conté alhora un domini USP i un OTU, i està associada a la funció sinàptica (Sieburth i col., 2005).

Dades derivades d'estudis a gran escala d'interaccions proteïna-proteïna han relacionat diverses USPs amb nombroses vies de transducció de senyal, com la via del TGF- β o la de NF- κ B. Per exemple, s'ha trobat que USP45 interacciona específicament amb el receptor del TGF- β (però només quan aquest està fosforilat) (Barrios-Rodiles i col., 2005). També s'ha demostrat que USP11 i USP9 interaccionen, respectivament, amb RelB i p100, dos factors de transcripció de la via de NF- κ B (Bouwmeester i col., 2004). Tot i que encara no s'ha aclarit el grau de significació d'aquestes interaccions, tot sembla indicar que els DUBs tenen un paper important en la regulació d'aquestes vies.

HAUSP/USP7 conté un domini MATH (*meprin and IRAF homology*) que es troba habitualment en lligases E3 implicades en la via de transducció de senyal de diversos TNFs. La presència d'aquest domini en HAUSP/USP7, suggereix que aquesta proteïna podria intervenir en aquestes vies, a més de regular els nivells de p53 i MDM2 o de la histona H2B, comentats anteriorment. L'estudi dels dominis estructurals de les DUBs proporcionarà noves pistes pel que fa a la seva funció.

7.5. USP25: un enzim deubiquitinant humà

USP25 és un gen que codifica per una proteasa específica d'ubiquitines, caracteritzat inicialment al nostre grup durant una cerca exhaustiva de gens localitzats al cromosoma 21 potencialment implicats en la síndrome de Down. Hibridacions *in situ* de teixits murins mostraren elevats nivells d'expressió en l'epiteli proliferatiu neuroepitelial i les neurones postmitòtiques del cervell fetal, així com en els espermatòcits en maduració de testicles d'organismes adults, definint una correlació clara entre zones d'elevada expressió d'*USP25* i d'alt recanvi proteic (Valero i col., 1999). Posteriorment, mitjançant experiments de PCR quantitativa en cervells fetals Down, es va determinar que *USP25* es trobava sobreexpressat aproximadament 1,6 vegades en comparació amb individus control. Aquest fet va suggerir un possible paper d'aquest enzim en el fenotip de la síndrome de Down (Valero i col., 2001).

Les anàlisis de comparació de seqüències van revelar diversos dominis d'una elevada homologia amb components de la família de les UBPs i, alhora, van permetre identificar un nou membre d'aquesta família, que va ser anomenat USP28. Mitjançant assaigs *in vitro* es va poder demostrar l'activitat deubiquitinasa d'ambdós enzims (Valero i col., 2001).

USP25 i *USP28* constitueixen una nova subfamília d'USPs i s'expressen a nivells basals en tots els teixits analitzats. Presenten una isoforma específica de múscul esquelètic i cor que es genera per *splicing* alternatiu mitjançant la inserció en pauta d'un exó (32 aminoàcids), que possiblement confereix a la proteïna noves regions de regulació o d'interacció proteïna-proteïna associades a noves funcions o especificitats (Valero i col., 2001).

§§

8. ELS DOMINIS D'INTERACCIÓ AMB UBIQUÏTINA

La ubiquïtinació d'un substrat no només regula la degradació pel proteasoma, sinó que també intervé en la regulació de l'expressió gènica, l'estructura de la cromatina, la reparació del DNA, el transport de proteïnes, l'endocitosi i la degradació proteica mitjançant el lisosoma i el vacúol. Aquests processos tan diversos impliquen multitud de dianes d'ubiquïtinació que, indispensablement, han d'ésser reconegudes amb elevada especificitat, i la modificació de les quals està altament regulada tant temporalment com espacialment.

Si considerem en el tipus d'ubiquïtinació d'un substrat, apareix un nou nivell de complexitat: a part del senyal canònic d'ubiquïtinació, que consisteix en una cadena d'un mínim de quatre ubiquïtines enllaçades mitjançant la Lys48, altres tipus de senyalització fan servir la monoubiquïtinació, la múltiplemonoubiquïtinació o la poliubiquïtinació de monòmers d'Ub enllaçats per lisines que no són la 48 com, per exemple, el residu Lys63 o Lys29. A més, no hem d'oblidar que apart de la Ub existeixen altres modificadors relacionats estructuralment amb la Ub (els UBLs) que funcionen de manera anàloga, però senyalitzen funcions totalment diferents. Degut a les nombroses funcions de la ubiquïtinació, han d'existir mecanismes per detectar si un substrat està ubiquïtinat, però també sistemes específics capaços de discriminar entre la longitud de la cadena i el tipus d'enllaç.

La conjunció de mètodes bioinformàtics i experimentals a partir de l'anàlisi de les estructures tridimensionals de les proteïnes ha permès descriure els "dominis funcionals". Aquests es pleguen de forma independent a la resta de la proteïna, ja que tenen el seu propi nucli hidrofòbic. Experimentalment s'ha demostrat que alguns dominis funcionals s'enllacen no covalentment a la Ub, i s'anomenen "dominis d'unió a ubiquïtina" (*Ubiquitin Binding Domains*, UBDs). La presència d'un UBD en una proteïna indica que aquesta pot interaccionar amb la Ub o amb una proteïna ubiquïtinada, i que alhora pot estar regulada per ubiquïtinació. A més, els múltiples UBDs en alguns casos també modulen la formació de la cadena de poliubiquïtina, alterant el destí del substrat. D'aquesta manera, l'observació de l'arquitectura molecular d'una proteïna ens pot suggerir la seva implicació en processos relacionats amb la Ub.

Tot i que fins ara existeixen setze UBDs (a la **taula 3** s'indiquen els més rellevants) i que, de ben segur, en els propers anys n'apareixeran de nous, els primers en ser descrits van ser els dominis UBA (*ubiquitin associated motif*) i els UIM (*ubiquitin interacting motif*), que són, per tant, els més ben caracteritzats.

Taula 3: Principals dominis d'unió a Ub

DOM.	REPRESENTACIÓ AL PROTEOMA*	ESTRUCTURA I MODE D'ACCIÓ	LONG.	AFINITAT PER Ub (K_d) (μ M)	MÈTODE D'IDENTIFICACIÓ	EXEMPLES
CUE	Sc: 7 Hs: 21	Triple hèlix amb superfície hidrofòbica d'interacció	42-43	2-160 (monoUb)	Y2H amb monoUb	Vps9p, Tollip
GAT	Sc: 2 Hs: 14	Triple hèlix amb superfície hidrofòbica i acídica d'interacció	135	180 (monoUb)	Y2H per trobar proteïnes interactants amb GGA1. Uneix monoUb	GGA1, TOM1, TOM1L1
GLUE	Sc: ? Hs: ?	-	135	460 (monoUb)	Unió a monoUb	Eap45
NZF	Sc: 1 Hs: 25	Quatre làmines β antiparaleles. Dit de zinc que coordina un ió de Zn	35	100-400 (monoUb)	Unió a monoUb, poliUb i proteïnes ubiquitinades	Np14, TAB2/3, Vps36p
PAZ	Sc: 5 Hs: 16	-	58	-	Y2H, uneix GST-Ub	HDAC6
UBA	Sc: 10 Hs: 98	Triple hèlix amb superfície hidrofòbica d'interacció	45-55	100-500 (monoUb) 0,03-9 (poliUb)	Anàlisi bioinformàtiques	Rad23, Ede1p
UEV	Sc: 2 Hs: ?	Quatre hèlixs α i quatre làmines β	145	100-500 (monoUb)	Similar al domini catalític de les E2, uneix GST-Ub	TSG101, Vps27p
UIM	Sc: 8 Hs: 71	Hèlix α curta	20	100-400 (mono- o poliUb)	Anàlisi bioinformàtiques	Eps15, EpsinesVps27p
VHS	Sc: 4 Hs: 28	-	150	-	Unió a monoUb i poliUb	STAM

DOM: Nom del domini UBD

* Nombre de proteïnes del proteoma que contenen el domini

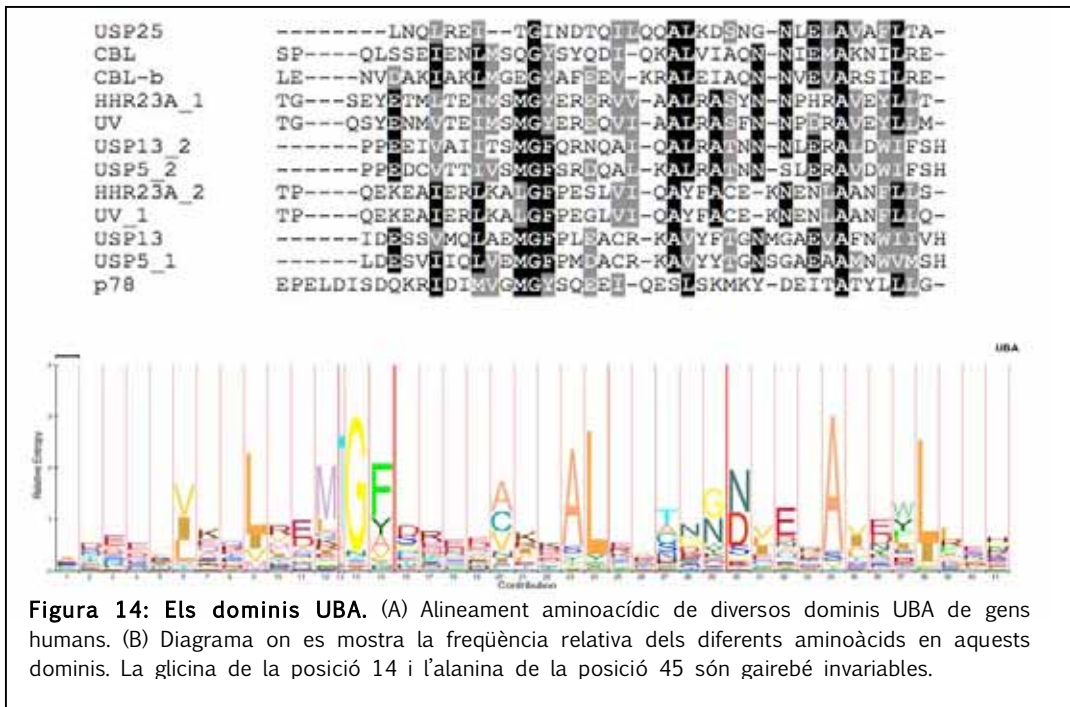
Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Hs: *Homo sapiens*

LONG: Longitud del domini, en nombre d'aminoàcids

8.1. UBA: Ubiquitin associated domain

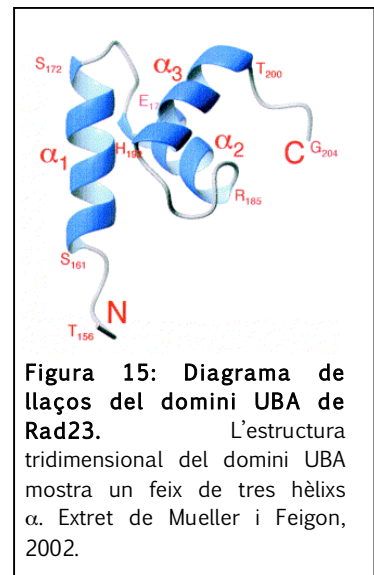
El domini UBA va ser identificat inicialment mitjançant cerques bioinformàtiques com a una regió conservada d'uns 40 aminoàcids present en multitud de proteïnes

implicades en el sistema d'ubiquitinació (**Figura 14**) (Hofmann i Bucher, 1996). Els dominis UBA es troben, entre d'altres, en enzims conjugadors E2 d'Ub, en lligases E3 (tant de tipus RING com de tipus HECT), en proteases d'Ub, etc. Cal destacar que es troben especialment presents a proteïnes que contenen també dominis d'homologia a Ub.



Inicialment, es va predir una funció d'unió a Ub per als dominis UBA (Hofmann i Bucher, 1996), i actualment s'ha demostrat per molts d'ells (Buchberger, 2002; Swanson i col., 2006; Trempe i col., 2005). La majoria de dades que tenim sobre aquest tipus de dominis provenen d'estudis sobre la proteïna Rad23, degut a que és una proteïna d'importància cabdal en la reparació del DNA que té dos dominis UBA (Madura, 2002). L'estructura tridimensional d'aquests dos dominis mostra un plegament que consisteix en un feix de tres hèlixs alfa (**Figura 15**) (Mueller i Feigon, 2002).

Fins ara no es coneix cap estructura d'un complex UBA:Ub i, per tant, només es pot especular sobre el tipus d'interacció. Sembla que dues regions



hidrofòbiques de l'UBA s'uneixen a la superfície de la Ub que conté la lle-44, però fins i tot els residus més interns participen en l'enllaç (Ryu i col., 2003). El fet que els dominis UBA són molt petits i, probablement, bastant flexibles, fa pensar que durant el procés de reconeixement es generen canvis estructurals que faciliten la unió.

Inicialment es considerava que els dominis UBA enllaçaven específicament cadenes de poliubiquitina per la Lys48 (Chen i col., 2001; Wilkinson i col., 2001; Funakoshi i col., 2002). Actualment existeixen evidències de que els dominis UBA uneixen també monoubiquitina lliure (Bertolaet i col., 2001) i cadenes de poliubiquitina per la Lys29 (Rao i Sastry, 2002).

8.2. UIM: *Ubiquitin interacting motif*

Els dominis d'interacció amb Ub UIM van ser caracteritzats inicialment gràcies a l'estudi del reconeixement i la unió dels substrats ubiquitinats mitjançant el proteasoma. Existeixen com a mínim tres subunitats del proteasoma capaces d'unir Ub: S5a/Rpn10, S6'/Rpt5 i Rpn1. En el cas de S5a/Rpn10, la regió responsable de la unió va ser delimitada a dos dominis conservats que contenien la seqüència Leu-Ala-Leu-Ala-Leu, i per això es va anomenar motiu LALAL (Young i col., 1998).

Aquest motiu era també present en altres proteïnes capaces d'interaccionar amb la Ub. D'aquí va sorgir el nom UIM (Hofmann i Falquet, 2001).

Es tractava d'un domini curt, d'aproximadament quinze aminoàcids, on gairebé invariablement es troba un sub-motiu Ala-x-x-x-Ser, on l'Ala conservada correspon a la segona "A" del motiu LALAL. La Leu inicial d'aquest motiu és l'altre residu conservat en gairebé tots els UIMs (Figura 16).

La identificació de motius UIM en quatre classes diferents de proteïnes relacionades amb vies d'endocitosi de receptors de membrana i de direccionament de proteïnes va suposar un avenç

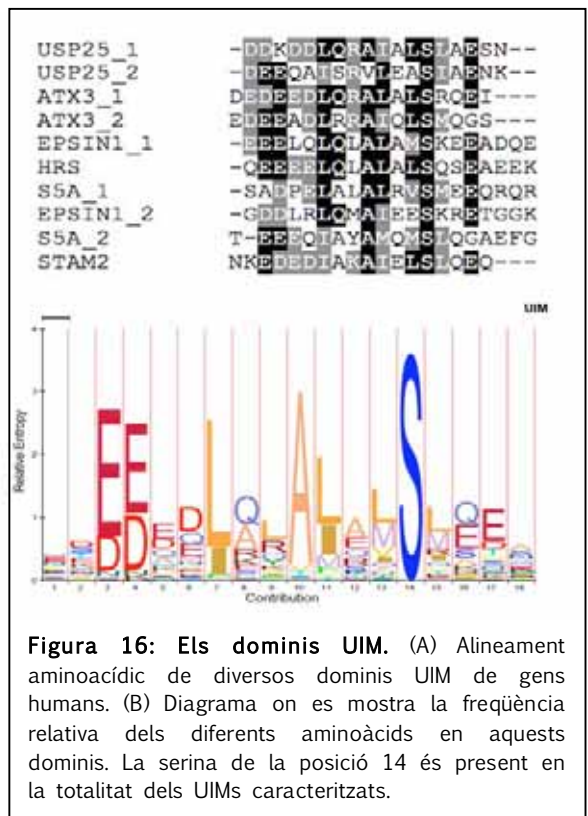
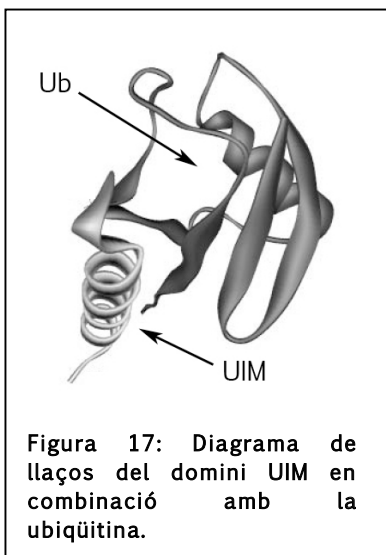


Figura 16: Els dominis UIM. (A) Alineament aminoacídic de diversos dominis UIM de gens humans. (B) Diagrama on es mostra la freqüència relativa dels diferents aminoàcids en aquests dominis. La serina de la posició 14 és present en la totalitat dels UIMs caracteritzats.

interessant en l'estudi d'aquests motius. Anteriorment, ja se sabia que l'endocitosi estava regulada per monoubiquitinació, tant de les proteïnes endocitades com dels components senyalitzadors, però no es coneixia quines eren les proteïnes encarregades de reconèixer els substrats ubiquitinats. Posteriorment a la identificació dels UIM en aquestes proteïnes, es va demostrar que talment eren els responsables d'aquest reconeixement (revisat a Di Fiore i col., 2003; Polo i col., 2003). Els UIMs es troben en molts altres tipus de proteïnes apart de la subunitat del proteasoma S5a/Rpn10 o de les proteïnes de la ruta endocítica com, per exemple, en lligases E3 d'Ub, proteïnes adaptadores, proteases d'Ub, xaperones, i nombroses proteïnes encara per caracteritzar. Basant-nos en les dades de que disposem actualment, sembla possible que totes les proteïnes que contenen motius UIM o, si més no, gairebé totes, esdevindran part dels sistema d'ubiquitinació.



El motiu UIM s'uneix a la superfície de la Ub que conté la lle-44, de forma similar al que passa amb els altres dominis d'interacció amb Ub (**Figura 17**). Tot i això, existeixen diferències notables entre la orientació d'una simple hèlix alfa com la dels UIM i la del feix d'hèlixs dels dominis UBA. D'altra banda, les estructures tridimensionals dels complexos UIM:Ub no expliquen com poden discernir entre diferents topologies de cadena. Si més no, el fet de que els UIMs es troben freqüentment en tàndem podria explicar una possible acció concertada o sinèrgica en el reconeixement específic de determinats tipus de cadenes d'Ub.

9. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC I LA VIA UPS

9.1. L'estructura del múscul esquelètic

El múscul esquelètic és una maquinària eficient i precisa que conté xarxes complexes interconnectades d'elements citoesquelètics, claus per la seva activitat contràctil. Les fibres musculars s'anomenen miofibril·les, i la seva unitat bàsica repetitiva és el sarcòmer. Aquest conté diferents tipus de filaments: prims, gruixuts, de titina i de nebulina (extensament revisat a Clark i col., 2002).

L'aparença estriada característica de les miofibril·les es pot observar mitjançant microscòpia de camp clar i es presenta en forma d'alternança entre bandes clares i fosques. Aquest fet és conseqüència de l'alineament perfecte dels sistemes filamentosos del sarcòmer. Les bandes clares s'anomenen bandes-I perquè són isotròpiques en mirar-les amb llum polaritzada. Les bandes fosques són les bandes-A, perquè són anisotròpiques. Els components principals del sarcòmer inclouen els filaments prims de les bandes I, rics en actina, que es solapen amb els filaments gruixuts de miosina de les bandes A. El tercer sistema de filaments consta de molècules de titina aïllades (és la proteïna humana més gran identificada fins al moment), que s'expandeixen al llarg de mig sarcòmer, i el quart està format per molècules de nebulina (una altra proteïna gegant) que s'extenen al llarg de tots els filaments d'actina. Els discs Z representen el límit del sarcòmer on s'ancoren els filaments prims, els de titina i els de nebulina (**Figura 18**).

La contracció muscular és un exemple espectacular de motilitat cel·lular que requereix el treball perfectament compenetrat dels diferents components citoesquelètics ja que, a partir de les aparentment simples interaccions entre l'actina i la miosina, es generen els moviments, observables a simple vista, de la contracció muscular.

Per realitzar la seva funció de manera correcta i eficient, l'aparell contràctil s'ha de mantenir amb un ordre cristal·lí. Sorprenentment, no es tracta d'un fenomen estàtic, sinó que es troba en un equilibri dinàmic de canvis constants però coordinats en la síntesi i la degradació proteica, de l'acoblament de components i del seu manteniment. Un dels majors exemples d'aquest fenomen el trobem en el múscul cardíac, on es dona síntesi de noves proteïnes i substitució de les velles tant en situacions de 60 batecs per minut com en de 200. Aquest fet indica que el citoesquelet muscular està finament regulat i que, molt probablement, ha d'estar interconnectat a nombroses vies de senyalització cel·lular i d'expressió gènica.

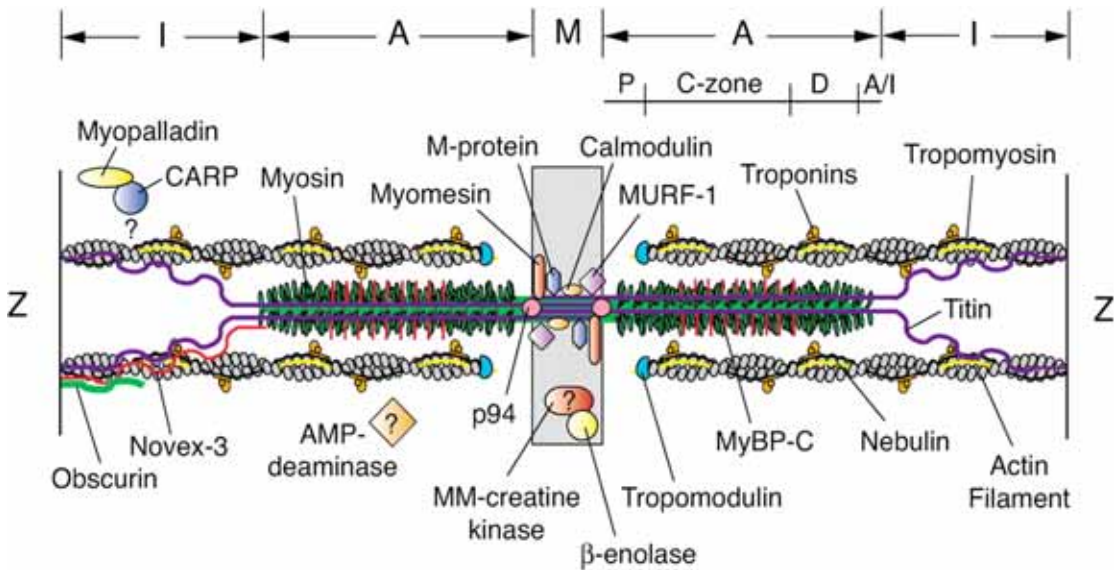


Figura 18: Digrma de l'estructura molecular del sarcòmer. Model molecular de les bandes I, les bandes A i les regions M del sarcòmer. Les bandes I dels filaments prims contenen actina, tropomiosina, troponines C, I i T, i nebulina. Aquestes s'entrecullen amb els filaments gruixuts de miosina de les bandes A, ancorats per molècules de tropomodulina. Les proteïnes d'unió a miosina, com la MyBP-C, es troben associades amb els filaments gruixuts i tenen diverses funcions. Molècules aïllades de titina, una proteïna gegant, s'estenen al llarg del sarcòmer i es creu que funcionen d'esquelet per a la seva formació. Extret de Clark i col., 2002.

9.2. El múscul i la cèl·lula muscular com a models d'estudi pel sistema de les ubiquïtines

El procés de diferenciació muscular, o miogènesi, requereix que les cèl·lules prèviament indiferenciades (els mioblasts) aturin el seu cicle cel·lular, desencadenin un programa específic d'expressió gènica i comencin la formació de miotubs. En tots aquests processos el sistema de senyalització per Ub hi juga un paper regulador, ja que s'ha de mantenir un balanç entre senyals antagòniques de creixement i de diferenciació.

Nombroses evidències experimentals donen suport a la implicació de la Ub en la miogènesi. A tall d'exemple, la ubiquïtinació de proteïnes reguladores, com són MyoD, Myf5 i les proteïnes Id, és crucial per a la diferenciació muscular (Lindon i col., 1998; Song i col., 1998; Bounpheng i col., 1999). A més, durant el procés de diferenciació i fusió de mioblasts s'observa un increment en els nivells de proteasomes, així com de conjugats ubiquïtinats en general (Gardrat i col., 1997).

Remarcablement, existeixen també exemples d'enzims deubiquitinants crítics per al correcte desenvolupament del múscul com, per exemple, UPB45 i UBP69. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquests dos enzims són productes d'un mateix gen i es generen per *splicing* alternatiu. Mentre que els nivells d'UBP69 són elevats en els primers estadis de diferenciació -en els mioblasts primerencs-, UBP45 presenta un pic d'expressió quan les cèl·lules es fusionen (Park i col., 2002). Segons el treball de Park i col·laboradors, els dos enzims tenen un efecte antagònic, ja que UBP69 és necessari per iniciar la diferenciació muscular, mentre que UBP45 provoca l'aturada de l'esmentada diferenciació, un cop ja s'han format els miotubs.

Un altre enzim deubiquitinant que sembla important per a la funció muscular és USP19, ja que els seus nivells d'mRNA s'han trobat augmentats en estats catabòlics del múscul (com són els provocats per dejuni, diabetis o tractament amb glucocorticoids) (Combaret i col., 2004). USP19 podria estar implicat en el reciclatge d'Ub després de la degradació pel proteasoma, fent una funció similar a l'enzim associat al proteasoma USP14 que, casualment, també es troba sobreexpressat en diverses condicions de desgast muscular (Lecker i col., 2004). Malgrat tot, les lligases E3 d'Ub són els enzims que fins ara han estat més ben caracteritzats en situacions patofisiològiques del múscul com, per exemple, l'atròfia. En aquest cas, s'ha demostrat que les lligases E3 atrogen-1/MAFbx i MuRF1 són d'importància cabdal per el desenvolupament d'aquests processos, i que en condicions de caquèxia provocades per dejuni, diabetis o càncer es sobreexpressen aproximadament en un ordre de magnitud, i ratolins *knock-out* per aquests gens no desenvolupen atròfia provocada per denervació del múscul (Bodine i col., 2001; Gomes i col., 2001).

§§

OBJECTIUS

1. Anàlisi de l'expressió de les diferents isoformes d'USP25. USP25 és un gen que codifica per un enzim deubiquitinant amb una isoforma específica de teixit muscular generada per *splicing* alternatiu. Per desentrellar la importància funcional d'aquesta isoforma, hem decidit analitzar la seva expressió (així com la de les altres isoformes) al llarg de la diferenciació muscular en cèl·lules C2C12 de ratolí.

2. Caracterització funcional de la isoforma muscular d'USP25, USP25m. USP25 és un enzim deubiquitinant de funció desconeguda. Vam triar la isoforma muscular, degut a la importància del sistema UPS en aquest teixit, per tal d'aprofundir en la seva funció. Els objectius que es plantejen en aquest apartat són:

- 2.1. cerca de substrats mitjançant un cribratge pel mètode del doble híbrid.
- 2.2. anàlisi de la sobreexpressió d'USP25m en cèl·lules en cultiu.
- 2.3. anàlisi de la localització subcel·lular d'USP25m.

3. Caracterització estructural d'USP25: mitjançant la dissecció de dominis funcionals s'abordarà una anàlisi de la contribució dels motius d'unió a ubiquitina en la funció d'USP25.

4. Cerca de modificacions posttraduccionals d'USP25: amb la identificació de les modificacions posttraduccionals d'aquest enzim deubiquitinant ens proposem iniciar l'estudi dels mecanismes reguladors de l'activitat d'USP25.

RESULTATS

*Les ciències tenen les arrels amargues,
però molt dolços els fruits*
Aristòtil

RESULTATS CAPÍTOL 1.

PUBLICACIÓ:

The ubiquitin-specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins.

MATERIAL SUPLEMENTARI:

Material i mètodes suplementaris

Resultats suplementaris

ARTICLE 1**TÍTOL****The ubiquitin-specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins****AUTORS (ANY)**

Anna Bosch-Comas, Kristina Lindsten, Roser González-Duarte, Maria G. Masucci i Gemma Marfany (2006)

REFERÈNCIA

Cellular and Molecular Life Sciences, **63**, 723-734

RESUM

La funció biològica de la majoria dels membres de la gran família dels enzims deubiquitinants resta encara per desxifrar. El gen *USP25*, localitzat a la regió 21q11.2, codifica per una proteasa específica d'ubiquitines amb tres isoformes proteiques generades mitjançant *splicing* alternatiu. En humans, dues de les isoformes s'expressen gairebé ubíquament, mentre que, la tercera (la més llarga, USP25m), s'expressa únicament en teixits musculars, i apareix progressivament al llarg de la miogènesi. USP25m interacciona amb tres proteïnes sarcomèriques: l'actina α -1 (ACTA1), la filamina C (FLNC) i la proteïna d'unió a miosina C1 (MyBPC1). Totes elles són crítiques en la diferenciació muscular i el manteniment de l'estructura del sarcòmer, i han estat implicades en la patogènesi de diverses miopaties. Experiments bioquímics han demostrat que la MyBPC1 és un substrat del proteasoma de vida mitjana curta, i la sobreexpressió d'USP25m (però no la d'altres isoformes) n'inhibeix la seva degradació. ACTA1 i FLNC, en canvi, són proteïnes molt estables, fet que suggereix que la seva interacció amb USP25m no està relacionada amb el seu recanvi proteic.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

Tots els experiments presentats en aquesta publicació van ser duts a terme per mi personalment. Les immunolocalitzacions d'USP25 en cèl·lules C2C12 i en músculs de ratolí (figures 2a i 2c), les anàlisis d'inhibició del proteasoma (figures 5a i 5b) i els primers experiments de rescat de la degradació de MyBPC1 (figura 6a), es van realitzar al laboratori de la Dra. Maria G. Masucci (Institut Karolinska, Estocolm), amb la participació de la Dra. Kristina Lindsten en la discussió dels resultats. La resta de resultats es van obtenir al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

1. MATERIAL

1.1. Les cèl·lules

-*Escherichia coli*

DH5 α : Soca emprada per a l'amplificació de DNA plasmídic:

***Genotip:** F' endA1 hsdR17($r_k^- m_k^+$) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 supE44
 Δ (lacIZYA-argFV169) deoR (Φ 80dlac Δ (lacZ)M15).

-*Saccharomyces cerevisiae*

AH109: obtinguda de la casa comercial BD Biosciences. Aquesta soca conté tres gens marcadors -*HIS3*, *ADE2* i *MEL1/lacZ*- sota el control de seqüències UAS de GAL4 i caixes TATA, de manera que les respostes generades per GAL4 seran més selectives i específiques.

***Genotip:** *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* ,
LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*,
URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, *MEL1*

Y187: obtinguda també de la casa comercial BD Biosciences. Conté els gens marcadors *MEL1/LacZ*.

***Genotip:** *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*,
gal4 Δ , *gal80 Δ* , *met-*, *URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*, *MEL1*

Els genotips de les dues soques són complementaris (*MATa*, *MAT α*) i, per tant, en posar-les en contacte, s'aparellen formant organismes diploids. Aquest fet ens proporciona l'avantatge de no haver de fer cotransformacions en llevat, que sovint són de baixa eficiència.

-Cultius cel·lulars eucariotes

C2C12

Línia cel·lular de ratolí establerta per Blau (Blau i col., 1983) a partir de la prèviament establerta per Yaffe i els seus col·laboradors (Yaffe i Saxel, 1977). Aquestes cèl·lules diferencien ràpidament en presència d'un medi pobre en sèrum i produeixen miotubs contràctils que expressen els típics marcadors musculars. Resulten un model adient per a l'estudi de la diferenciació muscular. Creixen en monocapa, mantingudes a 37°C amb un 5% de CO₂

1.2. Els medis de creixement

-*Escherichia coli*

Es van fer créixer els bacteris en medi LB (extret de Sambrook i col, 1989), suplementat o bé amb ampicil·lina (100µg/ml) o amb kanamicina (50µg/ml), segons el gen de selecció del vector utilitzat.

-*Saccharomyces cerevisiae*

Els medis de cultiu, així com les solucions i els reactius per la selecció i la transformació dels llevats, es van preparar seguint les instruccions del proveïdor, especificades en el *Yeast Protocols Handbook* (PT3024-1) de BD Biosciences.

-Cultius cel·lulars eucariotes

Medi de creixement (GM, *growth médium*):

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM), amb GlutaMAX. ATCC
- 10 % Sèrum fetal boví (FBS), Gibco.
- Penicil·lina-estreptomycina, concentració inicial 100 u/ml penicil·lina, 100 µg/ml estreptomycina. Gibco.

Medi de diferenciació (DM, *differentiation médium*):

Es prepara de la mateixa manera que el medi de creixement, però amb 2% de sèrum de cavall (HS, Horse Serum, BioWhittaker) enlloc de 10% de FBS.

1.3. Els anticossos

-Anticossos primaris:

En la següent taula es mostra una relació dels anticossos primaris que hem emprat en aquest treball:

	Epítip/proteïna	Hoste	Casa comercial	Aplicacions	Dilució emprada
Anticossos no comercials	USP25	Conill	-	WB, IF, IP	WB: 1:4000, IF: 1:300
	FLNC	Conill	Cedit per Dr. Kunkel	WB, IF	WB: 1:3000, IF: 1:200
Anticossos comercials	ACTA1	Ratolí	Sigma	WB, IF	WB: 1:2000, IF: 1:200
	β-galactosidasa	Ratolí	Sigma	WB	1:1000
	c-Myc	Ratolí	Santa Cruz	WB, IP	WB: 1:1000
	HA	Ratolí	Covance	WB, IP, IF	WB: 1:1000, IF: 1:200
	α-Tubulina	Ratolí	Sigma	WB	1:8000
	Ubiquitina	Ratolí	Sigma	WB, IF	WB: 1:1000, IF: 1:200

*WB: Western Blot, IF: Immunoflorescència, IP: Immunoprecipitació

-Anticossos secundaris:

Tots els anticossos secundaris emprats en aquest treball són comercials.

Per als experiments de Western Blot es van fer servir els anticossos “Sheep-anti-Mouse” i “Goat-anti-Rabbit”, en funció de si l’anticòs primari era de ratolí o de conill, respectivament. Tots dos van ser adquirits a Sigma i es van emprar a una dilució 1:3000.

Per a la immunofluorescència es van fer servir diferents combinacions d’anticossos secundaris conjugats a fluorocroms, en funció de l’hoste on s’havien produït els anticossos primaris emprats i de la combinació d’espectres d’emissió, per evitar-ne el solapament.

1.4. Les construccions: els *short hairpin* RNAs (shRNA)

Els oligonucleòtids complementaris que codifiquen per cada *shRNA* es van anellar, digerir amb els enzims *EcoRI* i *AgeI* i es van clonar en el vector pLKO.puro-1.

Nom oligonucleòtid	Seqüència
Usp25 s A	CCGGTCTACAAGCCAACCACTTTCTtccaagagaAGAAAGTGGTTGGCTTGTAGTTTTTG
Usp25 as A	AATTCAAAACTACAAGCCAACCACTTTCTtctcttgaaAGAAAGTGGTTGGCTTGTAGA
Usp25 s B	CCGGTGCATGAGTGCCTAGAAGCTtccaagagaAGCTTCTAGGCACTCATGCTTTTTG
Usp25 as B	AATTCAAAAAGCATGAGTGCCTAGAAGCTtctcttgaaAGCTTCTAGGCACTCATGCA
Usp25 s C	CCGGTCCATACCATCACAGACATTAttccaagagaTAATGCTGTGTATGGTATGGTTTTTG
Usp25 as C	AATTCAAAAACCATACCATCACAGACATTAttctcttgaaTAATGCTGTGTATGGTATGGA
Usp25 s D	CCGGTCATCACATGAGCATGAAGATtccaagagaATCTTCATGCTCATGTGATTTTTG
Usp25 as D	AATTCAAAAACATCACATGAGCATGAAGATtctcttgaaATCTTCATGCTCATGTGATGA

1.5. Els reactius**-Enzims de biologia molecular**

-*Klenow enzyme*: Fragment gran de la DNAPol d’*E. coli* (Roche Molecular Biochemicals).

-*Shrimp alkaline phosphatase* (SAP): Fosfatasa alcalina de *Pandalus borealis* (USB).

-Enzims de restricció: Es van obtenir de Promega, Roche Molecular Biochemicals, New England Biolabs.

-Kits

- Seqüenciació de DNA: *Big dye 2 i Big dye 3.1* (PE-Applied Biosystems).
- Preparació de DNA plasmídic: *QIAprep miniprep spin kit* (Qiagen), *QIAGEN plasmid midi kit* (Qiagen), *JETstar plasmid purification maxi kit 2.0* (GENOMED).
- Purificació de bandes en gel d'agarosa: *GFX PCR DNA and Gel Band purification kit*. (Amersham Pharmacia Biotech).
- Purificació de productes de PCR: *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen).
- Random primed DNA labeling kit* (Boehringer Mannheim).

2. MÈTODES**2.1. Mètodes de biologia molecular****-Preparació del DNA plasmídic**

Minipreparacions: l'extracció de DNA plasmídic per a la seva anàlisi de restricció o per a digestions preparatives es va realitzar segons el protocol de lisi alcalina adaptat de Sambrook i col, 1989. La preparació del DNA per a seqüenciació automàtica es va preparar amb una columna comercial (*QIAprep miniprep spin kit*), seguint les instruccions del proveïdor.

Per l'obtenció d'extrems compatibles a l'hora de realitzar els clonatges, es van fer servir, en el cas que fós necessari, tècniques de *filling* i de *cut-back*, extretes de Sambrook i col, 1989.

-Seqüenciació del DNA

Es va realitzar per seqüenciació automàtica. La reacció de seqüenciació es va realitzar amb diversos *kits*, seguint les especificacions de reacció i purificació dels proveïdors. El producte va ser analitzat al Servei de Seqüenciació dels Serveis Científico-Tècnics de la UB.

2.2. Protocols emprats amb *Escherichia coli***-Transformació per electroporació**

Es va utilitzar aquest mètode en la transformació del DNA plasmídic extret de llevat (*plasmid rescue*). L'aparell emprat va ser un Electro Cell Manipulator, model ECM600 (BTX). Els mètodes de preparació de les cèl·lules competents i les condicions del pols elèctric van ser les especificades pel proveïdor.

2.3. Protocols emprats amb *Saccharomyces cerevisiae*

Els mètodes de doble híbrid es van dur a terme amb el sistema MATCHMAKER de BD Biosciences, que proporciona el *Yeast Protocols Handbook* (YPH) (PT3024-1).

-Transformació de llevats amb acetat de liti

Es va fer servir el protocol de transformació a petita escala del YPH.

-Triatge d'una genoteca de cDNA de múscul esquelètic humà

El triatge de la genoteca es va realitzar mitjançant l'aparellament de dues soques de llevat de genotip complementari que havien estat transformades prèviament. Els llevats resultants eren diploids. La soca Y187 que vam adquirir ja estava pretransformada amb els cDNAs de múscul esquelètic humà, i mitjançant el mètode de transformació per acetat de liti vam transformar el vector pGBKT7 que contenia les nostres construccions en la soca AH109.

L'aparellament de les dues soques es va realitzar seguint les instruccions del manual proporcionat en adquirir la genoteca, i es van plaquejar en medis selectius. Aproximadament es van crivellar uns $2,5 \times 10^8$ clons de la genoteca. Es van fer servir 100 plaques quadrades de 10 x 10 cm de medi SD-Leu/-Trp/-His/-Ade.

A partir dels clons positius es van fer reestries per tal de fer una primera verificació de la interacció. També es van inocular cultius líquids independents per a realitzar els corresponents estocs de glicerol al 25% i poder congelar els clons.

-Assaig X-gal en placa (*colony-lift filter assay*)

Es va seguir el protocol especificat al YPH.

-Assaig líquid amb ONPG

Es va procedir segons el protocol especificat al YPH.

-Obtenció de DNA plasmídic: *Plasmid rescue*

A partir dels clons que van donar una coloració blava en l'assaig X-gal en placa, es va fer una preparació de DNA plasmídic seguint el següent protocol:

1. Creixeu les cèl·lules en 3 ml de medi selectiu SD-Histidina (per tal de seleccionar aquells llevats portadors d'un insert provinent de la genoteca).
2. Recolliu-les en un tub eppendorf centrifugant 1 min en una microfuga a 13500 rpm.
3. Resuspeneu-les en 200 μ l de tampó de lisi (*breaking buffer*).
4. Afegiu 200 μ l de boletes i 200 μ l de fenol:cloroform.
5. Feu vórtex 2 min.
6. Centrifugueu 5 min i recupereu 100 μ l de la fase aquosa en un nou eppendorf.
7. Precipiteu el DNA amb 2 volums d'etanol a RT, 10 min.
8. Centrifugueu 10 min en una microfuga a 12000 rpm.
9. Descarteu el sobrenedant i assequeu el pellet en 10 μ l d'aigua destilada estèril, 10 min a 65°C.
10. Electroporeu cèl·lules electrocompetents amb 2 μ l d'aquesta solució de DNA.

SOLUCIONS:

Breaking buffer: 2% tritó-X-100, 1% SDS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0

Per identificar els clons positius es van analitzar per restricció amb *EcoRI* i *XhoI* per començar a agrupar-los en funció de la mida del cDNA. Un mateix clon pot generar diferents mides de cDNA en funció de la reacció de retrotranscripció, ja que sovint es generen cDNAs truncats a l'extrem 5', sobretot si l'mRNA motllo és llarg. A més, cDNAs diferents poden tenir la mateixa longitud. És per això que es va generar un producte de PCR utilitzant com a motllo el DNA plasmídic obtingut directament del *plasmid rescue* de cadascun dels clons amb els oligonucleòtids pACT-F i pACT-R (veure materials), i els productes obtinguts es van transferir a membranes de niló per a la posterior hibridació amb sondes radioactives (veure mètodes, més endavant).

2.4. Transferència Southern i hibridació radioactiva

-Transferència del DNA d'un gel d'agarosa a un suport sòlid de niló

Els fragments obtinguts mitjançant amplificació per PCR van ser transferits mitjançant el mètode de Southern (1975). Variacions sobre el protocol estàndar són la hidròlisi àcida del DNA per tractament amb HCl 0.25M durant 10 min i la transferència semi-seca, que comença amb una solució de força iònica elevada i acaba amb el propi tampó del gel com a suport de la transferència (extret de la Tesi Doctoral de G. Marfany, 1991)

-Obtenció de les sondes

Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa, fent servir una matriu de llana de vidre:

1. Amb un escaupel retalleu la banda desitjada del gel d'agarosa.
2. Trocegeu l'agarosa i introduïu-la en un eppendorf.
3. Introduïu l'agarosa en un eppendorf de 0,5 ml al qual prèviament heu foradat el fons i hi heu dipositat la llana de vidre.
4. Poseu aquest eppendorf de 0,5 ml dins d'un eppendorf de 1,5 ml i centrifugueu 5 min en una microfuga a velocitat màxima.
5. Mesureu el volum del líquid recuperat.
6. Afegiu 1/10 part del volum de LiCl 4 M.
7. Afegiu 3 volums d'etanol fred.
8. Precipiteu 1 h a -20°C.
9. Centrifugueu 30 min.
10. Descarteu el sobrenadant.
11. Resuspeneu en 10 µl d'aigua destilada i escalfeu 10 min a 65°C.

-Marcatge de les sondes

Es va fer servir el mètode de *Random-hexamer priming*, descrit per Feinberg i Vogelstein (1983). Es van seguir les instruccions del *kit* comercial (Roche Molecular Biochemicals).

Per tal de purificar la sonda marcada es va fer servir una cromatografia d'exclusió en Sephadex G-50, per centrifugació.

Es va fer servir la correcció de Cerenkov per tal de calcular l'eficiència de marcatge.

-Prehibridació i hibridació dels filtres

Es va seguir el protocol indicat a Sambrook i col, 1989. La prehibridació i la hibridació es van dur a terme a una temperatura de 42°C, durant una hora la primera, i durant unes 16-18 hores la segona.

-Rentats dels filtres

Vam utilitzar les següents condicions de rentat:

-5 min 2 x SSC, 0,1%SDS.

-10 min 2 x SSC, 0,1%SDS.

-un altre rentat en les mateixes condicions que l'anterior.
Tots els rentats es feien a 65°C i en agitació.

-Exposició i revelatge dels filtres

Vam deixar els filtres exposant-se amb una pantalla reflectora, a -70°C. Al cap d'unes 8 h fèiem un primer revelatge orientatiu.

-Deshibridació dels filtres

Vam submergir els filtres en una solució de 0.1% d'SDS, a una temperatura que pot variar entre 65°C i 100°C (segons la restrictivitat desitjada), en agitació constant.

2.5. Mètodes de cultiu amb cèl·lules eucariotes

-Congelació

1. Desenganxeu les cèl·lules de la superfície del flascó mitjançant una solució de Tripsina/EDTA x 1.
2. Afegiu medi de creixement per tal d'inactivar la tripsina (fins a una proporció 1:3).
3. Centrifugueu 5 min a 300 x g.
4. Aspireu el medi i resuspeneu les cèl·lules en 1 ml de medi de congelació. Passeu-les a un vial de congelació.
5. Ràpidament, introduïu-les en un congelador de cèl·lules atemperat a temperatura ambient, i poseu-les en un congelador de -80°C. La temperatura anirà baixant poc a poc.
6. Deixeu-les a -80°C durant un mínim de 24 h i poseu-les en un tanc de nitrogen líquid.

SOLUCIONS

medi de creixement: 10%FBS, 100 u/ml penicil·lina/ 100 µg/ml
estreptomycina en DMEM (amb glutamina)
medi de congelació: 10%FBS, 100 u/ml penicil·lina/ 100 µg/ml
estreptomycina 10% DMSO en DMEM (amb glutamina)

-Descongelació

1. Treieu el vial del tanc de nitrogen líquid i descongeleu les cèl·lules ràpidament a 37°C.

2. Quan el medi estigui descongelat, passeu ràpidament 1 ml de cèl·lules a un tub estèril de 15 ml que ja contingui 9 ml de medi de creixement. Centrifugueu a 300 x g, 5 min.
3. Aspireu el medi i resuspeneu les cèl·lules en 1 ml de medi.
4. Passeu-les a un flascó de cultiu de 25 cm² que ja contingui 4 ml de medi.
5. Incubeu les cèl·lules a 37°C durant 24-48 h. Canvieu el medi amb una periodicitat que dependrà del temps de duplicació de les cèl·lules.

-Transfecció

Càlcul de l'eficiència de transfecció

Per tal d'optimitzar les condicions de transfecció, prèviament vam calcular-ne les eficiències de transfecció plaquejant diferents quantitats de cèl·lules.

En plaques de sis pous vam sembrar, de $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ cèl·lules C2C12, que van ser transfectades amb 2-8 µg de DNA, dels quals 1 µg corresponia al plasmidi pEGFP-C2. En el moment de recollir les cèl·lules, es va procedir de la següent manera:

1. Després de 48 h d'incubació es van tripsinitzar les cèl·lules i es van rentar un cop amb PBS.
2. Es van resuspendre en PBS, a un volum final d'1 ml. Aquest volum es va portar al Servei de Citometria de flux dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona, on es va obtenir el percentatge de cèl·lules fluorescents. Es va excitar amb una longitud d'ona de 488 nm i es va quantificar l'emissió de la fluorescència a 525 nm.

Els valors més alts d'eficiència de transfecció (5-10%) es van obtenir en sembrar $1,25 \times 10^6$ cèl·lules i transfectar-les amb 6,26 µg de DNA.

Transfecció de plasmidis

Els plasmidis es van transfectar en cèl·lules C2C12 amb Lipofectamina 2000 (LF2000) (Invitrogen), seguint les instruccions del proveïdor.

En la següent taula s'indica una relació entre el número de cèl·lules, els µg de DNA i el volum de Lipofectamina 2000 emprats en les transfeccions.

Placa	Nº cèl·lules	DNA (µg)	Volum LF2000 (µl)
12 pous	$0,5 \times 10^5$	2,5	4
6 pous	$1,25 \times 10^5$	6,25	10
10 cm	9×10^5	37,5	60

1. INTERACCIONS D'USP25m AMB ALTRES PROTEÏNES

1.1. Triatge d'una genoteca de cDNAs humans de múscul esquelètic mitjançant la tècnica del doble híbrid

El sistema del doble híbrid ens proporciona un mètode molt sensible per a detectar interaccions relativament febles i/o transitòries. A més, com que és un assaig que es realitza *in vivo*, les proteïnes probablement estaran en la seva conformació nativa i, per tant, els resultats obtinguts seran més fiables.

La metodologia del doble híbrid consisteix en un assaig genètic basat en les propietats de diferents factors de transcripció -en aquest cas GAL4 de llevat- que es poden dividir en dues subunitats funcionals independents: el domini d'unió al DNA (GAL4BD, GAL4 *Binding Domain*) i el domini activador de la transcripció (GAL4AD, GAL4 *Activating Domain*). Aquests fragments només poden reconstituir la proteïna sencera funcional si estan fusionats a proteïnes o pèptids amb capacitat d'interaccionar. Els plasmidis que codifiquen per aquestes proteïnes de fusió es transformen en les soques de llevat adients, que porten integrat en el seu genoma un gen seleccionable, ja sigui *HIS3* o *ADE2*, que complementen una auxotrofia, i un gen marcador o *reporter*, *lacZ*, sota el control de les caixes d'unió de GAL4 (UAS).

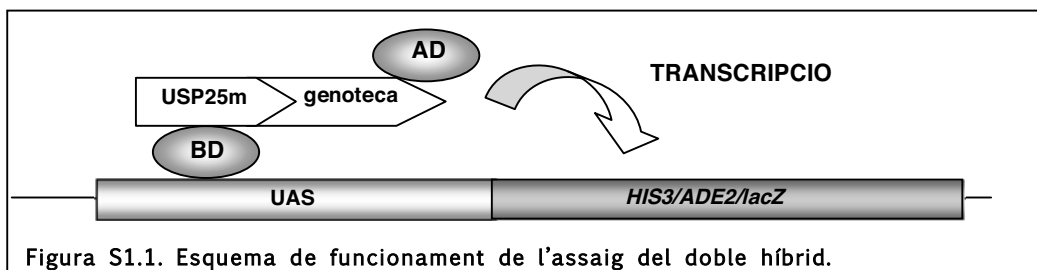
Per tal de realitzar l'experiment vam adquirir una llibreria de cDNAs de múscul esquelètic d'origen humà. Aquesta estava pretransformada en la soca Y187 de *Saccharomyces cerevisiae* (BD Biosciences). Partint d'aquesta genoteca, el procediment que se segueix és lleugerament diferent del sistema tradicional de doble híbrid, en el qual mitjançant cotransformació (o mitjançant una transformació seqüencial), s'introdueixen els dos plasmidis que codifiquen per les proteïnes de fusió a la soca de llevat adient. A partir de les genoteques pretransformades, es realitza un experiment de *mating* (aparellament). En aquest, disposem de dues soques de genotip complementari (Mata i Mata α). Una d'elles -la Y187- és la que està pretransformada amb els plasmidis que contenen la genoteca, i l'altre -la soca AH109- l'hem transformada prèviament amb el vector que codifica per la proteïna que fem servir com a esquer. En realitzar l'aparellament i posar en contacte les dues soques en un medi ric, es formaran organismes diploids que expressaran les dues proteïnes de fusió. Seguidament, els llevats es plaquejen, en medis selectius. En primer lloc es selecciona per la presència dels respectius plasmidis i, en segon lloc, per a la detecció d'interaccions físiques entre les dues proteïnes recombinants.

1.1.1. Construccions que vam utilitzar com a esquer

El nostre objectiu principal consistia en caracteritzar les interaccions d'USP25m. Per aquesta raó vam clonar el cDNA que codifica per aquesta proteïna (des del triplet d'inici fins al d'aturada) en el vector pGBKT7. Per tal d'avaluar la possible especificitat tissular de les interaccions, vam fer una construcció amb el mateix vector, però on només hi vam clonar els exons 19a i 19b (exons específics de la isoforma muscular). D'aquesta manera corriem el risc que els pocs aminoàcids codificats per aquests exons no fossin suficients per adoptar la conformació necessària per a la interacció, però d'altra banda, interaccions trobades amb aquest esquer serien exclusives de teixit muscular i cor, ja que són els únics teixits on es troba el transcrit que els conté.

1.1.2. Aparellament dels llevats

A partir de les dues soques de llevat (AH109 i Y187), transformades amb la proteïna esquer i amb la llibreria de cDNAs, respectivament, vam fer una incubació de 12-16 hores en un medi ric, per tal d'afavorir la formació de diploids. En plaquejar en SD sense Leu, Trp, His, ni Ade, les colònies obtingudes forçosament havien de correspondre a cèl·lules diploids on s'hauria produït la interacció entre l'esquer i un cDNA de la genoteca (**Figura S1.1**).



Es van cribar uns $2,2 \times 10^8$ clons de la genoteca comercial en cada experiment (fent servir com a proteïna esquer USP25m, o bé 19a19b). Els diploids es van incubar en medi selectiu durant un període que oscil·lava entre 7 i 21 dies. Es van obtenir 300 clons positius pel que fa a l'aparellament amb USP25m, i 30 amb només els exons 19a i 19b.

Es van fer reestries dels clons obtinguts, per tal d'agrupar tots els resultats positius, i a partir d'aquí vam realitzar l'assaig X-gal en placa, que mesura la capacitat d'activar el gen marcador lacZ. Aquest mètode ens va permetre descartar 13 clons dels 330 inicials.

1.2. Estratègies emprades per tal d'identificar els clons

a) Classificació segons els patrons de restricció

En un principi, donat l'elevat nombre de clons positius, vam tractar d'evitar obtenir el DNA plasmídic de tots els clons i seqüenciar-los. Per aquest motiu ens vam centrar en els 12 primers positius de cada triatge. A partir d'aquests vam fer *plasmid rescue*, electroporació en *E.coli* i minipreparació de DNA, i vam agrupar els clons en funció de la mida del cDNA i del patró de restricció pels enzims *EcoRI* i *XhoI*.

b) Seqüenciació dels clons

A continuació es van seqüenciar aquests clons i es va identificar el cDNA de cadascun d'ells comparant les seqüències nucleotídiques amb diferents bases de dades mitjançant els programes BLAST i BLAT (vegeu taules S1.1 i S1.2). D'aquesta manera, a l'hora de obtenir la identitat dels cDNAs, ens volíem assegurar que tots els cDNAs aïllats seguien la pauta de lectura oberta determinada per la proteïna de fusió situada a 5'. Es va veure que això no era així, i per tant alguns no corresponien a interaccions funcionals reals. Aquests clons es van considerar falsos positius.

Taula S1.1. Anàlisi preliminar dels 12 primers clons obtinguts amb els exons 19a 19b com a proteïna esquer.

Núm clon	assaig x-gal	Patró de digestió (Kb)	Seqüència	Fals positiu
1	+	0,9	PGM1	
2	+	0,4	MT2A	
3	-	-	-	-
4	+	1,2	Titina (3'UTR)	Sí
5	+	1,2	Titina (3'UTR)	Sí
6	+	0,5	**	
7	+	*	-	
8	+	0,4	Alu	Sí
9	+	1,1	CitCox	Sí
10	+	1,2+0,4	LINE 1	Sí
11	-	-	-	
12	+	1,1	CitCox	Sí

* No s'obtenia un patró de digestió determinat. Probablement corresponia a una barreja de clons.

** La seqüència obtinguda no presentava homologia amb cap seqüència coneguda en comparar-la amb el banc de dades.

Taula S1.2. Anàlisi preliminar dels 11 primers clons obtinguts amb USP25m com a proteïna esquer.

Núm clon	assaig x-gal	Patró de digestió (Kb)	Seqüència	Fals positiu
1	+	0,95	GAPD	
2	+	0,8	MyosinBP	
3	+	1,58	ATPasa Na/K	
4	+	0,85	ATPsintasa 6	Sí
5	+	*	-	
6	+	2	DKFZP434B168	
7	+	1,2	Genoma Mitoc.	Sí
8	+	*	-	
9	+	1,1	Alu	Sí
10	+	0,9+1,2	Myopal·ladina	
11	+	1,1	GAPD	

* No s'obtenia un patró de digestió determinat. Probablement corresponia a una barreja de clons.

c) Hibridacions radioactives

Amb aquests resultats preliminars teníem ja una idea de les possibles proteïnes interaccionants amb USP25m, però ens calia, encara, determinar la resta de clons. Per això, vam decidir realitzar hibridacions radioactives amb sondes construïdes a partir dels clons ja seqüenciats per tal d'agrupar-ne els positius.

Per aquest motiu vam intentar posar a punt les hibridacions sobre colònies de llevat, però no vam aconseguir resultats satisfactoris. El següent pas va ser, doncs, obtenir el DNA plasmídic de llevat i amplificar mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR), l'insert corresponent a la llibreria de cDNAs de múscul. D'un total de 330 clons independents, vam aconseguir fer-ne créixer 250, i d'aquests, uns 220 van poder ser amplificats i transferits a filtres de niló per tal de realitzar les hibridacions. Vam transferir dues rèpliques de filtres, i d'aquesta manera podíem realitzar dues hibridacions simultànies amb sondes diferents.

c.1) Hibridacions amb sondes corresponents a falsos positius

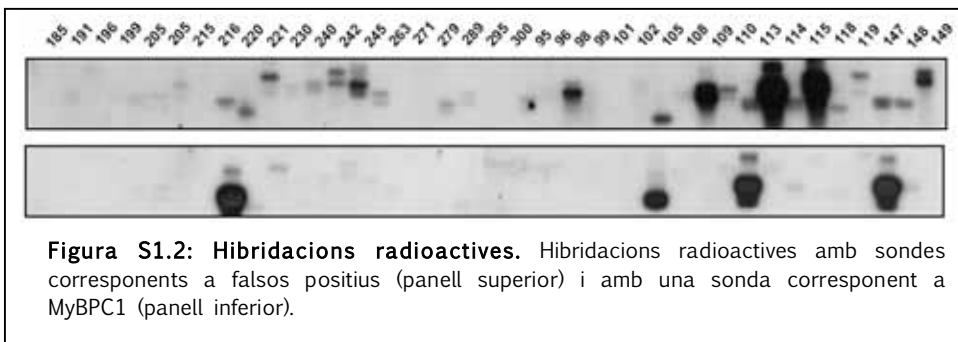
Donat el fet que una proporció significativa dels positius identificats corresponien a falsos positius, el primer que vam fer va ser un marcatge d'una barreja de sondes que corresponien a aquelles seqüències que, bé no estaven en pauta amb el domini d'activació de GAL4, o bé eren no codificants. Els clons que vam fer servir com a sondes van ser: USP25m #2 (Alu), 19a19b #4 (Titina, 3'UTR), 19a19b #8 (Alu), 19a19b #9 (CitCox), i 19a19b #10 (LINE 1).

La hibridació d'aquestes sondes sobre uns filtres que representaven poc més de dos cents clons dels positius que havíem obtingut ens va permetre descartar uns quaranta inserts, que vam catalogar com a falsos positius (**Figura S1.2**). Alguns d'aquests van ser seqüenciats, per tal de confirmar els resultats.

c.2) Hibridacions amb sondes que corresponien a veritables positius

A partir d'altres seqüències obtingudes mitjançant l'anàlisi inicial dels primers clons seqüenciats, vam escollir alguns cDNAs en pauta que semblaven interessants, (bé perquè l'havíem trobat representat diverses vegades, o bé per la funció que desenvolupa la proteïna codificada en la cèl·lula muscular), i els vam marcar radioactivament per tal de realitzar més hibridacions.

Els clons triats van ser Myosin Binding Protein C1 (MyBPC1), Fosfoglucomutasa 1 (PGM1) i Miopal·ladina. D'aquests, tan sols MyBPC1 va donar un resultat prometedor: va hibridar clarament amb 14 clons, que van ser confirmats per seqüenciació (**Figura S1.2**).



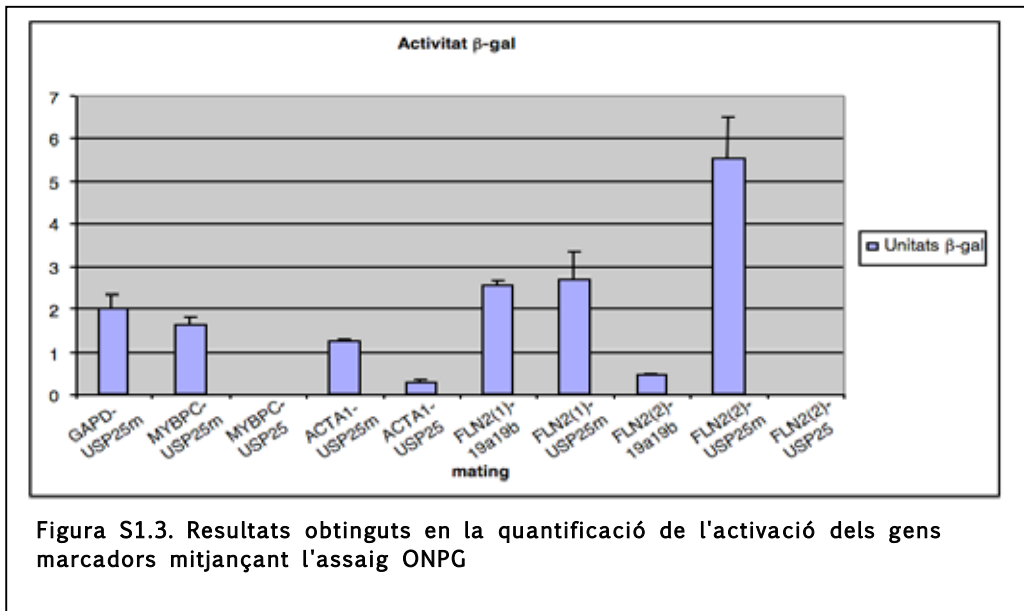
Molts dels clons restants, que no havien donat senyal per cap de les hibridacions van ser seqüenciats. No és sorprenent el fet que ens trobéssim principalment amb proteïnes d'elevada expressió a teixit muscular. Entre elles destaquem un precursor de l'Actina $\alpha 1$ (ACTA1), trobat en 7 ocasions, la Gliceralhid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPD), representada 3 vegades, la Metal·lotioneïna 2A (MT2A), que s'ha trobat en 2 clons i la Filamina 2 (FLN2), repetida en 4 clons.

En la taula S1.3 es mostra una relació dels clons que s'han pogut seqüenciar, que han donat homologia amb seqüències del banc de dades, i que es troben en la pauta de lectura oberta correcta. Aquesta tasca ha estat realitzada conjuntament amb l'estudiant de doctorat Amanda Denuc.

Taula S1.3: Identificació dels clons positius mitjançant seqüenciació

CLON	Resultats del BLAST
19a19b 26	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2
USP25 278	Aldo-keto reductasa family 1, member C2
USP25 231	cDNA clone CS0DE014YJ09 of Placenta
USP25 289	cDNA FLJ16448 fis,clone highly similar to RAC-beta serine/threonine protein kinase
USP25 272	cDNA FLJ16539 fis,clone OCBBF2034529, weakly similar to EPLIN
USP25 54	cDNA FLJ16539 fis,clone OCBBF2034529,weakly similar to EPLIN
USP25 270	Cytochrome c oxidase subunit I
USP25 112	DNA clone RP11-417O11
USP25 83	Filamin 2 (FLN2) mRNA
USP25 86	Genomic DNA, chromosome 11 clone
USP25 261	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
USP25 138	Golgi associated, gamma adaptin ear containing ARF binding protein 2 (GGA2)
USP25 233	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ31625 fis, clone NT2RI2003304
USP25 107	<i>Homo sapiens</i> chromosome 14 open reading frame 108
USP25 116	<i>Homo sapiens</i> chromosome 17, clone RP11-426D19
USP25 264	<i>Homo sapiens</i> mitochondrial DNA, 16S rRNA
USP25 229	<i>Homo sapiens</i> nebulin (NEB), mRNA
USP25 161	<i>Homo sapiens</i> RAD23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
USP25 276	<i>Homo sapiens</i> , clone RP11-159D12
USP25 209	Human leukocyte antigen A
USP25 218	Isolate GA15 mitochondrion, gene="ND1"
USP25 82	LIM domain binding 3, mRNA
USP25 99	Makorin, ring finger protein, 1
USP25 74	Makorin, ring finger protein, 1, mRNA
USP25 296	mRNA similar to NADH dehydrogenase 1 (cDNA clone)
USP25 200	Multiple substrate lipid kinase, mRNA
USP25 290	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex,10
USP25 212	NADH dehydrogenase subunit 1
USP25 254	Phosphoglucomutase 1 (PGM1), mRNA.
USP25 85	Phosphoglucomutase-1
USP25 134	Protein FAM96B
USP25 62	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
USP25 38	RAN binding protein 9, mRNA
USP25 95	Small ubiquitin-related modifier 2 precursor (SUMO2)
USP25 148	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, member 3 (SLC25A3))
USP25 142	Triadin, mRNA
USP25 262	Troponin I, skeletal
USP25 213	Troponin T type 1 (skeletal, slow), mRNA
USP25 44	UTP11-like U3 small nucleolar ribonucleoprotein
USP25 188	Voltage-dependent anion channel 1
USP25 66	Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), mRNA
USP25 241	Zinc finger protein 181

A fi de quantificar les interaccions detectades, vam realitzar l'assaig ONPG, que mesura colorimètricament l'activació del gen marcador LacZ sobre els diploids Y187/AH109. Algunes de les proteïnes (com per exemple ACTA1 i GAPD) tenien preferència per la isoforma USP25m (Figura S1.3).



SS

2. L'EXPRESSIÓ D'USP25m I DE LES SEVES PROTEÏNES INTERACCIONANTS S'ACTIVA PARAL·LELAMENT DURANT LA DIFERENCIACIÓ MUSCULAR

L'assaig del doble híbrid ens va permetre detectar les interaccions d'USP25m amb ACTA1, MyBPC1 i FLNC, que van ser confirmades posteriorment mitjançant tècniques complementàries com ara la coimmunoprecipitació o el *GST-pull down* i la colocalització en cèl·lules o en teixits murins.

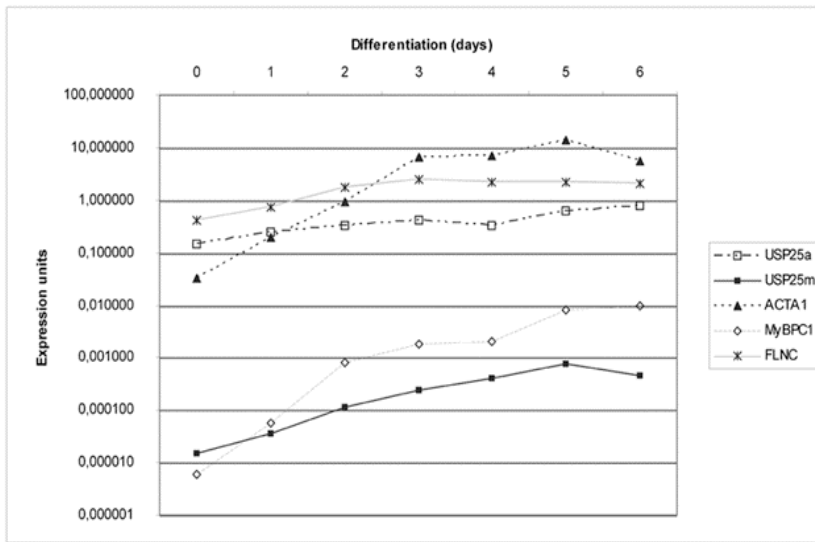
Treballs previs havien demostrat que l'expressió d'ACTA1, MyBPC1 i FLNC estava restringida a teixits musculars diferenciats (Gautel i col., 1998; Thompson i col., 2000; Costa i col., 2004). Per aquest motiu vam decidir investigar si l'expressió d'USP25m i d'aquestes proteïnes amb les quals interaccionava coincidia temporalment al llarg de la diferenciació muscular.

Vam obtenir extractes proteics a partir de cèl·lules C2C12 aturades en diferents punts després de canviar el medi de creixement per medi de diferenciació. Vam detectar els nivells de proteïna mitjançant transferència Western (**Figura S1.4**), però degut a la manca d'anticossos específics que reconeguin MyBPC1 vam haver de recórrer a tècniques de quantificació d'RNA. A partir de cèl·lules aturades en els mateixos punts de diferenciació, vam obtenir RNA i amb PCR quantitativa a temps real vam determinar els nivells d'expressió d'USP25 (USP25a i USP25m), ACTA1, MyBPC1 i FLNC al llarg de la miogènesi (**Figura S1.4A**).

Tal i com s'havia descrit anteriorment, els nivells de proteïna i d'RNA d'ACTA1 i FLNC augmenten pronunciadament durant la diferenciació (van der Ven i col., 2000). Vam detectar també un increment similar dels nivells d'RNA de MyBPC1, amb un pic d'expressió molt acusat al voltant del dia cinc de diferenciació (**Figura S1.4B**). Els nivells d'USP25a, en canvi, es van mostrar elevats i constants al llarg del temps, mentre que els nivells d'RNA d'USP25m eren inicialment molt baixos i incrementaven uns dos ordres de magnitud en arribar al dia sis, coincidint amb la finalització del procés de diferenciació i amb l'expressió màxima de les seves proteïnes interaccionants.

Aquestes dades indiquen la possibilitat d'una coregulació transcripcional d'USP25m i dels seus possibles substrats, alhora que suggereixen una funció per USP25m en el procés de la diferenciació muscular.

A



B

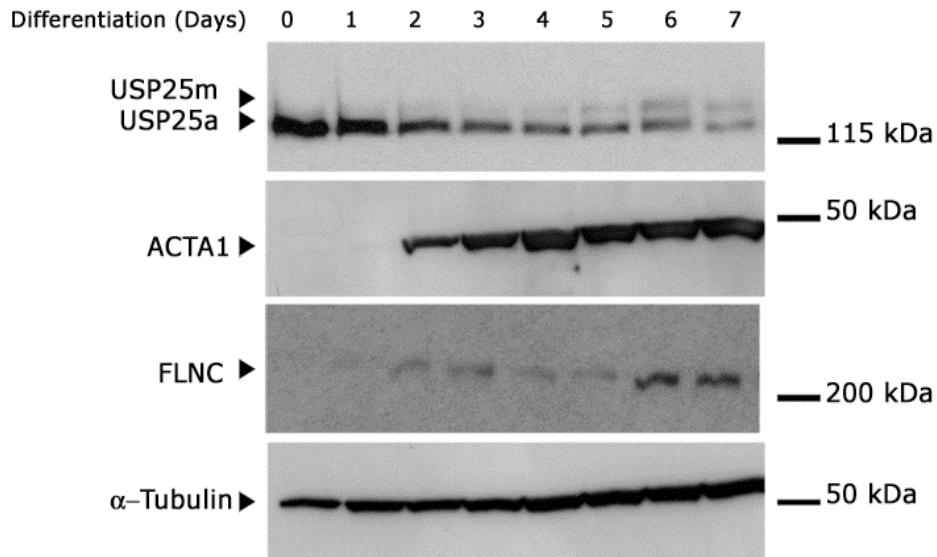


Figura S1.4. L'expressió d'USP25m i de les seves proteïnes interaccionants s'activa durant la diferenciació muscular. (A) Els nivells d'RNA de USP25m, ACTA1, MyBPC1 i FLNC augmenten progressivament al llarg de la diferenciació. (B) Els nivells de proteïna d'USP25m, ACTA1 i FLNC augmenten al llarg de la diferenciació. Els nivells de tubulina s'han fet servir com a control de càrrega.

3. LA INHIBICIÓ D'USP25m MITJANÇANT RNA D'INTERFERÈNCIA DISMINUEIX ELS NIVELLS D'ACTA1

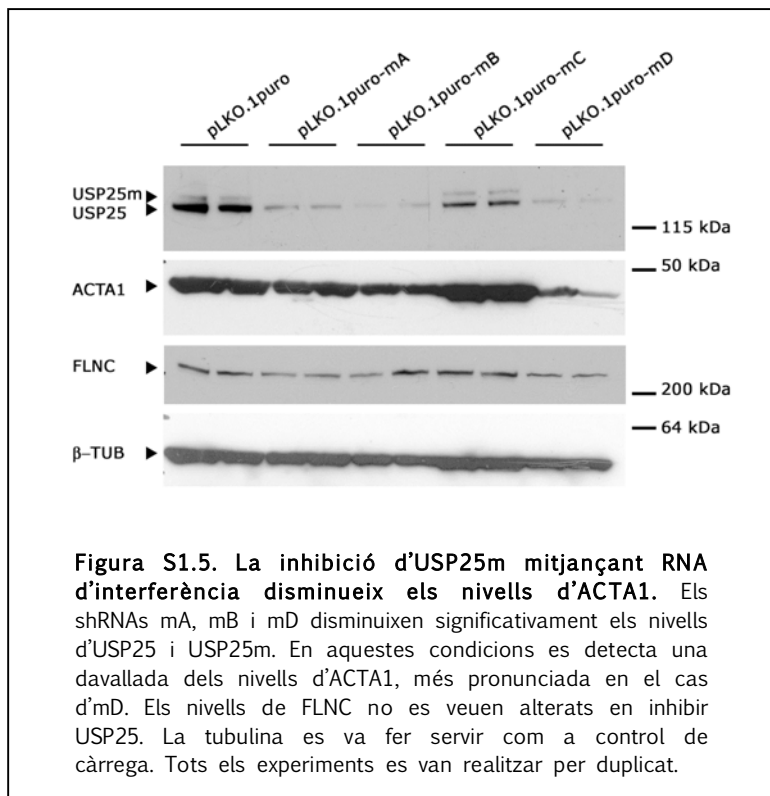
USP25m, pel fet de ser una proteasa específica d'ubiquïtines, pot regular els nivells d'aquelles proteïnes amb les quals interacciona mitjançant deubiquïtinació i rescat de degradació pel proteasoma.

Hem pogut demostrar que MyBPC1 és un substrat proteasomal, i que en sobreexpressar USP25m augmenten els seus nivells equiparablement als obtinguts en cas d'inhibició del proteasoma. Aquests resultats indiquen que molt probablement USP25m deubiquïtina MyBPC1 impedit, per tant, que sigui degradada.

En el cas d'ACTA1 i FLNC l'efecte de la possible deubiquïtinació gràcies a USP25m no és tan clar, ja que aparentment, ACTA1 i FLNC no són degradats pel proteasoma. Tot i això vam creure oportú avaluar els efectes de la inhibició d'USP25m en els nivells d'aquestes proteïnes.

Vam transfectar quatre *short hairpin RNA* (shRNA) diferents, clonats en un vector que permet la selecció mitjançant puromicina, en cèl·lules C2C12. Dues setmanes posttransfecció, durant les quals vam anar mantenint les cèl·lules amb puromicina, vam induir la diferenciació i sis dies més tard vam obtenir extractes proteïcs.

Mitjançant transferència Western vam analitzar els nivells d'ACTA1 i FLNC en relació a USP25m (**Figura S1.5**). Sorprenentment, en aquells casos en que la inhibició d'USP25m havia funcionat de manera satisfactòria, els nivells d'ACTA1 es trobaven disminuïts significativament. Aquest fet indica clarament un efecte d'USP25m sobre ACTA1, tot i que aquest efecte és independent de la degradació mitjançant el proteasoma. Els nivells de FLNC en canvi, no varien, i els nivells de MyBPC1 no van poder ser analitzats degut a la manca d'anticossos.



§§

4. USP25m ES TROBA FORMANT PART DEL SARCÒMER

Els experiments de localització subcel·lular en cèl·lules C2C12 en procés de diferenciació (mitjançant un anticòs policlonal que en transferència Western reconeix totes les isoformes d'USP25) ens van permetre determinar que en mioblasts USP25 és pràcticament indetectable. En miotubs totalment diferenciats, en canvi, USP25 es mostra altament expressat, formant estructures reticulars (**Figura S1.6A**). Ja que mitjançant transferència Western havíem determinat que l'expressió d'USP25m augmentava paulatinament al llarg de la diferenciació, vam assumir que aquesta era la isoforma que detectàvem en la immunohistoquímica.

Les estructures reticulars presents en els miotubs, conjuntament amb la funció d'ACTA1, MyBPC1 i FLNC, van fer pensar en una funció d'USP25m relacionada amb el citoesquelet i/o el sarcòmer. Per aquest motiu vam voler determinar la localització *in vivo* d'USP25m en múscul esquelètic. En realitzar immunolocalitzacions en crioseccions de múscul gastrocnemi (el bessó) de ratolí vam observar una de

distribució estriada, que coincideix amb el patró de proteïnes estructurals del sarcòmer, com ara l'actina (**Figura S1.6B**). Aquest fet reforça la hipòtesis de que USP25m està implicat en el manteniment de l'estructura del sarcòmer.

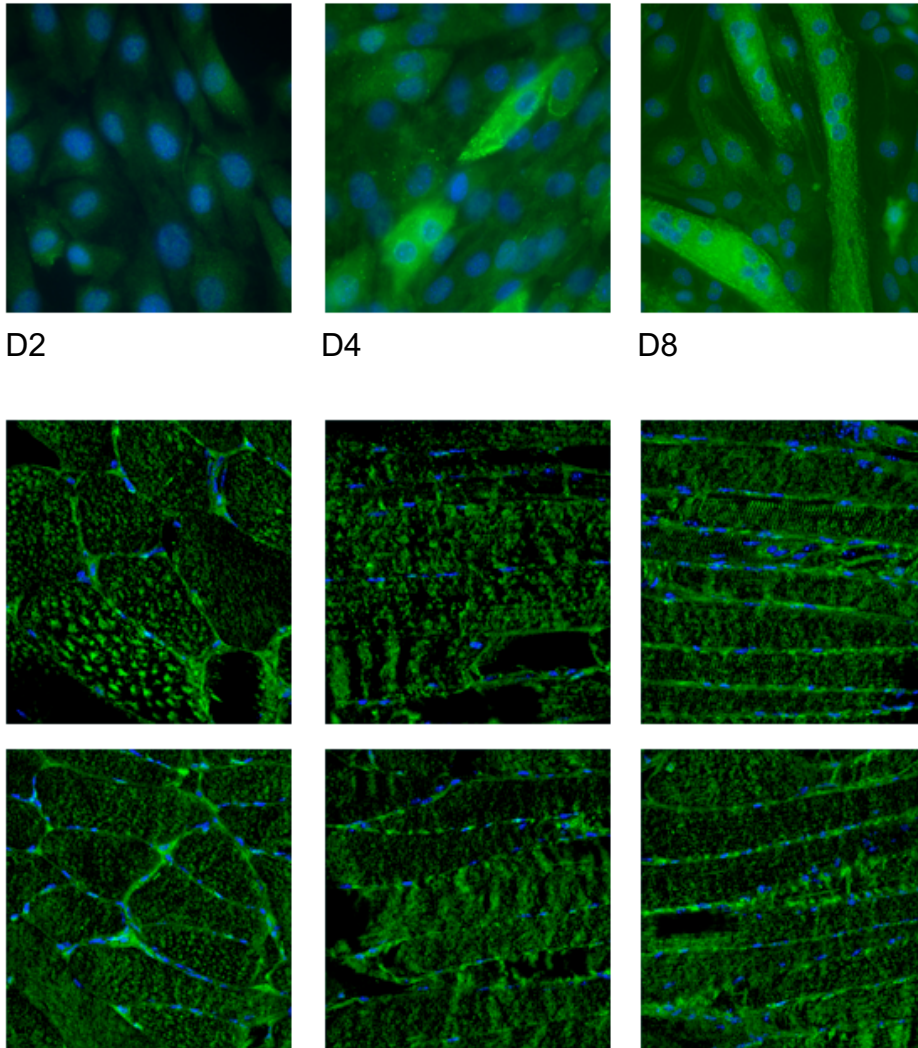


Figura S1.6. USP25m s'expressa al llarg de la diferenciació en cèl·lules C2C12 i localitza al sarcòmer. (A) USP25m es comença a expressar a partir del dia 4 de diferenciació. (B) USP25m presenta una distribució estriada, fet que suggereix que pot formar part de l'estructura del sarcòmer.

RESULTATS CAPÍTOL 2.

PUBLICACIÓ EN PREPARACIÓ:

Domain dissection and post-translational modifications of USP25.

MATERIAL SUPLEMENTARI:

Resultats suplementaris

ARTICLE 2**TÍTOL****Domain dissection and post-translational modifications of USP25****AUTORS (ANY)**

Anna Bosch-Comas, Roser González-Duarte i Gemma Marfany (2006)

RESUM

USP25 és un enzim deubiquitinant que, mitjançant *splicing* alternatiu, genera una isoforma específica de teixit muscular, USP25m, que interacciona amb tres proteïnes sarcomèriques. Cerques *in silico* han desvetllat l'existència de tres dominis d'unió a ubiquitina (UBDs) a l'extrem N-terminal d'USP25: un domini associat a ubiquitina (UBA) i dos motius d'interacció amb ubiquitina (UIM). De manera similar al que succeeix amb la resta de DUBs, no es coneix encara l'aportació individual dels seus dominis en el reconeixement dels substrats i en l'activitat enzimàtica. En aquest treball hem analitzat la contribució dels UBDs d'USP25 en la seva activitat catalítica, el reconeixement de substrats, la localització subcel·lular i les modificacions posttraduccionals, emprant delecions seriades i combinades de l'UBA i els UIM. Els nostres resultats suggereixen que els UBDs d'USP25m no contribueixen a l'activitat enzimàtica ni a la localització subcel·lular, però sí al reconeixement específic del substrat. A més, hem demostrat que USP25m es modifica posttraduccionament mitjançant ubiquitinació, sumoïlació, fosforilació i acetilació, i que la seva sobreexpressió en cèl·lules en cultiu produeix una aturada del cicle cel·lular a la transició entre les fases G1 i S.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

Tots els experiments presentats en aquest treball han estat duts a terme per mi personalment, al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, amb l'excepció de les anàlisis de sumoïlació *in vitro*, que es van realitzar al CIC bioGUNE de Bilbao amb la col·laboració del Dr. Manuel S. Rodríguez.

Domain dissection and post-translational modifications of USP25

A. Bosch-Comas, R. González-Duarte and G. Marfany*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal 645, Barcelona 08028 (Spain), Fax: +34 4034420;

*Corresponding author, e-mail: gmarfany@ub.edu

USP25 is a deubiquitinating enzyme (DUB) that generates a muscle-specific isoform, USP25m, by alternative splicing. USP25m interacts with several sarcomeric proteins, but similarly to most DUBs, the contribution of different protein domains to enzymatic activity and substrate recognition remains to be ascertained. *In silico* analysis revealed the position of the catalytic signatures and predicted three ubiquitin binding domains (UBDs): one ubiquitin-associated domain (UBA) and 2 ubiquitin-interacting motifs (UIMs). By generating serial and combinatorial deletions of these domains, we analyzed their contribution to USP25m catalytic activity, substrate recognition, subcellular localization, and post-translational modifications, such as ubiquitination and sumoylation. Our results indicate that ablation of these motifs do not abrogate USP25 deubiquitinating activity, neither promoted any significant alteration in subcellular localization of the enzyme nor ubiquitin. However, USP25 UBDs contribute to specific substrate recognition, as interaction with each substrate requires a different combination or number of UBDs, in an additive or synergistic manner. USP25m is sumoylated *in vitro* and ubiquitinated, although the UBDs are not required for these post-translational modifications. In addition, USP25m is phosphorylated in Tyr, Ser/Thr residues and acetylated. The physiological relevance of all these modifications remains to be ascertained. USP25 overexpression causes cell cycle arrest, most probably at the G1/S transition.

Keywords: Ubiquitin-specific protease, Ubiquitin binding domain, UBA, UIM, post-translational modification, cell cycle.

INTRODUCTION

Ubiquitination, the covalent modification of a protein substrate by ubiquitin (Ub), has emerged as a major regulatory mechanism in the control of a wide array of cellular processes including, not only protein degradation, but also cell-cycle control, stress response, DNA repair, signal transduction, transcriptional regulation and vesicular traffic (Ciechanover et al., 2000; Aguilar and Wendland, 2003; Fang and Weissman, 2004). Moreover, Ub is now considered a modifier of protein molecular architecture. Thus, more than just a simple tag for sending missfolded proteins to the proteasome, Ub influences protein-protein interactions as well as the protein three-dimensional conformation.

Ub signaling networks are highly intricated and require a tight regulation of conjugation and

deconjugation processes concerning: ubiquitination targets (Wilkinson, 2000), length of ubiquitin oligomer(s) and configuration of Ub-Ub links within the Ub chain. Interestingly, poly-Ub chain formation provides a new layer of complexity: while four or more Ub moieties linked through Ub-Lys48 inexorably send the protein for degradation (Thrower et al., 2000), Lys63 chains regulate tolerance to DNA damage, the inflammatory response, protein trafficking and ribosomal protein synthesis (Pickart and Fushman, 2004). In addition, the attachment of a single Ub moiety to a substrate, monoubiquitination, regulates also assorted events such as enzymatic activity and subcellular localization (Sun and Chen, 2004). Many mechanisms are known about Ub activation and transfer to a substrate (exhaustively revised in (Glickman and Ciechanover, 2002; Pickart and Eddins, 2004)).

However, knowledge on the biochemical mechanisms downstream of ubiquitination, *i.e.* how ubiquitinated proteins are specifically recognized and delivered to their target localization, is still scarce (Hershko et al., 1983; Laney and Hochstrasser, 1999). Nonetheless, recent evidences indicate that subsequent effects of a ubiquitinated substrate are mediated by ubiquitin receptors (revised in (Hicke et al., 2005)).

A ubiquitin receptor is a Ub-binding protein that contains small (20-150 aa) Ub-binding domains (UBDs), which interact with monoubiquitin and/or polyubiquitin chains (Buchberger, 2002; Hicke and Dunn, 2003). The discovery of the first UBD, the ubiquitin associated domain (UBA) (Hofmann and Bucher, 1996), has emerged from the convergence of bioinformatics and experimental data. During the recent years, at least fifteen classes of UBDs, other than the UBA, have been annotated (Hurley et al., 2006) and launched the study of Ub signaling by: i) providing clues on how a ubiquitinated substrate performs its function and, ii) showing that UBD contain proteins interact either with Ub or with a ubiquitinated protein (Hicke et al., 2005). These UBD-Ub interactions are usually weak ($K_d > 100 \mu\text{M}$), and generate a dynamic and versatile protein network that can undergo rapid assembly and disassembly, thus hampering the study of these interactions.

UBDs are also capable of modulating the activity of the host protein, since some of them are known to promote auto-ubiquitination. This process is referred as coupled ubiquitination (Hicke et al., 2005) and its molecular mechanisms are just beginning to be elucidated. The intramolecular interaction between a UBD and a Ub moiety covalently attached to another region of the same protein may provoke a structural change that alters its enzymatic activity. For this event, intermolecular interactions of a given UBD and a ubiquitinated E3 have proven to be crucial (Woelk et al., 2006).

UBDs are not only found in enzymes that recognize and interpret signals from ubiquitinated proteins, but also in those that catalyze ubiquitination or deubiquitination. Enzymes catalyzing hydrolysis of Ub moieties from a given substrate (Deubiquitinating

enzymes, DUBs) play an important role in maintaining the free Ub steady state levels. Their function include processing of newly synthesized Ub, recycling of Ub and/or editing of polyUb chains (Kim et al., 2003; Wilkinson, 2000). Other relevant functions of DUBs concern the stability of Ub-conjugated proteins since, ubiquitination, like phosphorylation, is a reversible process. Hence, DUBs allow the Ub-induced switches to be rapidly reversed and regulated. Notably, the presence of UBDs in DUBs is believed to favour the specific recognition of particular ubiquitinated substrates, while the long extensions at N- and C-terminal of the DUB-conserved catalytic core are probably involved in substrate recognition irrespective of their ubiquitination state (Hicke et al., 2005).

Ubiquitination is just one of the many post-translational modifications that alter protein fate or function. Similarly to ubiquitination, covalent binding of the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) to lysine residues of specific substrates (sumoylation) alters some of their functional parameters such as subcellular localization, protein partnering and transcription factor DNA-binding or transactivation activities (Hay, 2005; Hilgarth et al., 2004).

The substrate and function of most DUBs are still unknown, although data is being gathered from different approaches. This is the case of USP25, which was initially identified while searching for genes on chromosome 21, potentially involved in the Down syndrome (Valero et al., 1999). Of the three USP25 protein isoforms produced by alternative splicing, two are expressed nearly ubiquitously, while the longest (USP25m) is restricted to muscle tissues (Valero et al., 2001) and is upregulated during myogenesis (Bosch-Comas et al., 2006). In an attempt to characterize putative substrates of this tissue-specific isoform, we performed a yeast two-hybrid screen and reported three sarcomeric interacting proteins: MyBPC1, ACTA1 and FLNC. While the effect on the two latter still remains unravelled, biochemical analysis confirmed that MyBPC1 is a naturally short-lived proteasomal substrate and that USP25m is able to prevent its degradation, therefore altering its turnover rate (Bosch-Comas et al., 2006).

Here we sought to further characterize USP25. By *in silico* analysis we identified three potential UBD signatures located at the N-terminal region that may be relevant for substrate recognition. Surprisingly, these domains are not important for USP25 post-translational modifications, including ubiquitination, sumoylation and others. The lately reported role for USP28, a DUB highly homologous to USP25, in DNA damage-induced apoptosis, prompted us to study the role of USP25m on cell cycle regulation. Here we show that overexpression of USP25m caused cell cycle arrest at the G1/S transition through an increase of p21CIP1 in C2C12 cells.

MATERIAL AND METHODS

In silico identification of the UBA and UIM domains

The aminoacidic sequence of USP25m was analyzed using the InterPro database (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) and the Pfam collection of multiple sequence alignments (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>), in order to search for functional domains. Both tools retrieved a UBA domain and two UIM domains at the N-terminus of USP25m.

Generation of expression constructs

The full length catalytically inactive form of USP25m was generated by site directed mutagenesis of the catalytic cysteine 178 to valine using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), according to the manufacturer's procedures.

Expression constructs bearing the full length USP25m already cloned in pGEX-4-T1 (GE Healthcare), pGBKT7 (BD Clontech), pcDNA3 (Invitrogen) and pEGFP-N2 (Clontech), were used to generate by PCR the USP25m deletion mutants (Δ UBA, Δ UIM1, Δ UIM2, Δ UBAUIM1, Δ UBAUIM1UIM2 and Δ UIM1UIM2). In summary, six primers carrying the restriction site *SgfI* were designed in order to amplify all the coding sequence as well as the corresponding vector except the specific UBA or UIM domain/s meant to be deleted. The PCR was performed with Accuprime *Taq*DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) to avoid possible nucleotide changes during the amplification process. The amplified products were digested sequentially

with *DpnI* to eliminate the parental DNA and with *SgfI* to generate compatible ends. The resulting constructs were transformed into *E. coli* DH5 α cells, and subsequently sequenced to verify the integrity of the sequence throughout the entire open reading frame.

Assay for ubiquitin-specific protease activity

The ubiquitin-specific protease activity of USP25m, USP25m- Δ UBA, USP25m- Δ UIM1, USP25m- Δ UIM2, USP25m- Δ UBAUIM1, USP25m- Δ UBAUIM1UIM2 and USP25m- Δ UIM1UIM2 was analyzed as described previously (Valero et al., 2001). Briefly, the corresponding cDNAs cloned in-frame in pGEX-4-T1, downstream the glutathione-S-transferase (GST) gene, and the plasmid pACY184 Cm^r expressing Ub-Met- β -gal (kindly provided by Dr. M. Hoschtrasser) were co-transformed in *E. coli* XL1blue. Colonies resistant to both Amp and Cm were grown and induced for 3 hours with isopropyl- β -thiogalactopyranoside (final concentration 1 mM). Total protein extracts were analyzed by western blotting with anti- β -galactosidase mouse monoclonal antibody (Ab) (Sigma) (diluted 1:1000).

Yeast two-hybrid

The previously isolated cDNA clones corresponding to partial open reading frames of FLNC, ACTA1 and MyBPC1 cloned in pACT2 (Clontech) (Bosch-Comas et al., 2006) were used as bait in a yeast two-hybrid screening to test the interaction specificity with the USP25m constructs lacking one or more Ub binding domains (Δ UBA, Δ UIM1, Δ UIM2, Δ UBAUIM1, Δ UBAUIM1UIM2 and Δ UIM1UIM2).

The pGBKT7 constructs bearing the specific deletions were simultaneously co-transformed in the yeast strain AH109 with the bait pACT2 constructs according to the Yeast Protocols Handbook (BD-Biosciences). Clones growing on selective medium (SD) (-His, -Ade) bearing both plasmids were tested for interaction by plating on SD lacking -His, -Ade, -Leu, -Trp.

In vivo assessment of ubiquitin conjugation

HEK293T cells were plated in 10 cm dishes and transfected the day after with 4 μ g His₆-Ub

(kindly provided by Dr. Timothy Thomson) and 8 μ g of pcDNA-Myc-USP25m or pcDNA-Myc-USP25mC178S either in their full length version or in their deleted forms (Δ UBA, Δ UIM1, Δ UIM2, Δ UBAUIM1, Δ UBAUIM1UIM2 and Δ UIM1UIM2) with Lipofectamine 2000. Forty-eight hours post-transfection cells were washed with PBS and resuspended in 600 μ l of denaturing lysis buffer (50 mM sodium-phosphate buffer, pH8.0, 8 M urea, 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) and stored at -80°C. Cells were centrifuged for 30 min at 13,000 rpm to remove debris, and the supernatants were transferred to new tubes.

Cell lysates loaded onto 8% SDS-PAGE gels and analyzed by Western blotting with an anti-cMyc monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:1000).

***In vitro* SUMO-1 and SUMO-2 conjugation assays**

³⁵S-Met-labeled *in vitro* transcribed/translated (TNT T7 Coupled Wheat Germ Extract Systems, Cat. No. L4140 PROMEGA) full length USP25m and deletion constructs (2 μ l) were incubated in a 10 μ l reaction including an ATP regenerating system (50 mM Tris [pH 7.6], 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 3.5 U/ml of creatine kinase, and 0.6 U/ml of inorganic pyrophosphatase), SUMO-1 or SUMO-2 (1 μ g), Ubc9 (0,325 μ g) and purified SAE1/2 (0,08 μ g) (Biomol Cat. No. UW9330). Reactions were incubated at 30°C for 2 hours. After terminating the reactions with SDS sample buffer containing mercaptoethanol, the reaction products were separated by electrophoresis onto 8.5% SDS-PAGE and the dried gels were analyzed by autoradiography. SUMO-1, SUMO-2 and Ubc9 were kindly provided by Dr. M. Rodriguez.

Phosphorylation and acetylation assays

HEK293T cells were plated in 10 cm dishes and transfected the day after with 6 μ g of pcDNA-Myc-USP25m or pcDNA-Myc-USP25m C178S with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours post-transfection cells were washed with PBS, resuspended in 1 ml of binding buffer (20mM HEPES [pH7.9], 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol 2 mM DTT, 10 mM

NaF, 20 mM b-glycerophosphate, 0.05% NP-40, and protease inhibitor cocktail), and sonicated. Following removal of cellular debris by centrifugation, cell lysates were incubated with 2 μ g of anti c-Myc antibody (Santa Cruz Biotechnology) during 4 hours at 4°C with gentle agitation. The protein-antibody complexes were removed by 1 hour incubation with protein G-Sepharose beads (GE-Healthcare) at 4°C on a rotating mixer. The bound proteins were washed three times with ice-cold immunoprecipitation buffer, eluted from the beads by boiling with protein loading buffer, resolved by electrophoresis on 8% SDS-PAGE and analyzed by Western blot analysis. We used anti-phospho Ser polyclonal Ab (Sd7, Cell Signaling) (1:200) and anti-phospho Tyr mAb (PY20, Cell Signaling) (1:1000) for USP25m phosphorylation and anti-acetylated Lys (Cell Signaling) (1:1000) for USP25m acetylation. Monoclonal antibodies recognizing phosphorylated AKT (Cell Signaling) (1:1000) or acetylated p53 (Cell Signaling) (1:1000) were used as controls.

Purification of GFP-positive cells using flow cytometry

C2C12 cells were seeded on 10 cm dishes and after 12 hours, cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) using 24 μ g DNA per well of pEGFP-USP25m either in its full length version or deleted forms (Δ UBA, Δ UIM1, Δ UIM2, Δ UBAUIM1, Δ UBAUIM1UIM2 and Δ UIM1UIM2). Thirty hours post-transfection, cells were rinsed with PBS, trypsinized, diluted in PBS, spun down and resuspended in PBS. GFP-positive cells were sorted and purified using a MoFlo (Modular Flow) cell sorter (Dako Diagnostics).

Immunofluorescence

COS-7 cells grown on glass coverslips placed in 24-well plates were transiently co-transfected with pcDNA-HA-Ubiquitin (kindly provided by Dr. Maria Masucci) and pcDNA-Myc-USP25m or pcDNA-Myc-USP25mC178S either in their full length version or in their deleted forms (Δ UBA, Δ UIM1, Δ UIM2, Δ UBAUIM1, Δ UBAUIM1UIM2 and Δ UIM1UIM2) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to

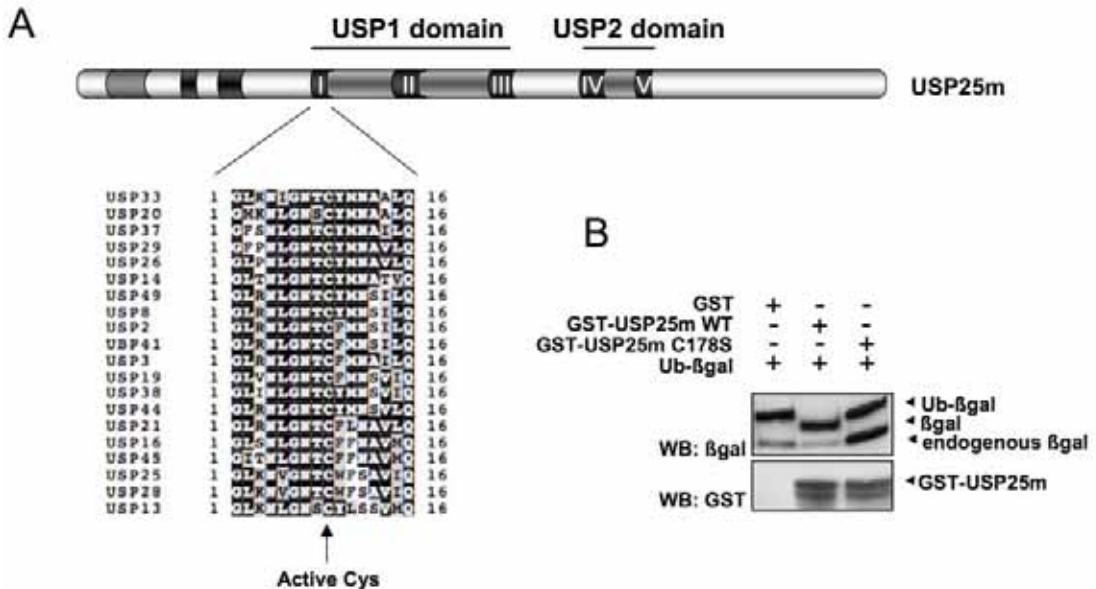


Figure 1. A) USP25m domain organization. Sequence homology analysis reveals five highly conserved USP motifs (I to V), constituting two domains (USP1 and USP2) that catalogue USP25m as a deubiquitinating enzyme. USP25m Cys-178 is the putative active site of the enzyme, since it appears conserved in all analyzed members of the family. **B) Cys-178 is the active site of USP25m.** Deubiquitinating activity assays were performed in BL21 *E.coli* cells co-transformed with the artificial substrate Ub-βgalactosidase and either wild type (WT) USP25m or the C178S mutant. Western blot against βgal shows a lower band using WT USP25m indicating hydrolysis of Ub from βgal (2nd lane), while the mutated form displays an upper band (3rd lane), similar to that with co-transformed GST (1st lane), which corresponds to the fusion Ub-βgal. Note that the endogenous βgal is of lower molecular weight.

the manufacturer's instructions. When required, proteasome inhibitor MG132 (10 μM) (Biomol) was added to the medium during the last 16 hours of culture.

Forty-eight hours post transfection, cells were washed in ice-cold PBS, fixed for 20 min with freshly prepared 4% formaldehyde and blocked in 2% goat serum 1 hour at room temperature.

Samples were immunodetected with mouse monoclonal anti-Ub antibody and rabbit polyclonal anti-USP25 were diluted 1:200 in 0,05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.25% Gelatin and 0.5% Triton-X-100 overnight at 4°C. Cells were then rinsed three times with PBS and incubated with AlexaFluor 488-conjugated anti-mouse IgG and AlexaFluor 660-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Invitrogen) secondary antibodies (all diluted 1:300 in the same solution than the primary antibodies) for 1 hour at room temperature. Cells were rinsed 5 times in PBS and the coverslips were mounted using Vectashield with Dapi (Vector

Laboratories, Inc.). Fluorescence microscopy was performed with a Leica DMIL.

RESULTS

USP25m catalytic activity

USP25 is a member of the large family of deubiquitinating enzymes (DUBs), translated into three protein isoforms in humans. The two shortest isoforms show a widespread distribution, whereas the longest is primarily expressed in muscle tissues (USP25m) (Valero et al., 2001).

Previous work based on sequence alignments revealed five highly conserved distinct motifs (I to V) embedded in two domains (USP1 and USP2), which characterize the family of the ubiquitin specific proteases (UBPs, USPs in humans) (Valero et al., 1999). The conserved catalytic triad (Cys, Asp and His) (Papa and Hochstrasser, 1993) was located at the I, II and IV motifs, respectively (Figure1A). The three residues are critical for activity: Asp polarizes

His, which in turn deprotonates the active Cys. Indeed, motif I of USP25m harbors the assumed key residue, Cys-178, for DUB activity.

Indeed, evidence of Cys-178 direct role in USP25m DUB activity was obtained by mutagenesis of this residue to Ser (C178S mutant). A deubiquitinating activity assay for USP25m was used to verify this hypothesis. USP25m and Ub- β -Galactosidase co-transformation in BL21 cells rapidly induced the proteolysis of the fusion between Ub and β -Gal (Figure 1B, lane 2 and (Valero et al., 2001)). This proteolytic activity was not observed with the C178S mutant (Figure 1B, lane 3), thus showing that Cys-178 is essential for the deubiquitinating activity of USP25m.

USP25m structural analysis

To further analyze the USP25m regulatory mechanisms we searched its putative regulatory domains. *In silico* homology searches across

several motif databases revealed three stretches of aminoacids at the N-terminal region of USP25m that contained one UBA and two UIM signatures (Figure 2A, 2B first diagram). These domains are known to interact with ubiquitinated proteins, (revised in (Hicke et al., 2005)) although they seem not to be required for catalytic activity. In addition, UIM domains have been proposed to be necessary and sufficient for ubiquitination (Polo et al., 2002). When this occurs, the protein is ubiquitinated at the N-terminal end of the UIM(s) domain, not at other internal sites. All these findings led us to hypothesize a putative regulatory mechanism of USP25m function by these conserved motifs.

To verify that UBA and UIM domains contribute to USP25m activity but are not involved in deubiquitination, we co-expressed GST epitope-tagged deletion mutants of USP25m lacking one or several of the UBDs (Figure 2B) with Ub- β -Gal in *E. coli* BL21

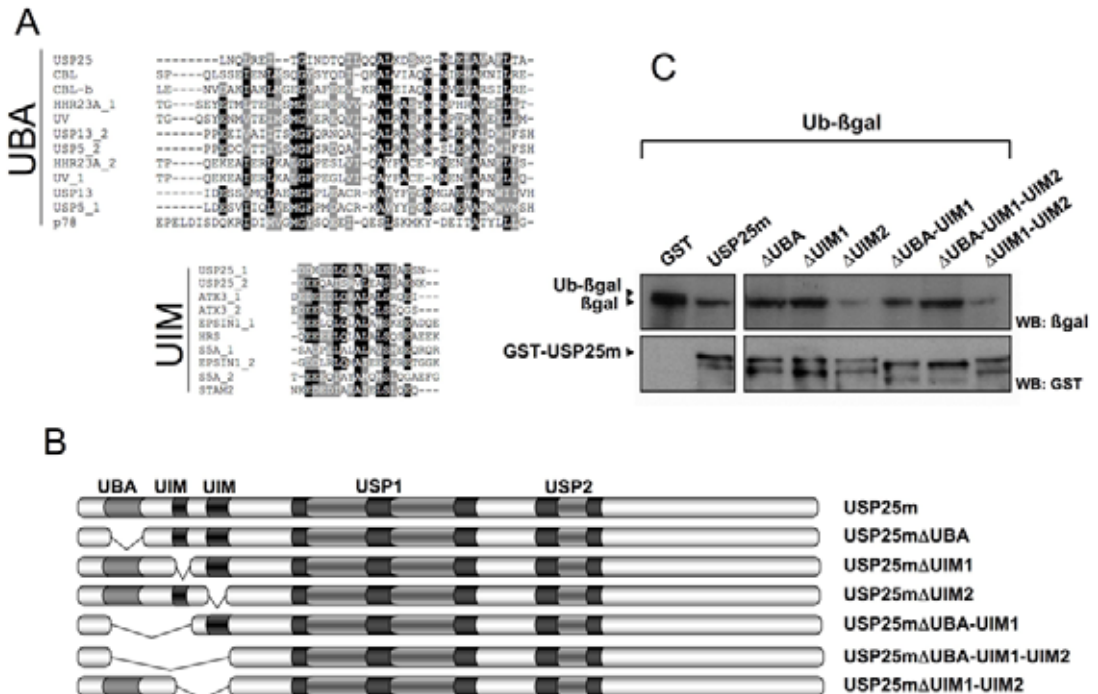


Figure 2. A) USP25m has one UBA and two UIM domains. USP25m UBA and UIMs (USP25_1, USP25_2) alignments with other known UBAs (upper panel) or UIMs (lower panel) show the conserved amino acids that define these motifs. B) USP25m deletion mutants. Schematic representation of the USP25m mutants in which one or several UBDs have been deleted. These mutants were cloned in pGEX-4T, pGBK-T7, pcDNA3.1 and pEGFP-N2 vectors. C) USP25m UBDs are not required for its enzymatic activity. Deubiquitinating activity assays using co-transformed Ub- β gal and the USP25m deletion constructs indicate that all the mutant isoforms are able to hydrolyze Ub from Ub- β gal. Co-transformed GST is used as a negative control, full length USP25m is used as a positive control.

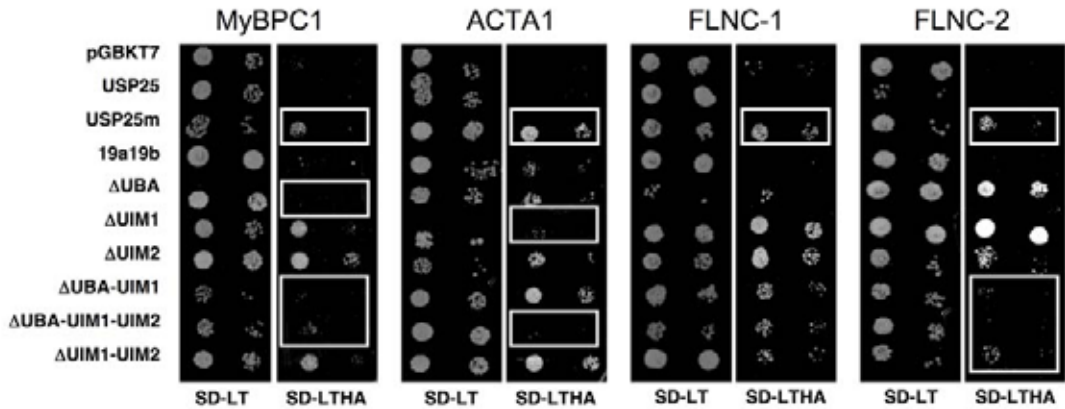


Figure 3. USP25m UBDs are required for protein-protein interactions. Targeted yeast two-hybrid assay with the USP25m deletion mutants and MyBPC1, ACTA1 and FLNC, respectively. Two different regions of FLNC were used: FLNC-1 and FLNC-2. Growth in SD lacking Leu and Trp is indicative of positive co-transformation. Growth in SD lacking Leu, Trp, His and Ade is indicative of positive interaction. Full length USP25m interacts with MyBPC1, ACTA1, FLNC-1 and FLNC-2 (3rd row). Empty vector pGBK-T7 or USP25 do not show any positive interaction.

(Figure 2C, lower panel). Under these conditions, the deubiquitinating activity-assay clearly showed that deletion of UIM1, UIM2 and UBA domains, alone or in combination, did not abolish neither diminish the USP25m DUB-activity compared to the wild type enzyme (Figure 2C). The pGEX-4T empty vector, coding for GST alone, was included as a control (Figure 2C).

USP25m substrate recognition

In physiological conditions, USP25 is a deubiquitinating enzyme that specifically recognizes and binds its substrates. We had previously reported that the longer isoform, USP25m, formed complexes with MyBPC1, ACTA1 and FLNC, three muscle-specific proteins relevant to sarcomeric function (Bosch-Comas et al., 2006).

Given the reported relevance of UBDs in the regulation of protein folding and modular domain interactions, we were prompted to test whether the UBA and UIM domains (located at the N-terminus of USP25m) were required for binding to its known substrates. To this end, we tested the previous deletion constructs to verify the UBA- and UIM-independent deubiquitinating activity of USP25, in a targeted yeast two-hybrid assay using as preys MyBPC1, ACTA1 and FLNC. Since in the original screen we had identified several positive clones coding for two different regions of FLNC, we now used as

partners cDNAs of both FLNC terminal segments (FLNC-1, FLNC-2).

The positive clones obtained on selective medium SD lacking leucine, tryptophan, histidine and adenine clearly showed that the UBD domains were indeed required for proper recognition and/or binding. Interestingly, the region responsible for these interactions differed among the tested partners (Figure 3). Colonies co-transformed with the full length USP25m construct and MyBPC1, ACTA1, FLNC-1 or FLNC-2 were used as positive interaction controls of the USP25m deletion mutants (Figure 3, all panels, 3rd row). The UBA domain of USP25m was required to interact with MyBPC1, since yeast colonies bearing any of the deletion constructs lacking this domain were unable to grow in selective medium (Fig 3, 1st panel, rows 5, 8 and 9).

The interaction of USP25m with ACTA1 was dependent on the presence of at least one of the Ub binding domains, as the only co-transformant unable to grow in selective medium lacked all the UBA and the UIM domains (Figure 3, 2nd panel, row 9). This observation suggested cooperation between the three USP25m UBDs in order to interact with ACTA1. Moreover, the reduced growth in the absence of UIM1 alone (Figure 3, 2nd panel, 6th row) pointed to a major effect of this domain in ACTA1 recognition. Nevertheless, this assumption needs to be further studied as the

co-transformants lacking the UIM1 and also the UBA or the UIM2 motifs did not show any anomalous growth (Figure 3, 2nd panel, 8th and 10th row).

Co-transformations of the USP25m deletion mutants with the N-terminal part of FLNC (construct FLNC-1) showed that none of the UBDs play a major role in their interaction (Figure 3, 3rd panel). However, our results indicated that the FLNC C-terminal portion required two or more UBDs for the interaction, suggesting a synergistic or cooperative task of these domains in the recognition of this protein segment (Figure 3, 4th panel).

Noteworthy, all the interactions were restricted to the USP25-muscle isoform (including the in-frame insertion of exons 19a-19b). It is important to remark that USP25, which also contains the UBA and UIM domains, did not interact with ACTA1, MyBPC1 nor FLNC. Only ACTA1 was able to interact with the construct bearing exons 19a and 19b, suggesting a role for this additional peptide in specific substrate recognition.

These results indicated an intricate USP25m deubiquitination targetted recognition process, where different combinations of UBDs and specific exons are required for each substrate.

USP25m is ubiquitinated and autodeubiquitinated

Mono- and poly-ubiquitination have been widely reported to regulate enzyme function (revised in (Sun and Chen, 2004)). We investigated the USP25m ubiquitination status in 293T cells that ectopically expressed His(6x)-Ubiquitin and Myc-tagged USP25m. Western blot analysis of Myc-tagged USP25m showed an additional higher molecular weight-band, right above USP25m (Figure 4A, arrow in upper right panel, first lane). This band was undetectable in lysates of cells that did not over-express Ub, although it could be present at very low amounts. We concluded that probably a small fraction of USP25m was ubiquitinated under our experimental conditions. Unexpectedly, the expression of the catalytically inactive form of USP25m produced a much more evident high molecular weight-band (Figure 4A, upper right panel, 2nd lane). Both results, together, suggested that USP25m was ubiquitinated and responsible for its autodeubiquitination.

In the light of these data, combined with previous works linking UIM domains and self-ubiquitination (Miller et al., 2004; Polo et al., 2002), we wondered whether the N-terminal USP25m UBDs were linked to this phenomenon (named coupled ubiquitination), and if they could operate as modulators of the physiological role of the enzyme. To that end, we assayed the deletion constructs previously reported (Figure 2B) cloned in the eukaryotic expression vector pcDNA3.1.

We repeated the above reported experiments of Myc-USP25m and His(6x)-Ub over-expression. Surprisingly, the lack of any UIM and UBA domain or their combination did not prevent USP25m ubiquitination. Indeed, this effect was more obvious when catalytically inactive forms of the deletion constructs were used (figure 3, lower panel). Taken together, these results strongly suggest that USP25m is ubiquitinated and can undergo autodeubiquitination, and indicate that UIM1, UIM2 and UBA domains, alone or in combination, are not required for this process.

Other USP25m post-translational modifications

Sumoylation, phosphorylation and acetylation are other post-translational modifications known to regulate protein activity. Despite the fact that sumoylation was first proposed to target proteins to the nuclear pore complex (Matunis et al., 1996), it has been later shown to play an important role in subcellular localization, protein partnering or transcription factor activity (Hay, 2005; Hilgarth et al., 2004). *In silico* sequence analysis of USP25m predicted 5 putative sumoylation sites. However, online tools to determine sumoylation sites often render false positives. Therefore, we used an *in vitro* sumoylation assay to better characterize this post-translational modification in USP25m. We determined that USP25m was *in vitro* sumoylated by incorporating SUMO-1 and SUMO-2, apparently not displaying a marked preference for any of the SUMO isoforms. Despite only one of the predicted sumoylation sites was included in the region spanning the UBDs, and considering that these sites are generally found at the C-terminal portions of the proteins, we performed a series

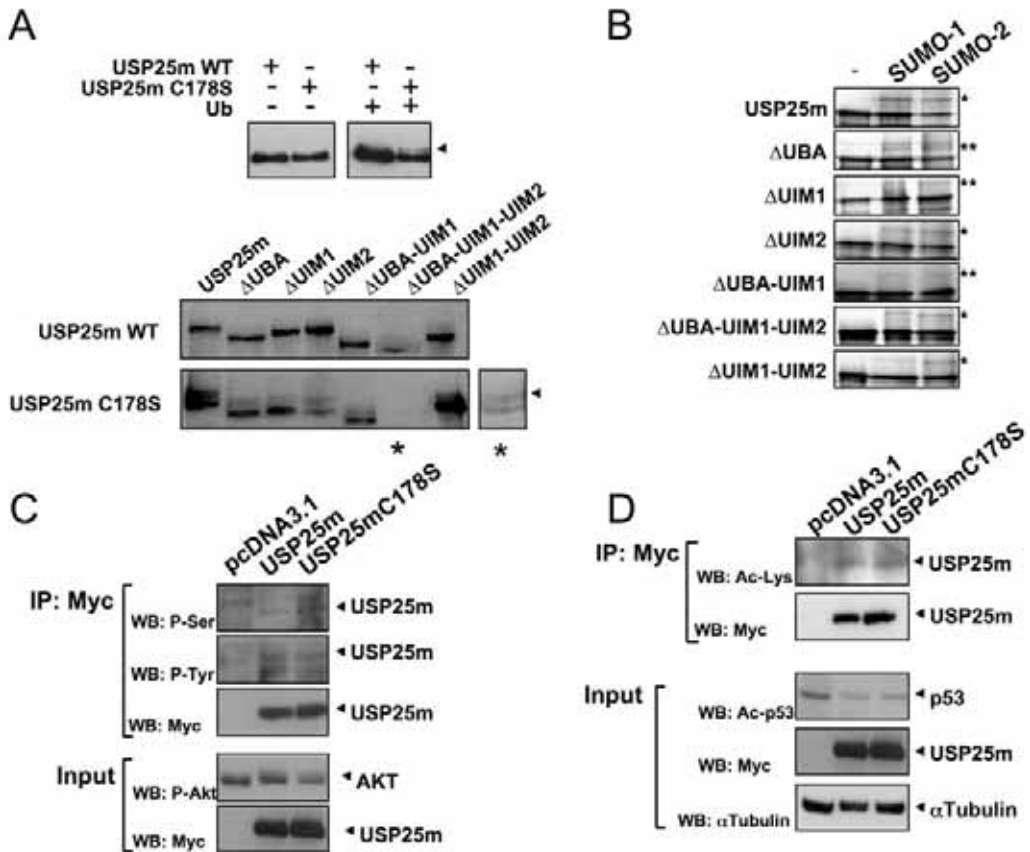


Figure 4. USP25 post-translational modifications. A) **USP25m is ubiquitinated and autodeubiquitinated.** Western blot detection with a Myc antibody in cell lysates co-expressing His(6x)-Ub and Myc-tagged USP25m show the appearance of a faint extra high molecular weight band corresponding to ubiquitinated USP25m. This extra band is stronger when co-expressing His(6x)-Ub and USP25mC178S (upper right panel), and absent when His(6x)-Ub is not co-expressed (upper left panel). The same experiment was performed with all the USP25m deletion mutants and co-expressed His(6x)-Ub. Again, the ubiquitinated band is stronger in the USP25mC178S version of the mutants. Detection of USP25mC178S ΔUBA-UIM1-UIM2 was only possible after longer exposure (right lower panel, marked with *). B) **USP25m is sumoylated.** USP25m and all the deletion mutants display an extra upper-band (marked with *) after *in vitro* sumoylation assays with SUMO-1 (middle lanes) and SUMO-2 (right lanes). In the case of USP25m lacking UBA, UIM1 or both UBA and UIM1, the band corresponding to SUMO-USP25m is weaker (marked with **). C) **USP25m is phosphorylated.** Myc-tagged USP25m and USP25mC178S were immunoprecipitated with Myc antibodies and detected in Western blots with pan-anti-Phospho-Ser and pan-anti-phospho-Tyr. Bands appearing at the size corresponding to USP25m indicate that USP25m is phosphorylated both in serine(s) and threonine(s) (1st and 2nd panel, middle lane). This band also appears when expressing USP25mC178S, indicating that USP25m phosphorylation occurs irrespectively of its catalytic activity (1st and 2nd panel, right lane). Membranes were stripped and detected with a Myc antibody to confirm that the band corresponded to USP25m (3rd panel). Immunoprecipitation inputs were assessed with antibodies against phosphorylated AKT and Myc as phosphorylation and transfection controls respectively (4th and 5th panels). D) **USP25m is acetylated.** Myc-tagged USP25m and USP25mC178S were immunoprecipitated with Myc antibodies and detected in Western blots with pan-anti-acetylated-Lys. Bands appearing at the USP25m size indicate it is acetylated, both WT and C178S (upper panel). The same membrane was stripped and detected with anti-Myc to confirm the identity of the bands (2nd panel). Immunoprecipitation inputs were assessed with antibodies against acetylated p53, Myc and αTubulin as acetylation, transfection and loading controls respectively (3rd, 4th and 5th panels).

of *in vitro* sumoylation assays using all USP25m deletion constructs (figure 2B). All deletion constructs promoted sumoylation of USP25m by

SUMO-1 and SUMO-2, but interestingly, the lack of UBA or UIM1 domains or their combined absence prevented, to some extent,

USP25m sumoylation (Figure 3B). However, the absence of all three domains rescued USP25m sumoylation (Figure 3B), pointing to an inhibitory role of UIM2 in USP25m sumoylation in the context of a deleted construct. Taken together, these results indicate that sumoylation does not occur in any putative site contained within these domains. Moreover, these domains are not necessary for USP25m sumoylation. Nonetheless, UBA, UIM1 and UIM2 domains contribution to USP25m sumoylation could be ruled out.

Phosphorylation is a post-translational modification well known to regulate protein activity or function of many enzymes related to ubiquitin signaling. Among them, phosphorylation of CYLD, a DUB family member, switches off its deubiquitinating activity consequently permitting the proteasomal degradation of its substrates (Reiley et al., 2005). We then intended to determine whether USP25m was phosphorylated. We immunoprecipitated Myc-tagged USP25m from HEK-293T cell extracts over-expressing this fusion protein and detected the presence of phosphorylated forms by means of pan-antibodies against phosphorylated serine or threonine. We could detect phosphorylated USP25m in both cases, and this chemical modification was not dependent on USP25m catalytic activity, as it was also present when we over-expressed the catalytically inactive form (Figure 4C, upper panels). Phosphorylated AKT levels were used as both loading and kinase activity controls (Figure 4C, lower panel).

Once we demonstrated that USP25m was ubiquitinated, sumoylated and phosphorylated, we also addressed the point whether it was acetylated when over-expressed in HEK-293T cells. Using an antibody against acetylated lysine on immunoprecipitated Myc-USP25m we detected the presence of a band corresponding to the size of the expressed fusion protein, suggesting that USP25m was indeed also acetylated. Again, this post-translational modification was not dependent on its deubiquitinating activity, since the acetylated form was also detected with the C178S mutant (Figure 4D, upper panels). The presence of acetylated forms of p53 was used as a control (Figure 4D, lower panel).

USP25m arrests the cell cycle at the G1/S transition

We had previously reported the role of USP25m in the stabilization of the sarcomeric protein MyBPC1 (Bosch-Comas et al., 2006), but other possible contributions on cell function had remain unknown. A recent report demonstrating a role for the highly related enzyme, USP28, in DNA damage induced apoptosis (Zhang et al., 2006) encouraged us to test any putative role of USP25 on the regulation of cell proliferation in muscle cells. When monitoring the length of the different cell cycle phases by propidium iodide incorporation in C2C12 cells, we detected a slight increase on the G1 phase and a minor decrease of G2 when we over-expressed USP25m (data not shown). We assumed that the minor USP25m effect could be due to the low transfection efficiency achieved in this muscle cell line (8-10%) and decided to pursue further this potential effect on cell cycle. Therefore, we enriched the sample by cell sorting GFP-USP25m transfected cells by means of flow cytometry. Interestingly, when we performed a Western Blot against p21CIP1, a known marker of the G1 phase arrest, we detected that it was strongly induced by the expression of USP25m. This reinforced the primary observation concerning the extended G1 phase after over-expressing USP25m, and confirmed that the initial mixed population of transfected and non-transfected cells was masking the resulting phenotype.

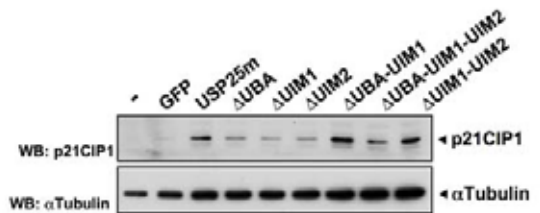


Figure 5. USP25m causes cell cycle arrest at G1 phase. Sorted C2C12 cells expressing GFP fusion proteins with USP25m, either full length or deletion mutants, display p21CIP1 expression, accounting for G1 phase cell cycle arrest. p21CIP1 is not detectable in non-transfected or in GFP-transfected C2C12 cells (1st and 2nd lanes).

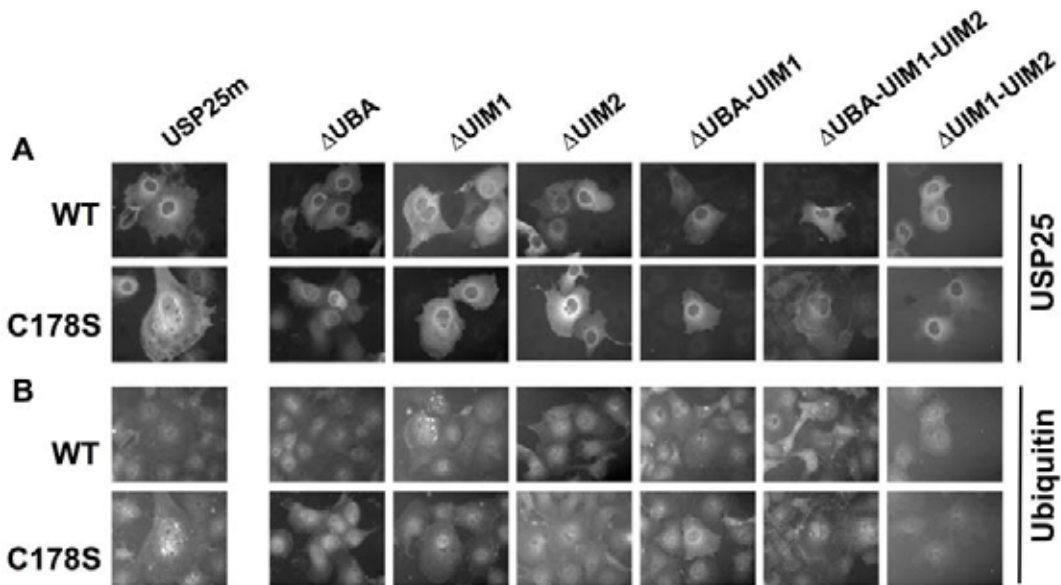


Figure 6. UBDs do not alter USP25m subcellular localization. USP25m localization was monitored by immunohistochemistry using a polyclonal antibody against USP25. Localization of full length USP25m and deletion mutants is predominantly cytosolic, with certain accumulation in the perinuclear region. Transfection of full length USP25m, or the deletion mutants, does not affect distribution of Ub, as assessed by immunodetection with an anti Ub antibody.

The UBA and UIM domains in USP25m do not alter its subcellular localization

Our experimental evidences pointed to an interacting role of the UBDs present in USP25m, although a putative effect on modulating subcellular localization had not been assessed. To this end, we transfected USP25m and its UBD deleted forms, either catalytically active or inactive, in COS-7 cells, and performed immunohistochemistry using a polyclonal antibody against USP25. We did not detect any change in the distribution pattern of the protein under any condition (Figure 6A), indicating that the UBA and UIM domains were not required for targeting USP25 to its localization. We also monitored Ub distribution on the same cells (Figure 6B) and discarded a possible effect on the accumulation of ubiquitinated proteins, as described for other USPs (Berke et al., 2005).

DISCUSSION

One of the main strategies to unravel the physiological function of a particular enzyme is based on domain dissection. As DUBs are the less known members of the UPS, we intended to

gather some information on USP25 function using this approach. *In silico* analysis located the catalytic domains (which classified USP25 as a deubiquitinating enzyme) and revealed three putative ubiquitin binding motifs at the N-terminus. We then aimed to experimentally confirm the relevance of these presumptive functional sequences. First, we tested whether USP25 was a ubiquitin cysteine-protease by mutating the predicted catalytic cysteine residue. As expected, the C178S mutation rendered the enzyme catalytically inactive. In generating this point mutation, we also obtained a negative control to be used in functional analyses concerning USP25 enzymatic activity. The existence of many UBDs, which may display subtle differences in the interaction with ubiquitinated substrates, provides a rationale for the multiple roles of the ubiquitin tag in cellular processes (Hicke et al., 2005). This is further supported by the frequent clustering of several UBDs within the same protein, allowing a dynamic interplay of enzymatic activity regulation, substrate affinity, dimerization or protein recruitment. UBDs bind ubiquitin in a non-covalent manner, as shown by using

isolated domains (Davies et al., 2004; Polo et al., 2002). Much less is known on the contribution of UBDs to protein activity. By generating serial and combinatorial deletions, we decided to explore the contribution of the 3 detected ubiquitin binding domains to the USP25 deubiquitinating activity on a recombinant substrate *in vitro*. Our results showed that all deletion mutants were enzymatically active, as they were able to cleave the ubiquitin moiety from the Ub- β -gal substrate in *E. coli*. We concluded that these domains were neither required for ubiquitin recognition, nor for the deubiquitinating activity.

UBDs are protein-protein interaction motifs, and as such, can promote shifts in subcellular localization as well as intervene in their cognate substrate recognition (Di Fiore et al., 2003; Polo et al., 2003). Since UBA and UIM domains are known to bind mono- and polyubiquitin chains, we considered studying the distribution pattern of USP25 and ubiquitin. No significant alteration in the ubiquitin distribution neither in the cytosolic USP25 localization could be observed for any of the UBD deletion and/or catalytic mutants.

These results prompted us to evaluate the potential relevance of these domains in the specificity of substrate recognition. From previous work, we already knew some of the physiological substrates of the USP25 muscle isoform, USP25m (Bosch-Comas et al., 2006). The yeast two-hybrid assay provided us with a neat technique to test each of the deletion mutants against MyBPC1, ACTA1, and FLNC. Not unexpectedly, we detected that the three USP25 UBDs did contribute to substrate binding. However, this contribution differed between the three substrates, indicating that the three domains participated in a distinct manner to substrate recognition. Our results suggest that recognition of each substrate is specific of a particular UBD combination, most probably with the cooperation of other domains located elsewhere in the enzyme. For instance, interaction with MyBPC1 seems to be strictly dependent on the UBA domain, while USP25m recognition of the N-terminus of FLNC does not seem to require any UBD. In contrast, the C-terminus of FLNC is recognized by a minimum of two USP25m UBDs, in any combination, pointing to an

additive or synergistic effect. The results on the two FLNC peptidic regions clearly exemplify that interaction with a single substrate may require multiple domain binding. On the other hand, recognition of ACTA1 was dependent on the enzyme retaining at least one UBD, as only the deletion of the three motifs prevented substrate recognition by USP25m. Overall, and except for the UBA domain in MyBPC1 binding, none of the three UBDs is critical for enzyme-substrate interaction, and the contribution of each UBD to substrate recognition seems to be more of a combinatorial type than sequence specific.

Proteins containing UBA and/or UIM domains are often modified by ubiquitination (Klapisz et al., 2002; Polo et al., 2002). In fact, one of the claimed functions of these sequences is the promotion of this post-translational modification (Woelk et al., 2006). Several reports using GST-UIM fusions, including the USP25 UIM2, showed that this motif is not ubiquitinated but it is necessary and sufficient to induce ubiquitination at N-terminal of their position (Miller et al., 2004). The view gets much more complex when considering that many UBA/UIM containing proteins are either E3 ligases or DUBs, thus adding a self-regulatory loop of their enzymatic activity (Berke et al., 2005; Woelk et al., 2006). E3 ligases promote their own ubiquitination and DUBs, their autodeubiquitination, under certain physiological stimuli (Shen et al., 2005). We tested this hypothesis by coexpressing USP25 and Ubiquitin (as a means to enhance protein ubiquitination) and detected a faint higher-molecular weight band (around 8 kDa larger than that of USP25) in Western blots, providing an evidence of USP25 ubiquitination. Notably, this band was significantly enhanced in lysates of the catalytically inactive USP25, further suggesting that it was produced by monoubiquitination, and that USP25 catalyzes its own deubiquitination. These results are similar to those reported on TRE17 (USP6), in which only catalytically inactive forms of the enzyme displayed monoubiquitinated species (Shen et al., 2005). Whether these modifications are relevant to the activity or other enzymatic properties of either USP25 or USP6, is yet to be unraveled, although it has to be considered that

the proportion of modified protein is low in the two cases. This post-translational modification of USP25 does not seem to be dependent on any UBA or UIM domains as all the deletion mutants showed the slower migrating band, again enhanced in the corresponding catalytically inactive mutants. From these results we concluded that the first 150 amino acids of USP25: i) are neither required for, nor affect, USP25 ubiquitination, and ii) are not the primary target for ubiquitination.

Ubiquitination and sumoylation processes are often considered to engage in a cross-talk, determining opposite fates or functions of a particular substrate, and even compete for the same residues (Ulrich, 2005). We tested whether USP25 was sumoylated *in vitro*, and if the UBA/UIM domains were relevant for this modification. USP25 was indistinctly sumoylated by SUMO-1 and SUMO-2, and deletion of any or all UBA/UIM motifs did not abrogate this modification. Nonetheless, the UIM2 domain seems to show a subtle inhibitory effect, which is counteracted by a slight positive effect of the UBA and UIM1 domains in USP25 sumoylation. In contrast to ubiquitination, we have not detected a slower migrating USP25 band in protein lysates compatible with a sumoylated species, although we cannot discard that a very small proportion of intracellular USP25 is sumoylated. Therefore, the physiological relevance of USP25 sumoylation remains to be ascertained.

Many E3 ligases and some DUBs undergo post-translational modifications, such as phosphorylation, glycosylation, acetylation and hydroxylation, which modulate the recognition of their substrates. For instance, phosphorylation of CYLD (the USP responsible for cylindromatosis) in response to stress inhibits its deubiquitinating activity upon some cognate substrates (Reiley et al., 2005). We checked whether USP25m could be post-translationally modified. Our results in cultured cells showed that USP25m was phosphorylated (in Tyr and Ser/Thr residues) and acetylated, and that these modifications were not dependent on its catalytic activity as the wild-type protein and the inactive mutant were modified similarly. However, the opposite could be true, and our experimental design does not allow to exclude that either the

USP25m catalytic activity or the affinity to its substrates could be affected by these modifications. Assessing the relevance of chemical modifications in the USP25 catalytic activity will undoubtedly shed light on the physiological function of this DUB.

Previous experimental observations indicated that USP25 overexpression lengthened cell-doubling time. Given that many cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) are finely regulated by the UPS (Nakayama and Nakayama, 2006), we decided to explore if USP25 overexpression could cause cell cycle arrest. Preliminary monitorization on C2C12 transfected cells cell cycle distribution pointed to G1 cell-cycle arrest, although the low transfection efficiency somewhat masked these results. Subsequent enrichment in GFP-USP25m transfected cells showed that USP25 overexpression did cause cell cycle arrest, most probably in G1/S transition, as demonstrated by the detection of the p21CIP1 protein. UBD deletion did not abrogate detection of this CDK inhibitor, although subtle differences on the cell cycle arrest were apparent. This effect could offer a plausible explanation to the failure in generating stable USP25 overexpressing cell lines after repeated attempts. Further experiments will allow us to address the relevance of USP25 activity on cell cycle regulation.

Acknowledgements. We are indebted to Amanda Denuc for technical help and to Dr. M.S. Rodríguez from CIC BioGUNE (Bilbao, Spain) for kindly providing suggestions and reagents. We also thank Dr. Neus Agell for helpful discussion. A. B.-C. received a FPU fellowship (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain). This work has been funded by the grant BFU2004-01343 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) to G.M.

REFERENCES

- Aguilar, R.C. and Wendland, B. (2003) Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 184-190.
- Berke, S.J.S., Chai, Y., Marrs, G.L., Wen, H. and Paulson, H.L. (2005) Defining the Role of Ubiquitin-interacting Motifs in the Polyglutamine Disease Protein, Ataxin-3. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 32026-32034.
- Bosch-Comas, A., Lindsten, K., Gonzalez-Duarte, R., Masucci, M.G. and Marfany, G. (2006) The ubiquitin-

- specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 723-734.
- Buchberger, A. (2002) From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends in Cell Biology*, **12**, 216-221.
- Ciechanover, A., Orian, A. and Schwartz, A.L. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, **22**, 442-451.
- Davies, G.C., Ettenberg, S.A., Coats, A.O., Mussante, M., Ravichandran, S., Collins, J., Nau, M.M. and Lipkowitz, S. (2004) Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b. *Oncogene*, **23**, 7104-7115.
- Di Fiore, P.P., Polo, S. and Hofmann, K. (2003) When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 491-497.
- Fang, S. and Weissman, A.M. (2004) A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1546-1561.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Hay, R.T. (2005) SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell*, **18**, 1-12.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, **258**, 8206-8214.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hicke, L., Schubert, H.L. and Hill, C.P. (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev.Mol.Cell Biol.*, **6**, 610-621.
- Hilgarth, R.S., Murphy, L.A., Skaggs, H.S., Wilkerson, D.C., Xing, H. and Sarge, K.D. (2004) Regulation and function of SUMO modification. *J Biol Chem*, **279**, 53899-53902.
- Hofmann, K. and Bucher, P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 172-173.
- Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, **399**, 361-372.
- Kim, J.H., Park, K.C., Chung, S.S., Bang, O. and Chung, C.H. (2003) Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 9-18.
- Klapisz, E., Sorokina, I., Lemeer, S., Pijnenburg, M., Verkleij, A.J. and van Bergen en Henegouwen, P.M. (2002) A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem*, **277**, 30746-30753.
- Laney, J.D. and Hochstrasser, M. (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, **97**, 427-430.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- Miller, S.L., Malotky, E. and O'Bryan, J.P. (2004) Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation. *J Biol Chem*, **279**, 33528-33537.
- Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 369-381.
- Papa, F.R. and Hochstrasser, M. (1993) The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature*, **366**, 313-319.
- Pickart, C.M. and Eddins, M.J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1695**, 55-72.
- Pickart, C.M. and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 610-616.
- Polo, S., Confalonieri, S., Salcini, A.E. and Di Fiore, P.P. (2003) EH and UIM: endocytosis and more. *Sci STKE*, **2003**, re17.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. and Di Fiore, P.P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, **416**, 451-455.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. and Sun, S.C. (2005) Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase γ -dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 3886-3895.
- Shen, C., Ye, Y., Robertson, S.E., Lau, A.W., Mak, D.O. and Chou, M.M. (2005) Calcium/calmodulin regulates ubiquitination of the ubiquitin-specific protease TRE17/USP6. *J Biol Chem*, **280**, 35967-35973.
- Sun, L. and Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 119-126.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, **19**, 94-102.
- Ulrich, H.D. (2005) Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol*, **15**, 525-532.
- Valero, R., Bayes, M., Francisca Sanchez-Font, M., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Duarte, R. and Marfany, G. (2001) Characterization of alternatively spliced products and tissue-specific isoforms of USP28 and USP25. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0043.
- Valero, R., Marfany, G., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Gonzalez, G., Puelles, L. and Gonzalez-Duarte, R. (1999) USP25, a novel gene encoding a deubiquitinating enzyme, is located in the gene-poor region 21q11.2. *Genomics*, **62**, 395-405.
- Wilkinson, K.D. (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 141-148.
- Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P.P. and Polo, S. (2006) Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol*, **8**, 1246-1254.
- Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T.W. and Elledge, S.J. (2006) A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*, **126**, 529-542.

1. CERQUES BIOINFORMÀTIQUES DE L'ESTRUCTURA SECUNDÀRIA D'USP25

En aquest treball ens hem centrat majoritàriament en la isoforma muscular d'USP25 (USP25m). Aquesta isoforma es genera per *splicing* alternatiu únicament en múscul esquelètic i cor mitjançant la inclusió de l'exó 19a. Per determinar si l'exó diferencial 19a podia conferir característiques particulars a l'esmentada proteïna, vam creure oportú realitzar una predicció *in silico* de l'estructura secundària d'USP25 amb i sense l'exó específic de teixit muscular. Es van utilitzar diversos programes accessibles per xarxa i es van obtenir uns resultats consens entre tots els programes utilitzats.

En general USP25 és una proteïna enriquida en hèlixs alfa, mentre que gairebé no presenta làmines beta. Aquestes es troben principalment als dominis UCH (*Ubiquitin C-terminal Hydrolase*). A la regió amino hi trobem bastantes regions *coiled coil*, que s'han descrit com a zones d'interacció proteïna-proteïna, i a la meitat carboxi terminal hi trobem la majoria d'hèlixs alfa (**Figura S2.1**).

Mitjançant programes de predicció de modificacions post-traduccionals hem pogut determinar que USP25m conté cinc possibles llocs de sumoilació, així com múltiples serines, treonines i tirosines susceptibles de ser fosforilades (<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Aquestes prediccions *in silico* han d'esser verificades experimentalment per tal de descartar falsos positius.

Analitzant els patrons d'hidrofobicitat, tant de la isoforma muscular com de les altres dues isoformes vam observar que, en general, USP25 és una proteïna molt hidrofílica, la qual cosa concorda amb la seva localització citoplasmàtica. A més, vam veure que l'exó 19a, així com el 19b, corresponien a dos dominis hidrofílics diferenciats similars entre ells (**Figura S2.2**). Aquest fet ens indica que els aminoàcids que formen aquest domini probablement s'encaren cap al citoplasma cel·lular, i per tant, podrien constituir zones d'interacció o de reconeixement amb altres proteïnes.

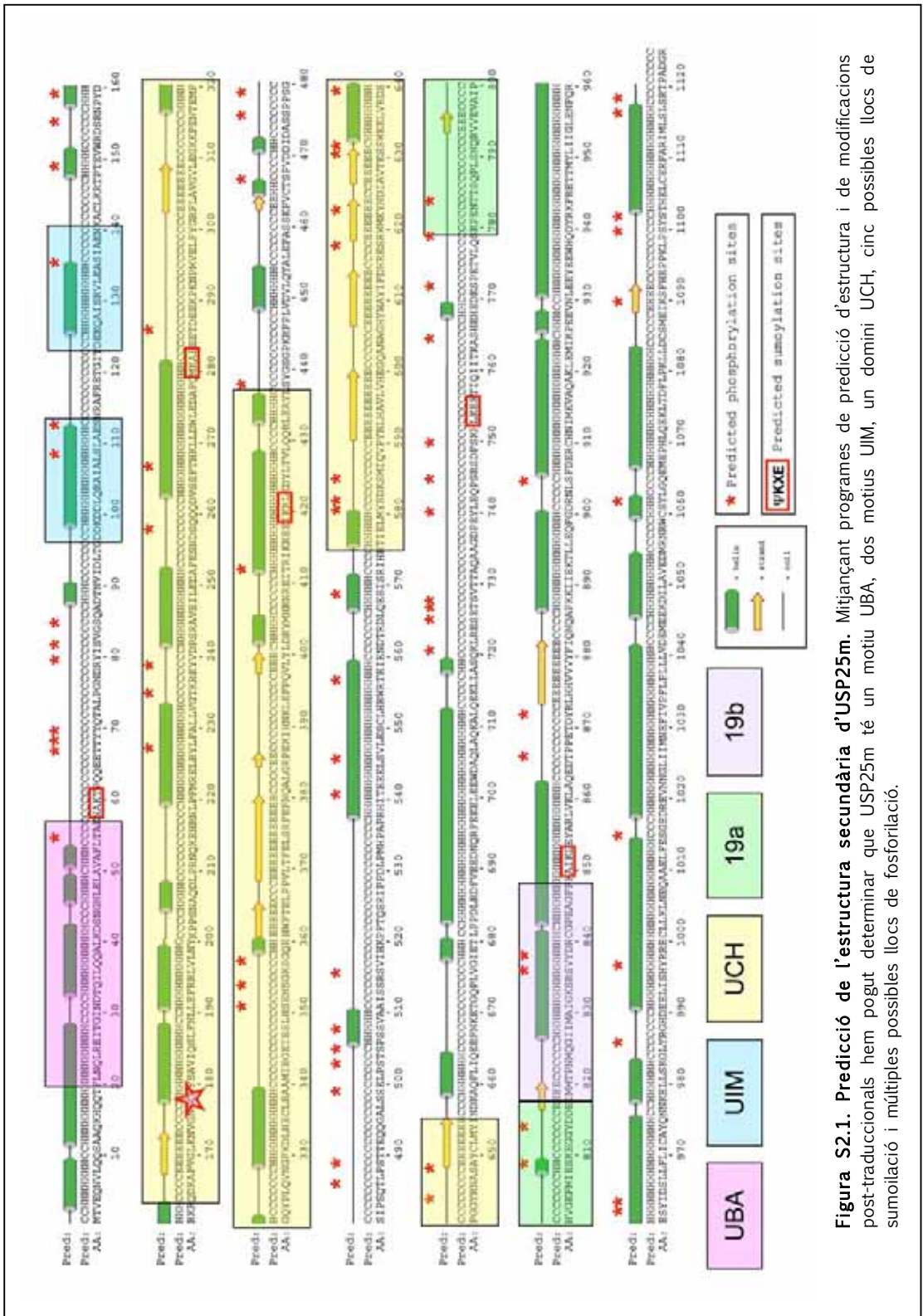
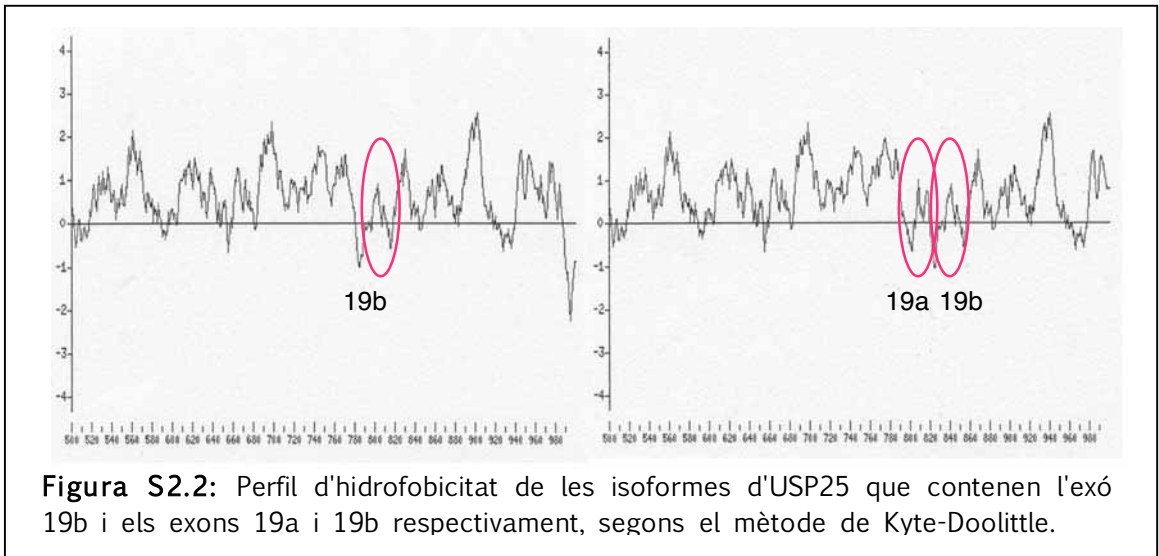


Figura S2.1. Predicció de l'estructura secundària d'USP25m. Mitjançant programes de predicció d'estructura i de modificacions post-traduccionals hem pogut determinar que USP25m té un motiu UBA, dos motius UIM, un domini UCH, cinc possibles llocs de sumoïlació i múltiples possibles llocs de fosforilació.



§§

2. GENERACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS ESTABLES QUE SOBREEXPRESSIN USP25 O USP25_m

Les línies cel·lulars estables són una bona eina per l'estudi de la funció gènica, ja que permeten l'avaluació d'efectes derivats de la sobreexpressió feble continuada al llarg del temps. D'aquesta manera s'eviten artefactes produïts per una sobreexpressió excessiva.

Per aquest motiu al nostre laboratori vam decidir construir una línia cel·lular estable en cèl·lules humanes de neuroblastoma SKNBe2 amb una construcció d'*USP25* clonat en pauta amb l'epítot 6x(His) en el vector pREP7 (Invitrogen). Aquest plasmidi es manté episòmic degut a que conté l'origen de replicació i l'antigen nuclear (EBNA-1) del Virus de l'Epstein-Barr que permeten la seva replicació extra-cromosòmica. Aquesta feina va ser iniciada per la Dra. Rebeca Valero, que va dissenyar i obtenir les construccions i va transfectar les cèl·lules.

Al cap de diverses rondes de selecció amb 200 µg/ml d'higromicina es van analitzar lisats cel·lulars mitjançant transferència Western, i no es va detectar cap mena de sobreexpressió d'*USP25* en cap de les línies produïdes.

USP25m és una proteïna específica de teixit muscular. Per aquest motiu, vam creure oportú analitzar l'efecte de la sobreexpressió d'aquest gen al llarg de la diferenciació muscular. Amb la transfecció transitòria d'*USP25m* en cèl·lules C2C12, l'expressió de la proteïna resultava indetectable al cap de quatre dies, impossibilitant veure l'efecte durant tot el procés de miogènesi. Per tant, vam decidir-nos a obtenir una línia de cèl·lules C2C12 que expressés de manera estable USP25m. Aquest objectiu ens va resultar impossible, ja que ni amb *USP25m* en pcDNA3 ni en pEGFP-C2 vam aconseguir que en seleccionar amb 400 µg/ml de G418 les cèl·lules presentessin nivells elevats de proteïna exògena.

RESUM GLOBAL

Toute science crée une nouvelle ignorance

Henri Michaux

1. *USP25*, UN GEN LOCALITZAT AL CROMOSOMA 21 QUE CODIFICA PER UNA PROTEASA ESPECÍFICA D'UBIQUÏTINES

La síndrome de Down (SD) és deguda a una trisomia total o parcial del cromosoma 21 i, per aquest motiu, es coneix també com a trisomia 21. Els individus trisòmics presenten afectacions molt diverses, entre les quals el retard mental i la hipotonia muscular són les úniques comuns a tots els pacients. Un recull de la totalitat dels trets fenotípics es pot trobar a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=190685>.

Tot i que encara es desconeix la base molecular del fenotip SD, alguns autors afirmen que el cromosoma 21 conté dos tipus de gens: aquells que són sensibles a la dosi (és a dir, la presència de tres còpies produeix un efecte fenotípic) i aquells que no ho són (i, per tant, probablement no contribuirien a cap dels trets fenotípics (Antonarakis i col., 2004). A més, els gens sensibles de dosi poden exercir un efecte indirecte, degut a la interacció dels seus productes gènics amb altres gens que no es troben localitzats al cromosoma 21. Malgrat tot, no es poden descartar els efectes epigenètics, epistàtics i ambientals produïts per la disrupció de l'homeostasi (generada per l'alteració en el nombre de cromosomes) (Shapiro, 1975). Per tant, es considera que la varietat fenotípica és deguda a la gran variabilitat al·lèlica dels gens implicats en la trisomia, a les interaccions epistàtiques entre els gens del cromosoma 21 i/o els d'altres cromosomes, a efectes d'*imprinting* i a factors ambientals del període prenatal i postnatal.

En un intent de contribuir al coneixement de les bases moleculars de la SD, el nostre grup va iniciar una cerca exhaustiva de gens a la regió proximal del braç llarg cromosoma 21. S'hipotetitzava que aquest fragment cromosòmic podia contribuir al retard mental i a d'altres trets fenotípics de la patologia. Tanmateix, en aquella regió, al final de la dècada dels noranta, només s'hi havien identificat quatre gens, i la totalitat de la seqüència del genoma humà encara no s'havia publicat. Aquests esforços previs ens van permetre aïllar i caracteritzar el cDNA d'un nou gen de la regió 21q11.2. Mitjançant alineaments de seqüència es va veure que contenia dominis conservats característics de les hidrolases d'ubiquïtines a C-terminal, classificades dins de la superfamília dels enzims deubiquïtinants. Per aquest motiu es va anomenar *USP25* (Valero i col., 1999). Anàlisis d'hidròlisi *in vitro* d'un substrat model (ubiquïtina- β gal) corroboraren l'activitat deubiquïtinant d'*USP25* (Valero i col., 2001). Experiments de PCR quantitativa a temps real van demostrar que, en cervells fetals d'individus Down, *USP25* es trobava sobreexpressada 1,6 vegades (Sanchez-Font i col., 2003). Mitjançant hibridacions *in situ* en seccions de cervell fetal murí, així com en seccions de testicle de ratolí adult, l'expressió d'*USP25* s'associava a regions d'elevada proliferació cel·lular (Valero i col., 1999).

Pot USP25 contribuir al fenotip de la SD? La sobreexpressió d'USP25 en individus trisòmics, i la seva localització específica en zones proliferants de determinats òrgans vitals, sembla indicar un paper rellevant en el control del recanvi proteic, capaç d'influir, en cert grau, en el fenotip Down. A més, la funció deubiquitinant d'USP25 el posiciona en la categoria de gens candidats sensibles a la dosi, ja que l'excés d'aquest enzim podria rescatar els seus substrats de ser degradats en moments inapropiats o en quantitats errònies, i certes vies de senyalització cel·lular es podrien veure alterades per el desequilibri estequiomètric entre substrat ubiquitinat i substrat deubiquitinat. Per aquests motius, desentrellant a fons la funció i els substrats d'USP25 podrem esbrinar si la seva sobreexpressió en la SD contribueix als trets fenotípics presents en els individus trisòmics. L'ús de models cel·lulars ens proporciona una valuosa eina on valorar els efectes de la sobreexpressió d'USP25, tant a nivell global com a nivell específic sobre els seus substrats.

Actualment, gairebé deu anys després de l'inici de la nostra cerca de gens, es coneixen gairebé 400 gens codificats al braç llarg del cromosoma 21. Tots ells continuen essent candidats per a ser rellevants en el fenotip de la SD, ja que ni les anàlisis de les trisomies parcials ni els estudis amb models murins trisòmics per diferents regions han pogut descartar cap fragment cromosòmic (Gardiner i Costa, 2006). Només a través de l'esforç combinat de molts grups i diferents estratègies es podrà tenir una visió global i dilucidar la contribució dels gens del cromosoma 21 al fenotip de la SD.

§§

2. UN GEN, DIVERSOS TRANSCRITS, DIVERSES PROTEÏNES, DIVERSOS PATRONS D'EXPRESSIÓ

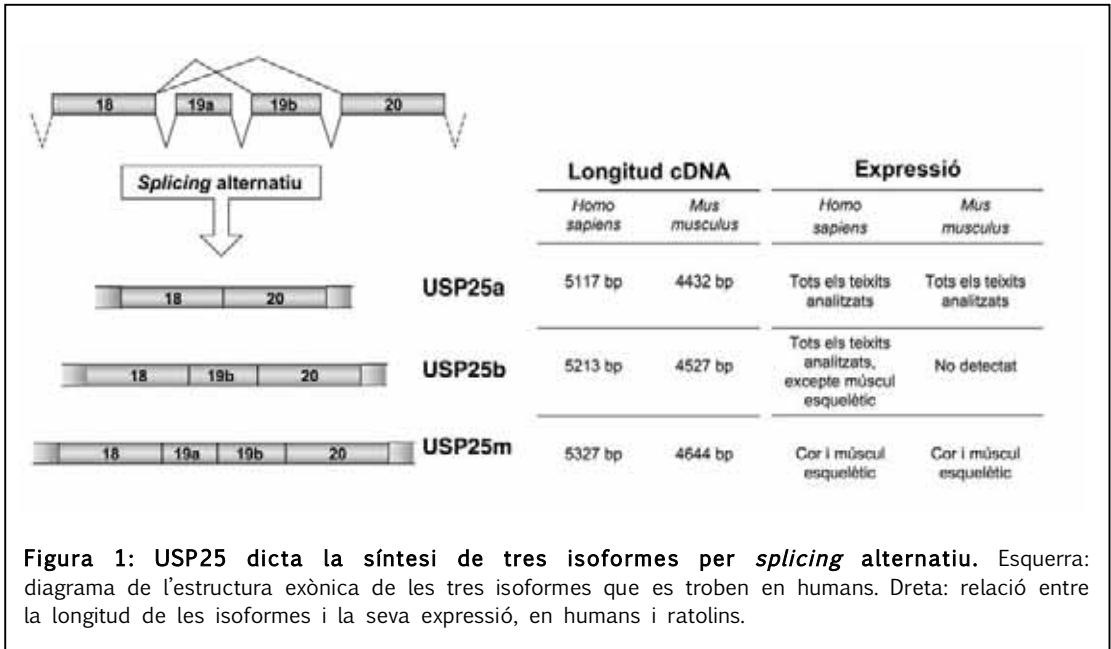
L'anàlisi dels clons de cDNA d'*USP25* aïllats inicialment va revelar com a mínim cinc exons que mostraven *splicing* alternatiu en diferents transcrits. En tres dels casos, la inclusió de l'exó introduïa un codó d'aturada en la pauta de lectura oberta, fet que va promoure la catalogació d'aquests transcrits com a artefactes de clonació o productes d'*splicing* aberrants (Valero i col., 2001).

Actualment, en plena explosió de l'estudi dels RNAs no codificants, s'ha vist que el nombre de transcrits codificats pel genoma humà és, com a mínim, deu vegades superior al nombre de gens presents. Aquesta elevada quantitat és deguda, en part, a un gran nombre de successos d'*splicing* alternatiu (Bertone i col., 2004; Kampa i col., 2004). Sorprenentment, aproximadament un terç dels transcrits generats per *splicing* alternatiu en humans i ratolins presenten codons d'aturada prematurs, com en el cas d'*USP25*, que poden conduir a la degradació del transcrit pel procés conegut com a *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). S'ha demostrat que aquests transcrits interaccionen amb la maquinària transcripcional per autoregular els seus nivells d'expressió. Malgrat tot, aquestes dades són bastant controvertides, ja que la majoria de les variants d'*splicing* no es troben conservades entre humans i ratolins (revisat a Blencowe, 2006). Tanmateix, s'ha vist que els RNAs no codificants regulen un elevat nombre de funcions com, per exemple, la dinàmica dels cromosomes, l'*splicing*, l'edició de l'RNA, la inhibició de la transcripció i la degradació del DNA (revisat a Mattick i Makunin, 2006). Així, doncs, no es pot descartar un possible paper modulador dels transcrits d'*USP25* que aparentment no codifiquen per cap proteïna. Tot i això, també podrien ser tan sols successos inespecífics deguts a un reconeixement deficient dels llocs donadors (SD) o acceptors (SA) d'*splicing* o a un reconeixement erroni de llocs SA i SD críptics.

A humans, *USP25* presenta dos exons alternatius (19a i 19b) que generen tres transcrits diferents (per inclusió o exclusió d'aquests exons) amb especificitat tissular i amb una pauta de lectura oberta que inclou tots els dominis funcionals. Aquests transcrits produeixen tres proteïnes, que anomenem USP25a (fusió directa dels exons 18-20), USP25b (inclusió en pauta de l'exó 19b) i USP25m (inclusió dels exons 19a i 19b) (**Figura 1**). USP25b i USP25m són mútuament excloents: anàlisis de RT-PCR en panells de cDNAs de diferents teixits demostren que USP25m es troba únicament en múscul esquelètic i cor, i USP25b, en canvi, es troba en la resta de teixits. USP25a s'expressa ubíquament i és el transcrit majoritari.

A ratolí, però, trobem només dues d'aquestes isoformes. En cap cas s'ha trobat un cDNA que contingui l'exó 19b però no el 19a, ni als bancs de dades d'ESTs ni per amplificació a partir de cDNAs. De la mateixa manera que en humans,

USP25m s'expressa només en teixits de llinatge muscular, i USP25a s'expressa ubíquament (**Figura 1**).



Anàlisis evolutives en matèria d'*splicing* alternatiu prediuen que només un 10-20% dels casos d'inclusió-exclusió d'exons es troben conservats entre humans i ratolins (Blencowe, 2006). USP25b es trobaria dins de l'altre 80-90% de casos, és a dir, seria específic d'humans. Aquest fet suggereix que USP25b podria haver adquirit funcions noves (o lleugerament diferents). Tot i que l'activitat enzimàtica bàsica per al bon funcionament de la cèl·lula recauria sobre les isoformes conservades evolutivament, no es pot descartar una funció igualment important d'USP25b.

USP25 no és l'únic DUB del qual s'han documentat *splicings* alternatius. USP28, un enzim deubiquitinant de la mateixa subfamília que USP25, presenta també una isoforma específica de teixit muscular per inclusió de l'exó 19a (Valero i col., 2001). A més, UBP45 i UBP69 són dos DUBs de rata (homòlegs d'USP2 humà) generats per *splicing* alternatiu d'un mateix gen. Difereixen només en la regió N-terminal de la proteïna, però tenen funcions antagòniques: UBP69 és necessari per l'iniciació de la miogènesi, mentre que UBP45 inhibeix la diferenciació bloquejant la fusió dels mioblasts (Park i col., 2002). USP6, també anomenat TRE-2 o TRE17, produeix tres isoformes mitjançant *splicing* alternatiu. Totes tres són idèntiques en els seus primers 359 aminoàcids, però difereixen en els extrems C-terminals: TRE17(long) codifica per un DUB funcional, però TRE17(onco) està truncat en la caixa Cys conservada dels enzims deubiquitinants. TRE17(short) és la isoforma més curta, i codifica per un pèptid de només disset aminoàcids de funció desconeguda.

Tant TRE17(long) com TRE17(onco) promouen tumorigènesi, mitjançant mecanismes encara desconeguts (Nakamura i col., 1992). Ara per ara, no es coneixen els efectes funcionals de les isoformes d'USP2 ni d'USP6, però es creu que confereixen diferències en l'especificitat de substrat i/o localització subcel·lular.

La inclusió en pauta de l'exó 19a d'USP25 afegeix 38 aminoàcids que, segons l'anàlisi del patró d'hidrofobicitat (i de forma similar al patró de l'exó 19b), s'orienten cap a l'exterior, generant possibles superfícies d'interacció proteïna-proteïna. D'aquesta manera, USP25m hauria adquirit el segment necessari per interaccionar de manera diferencial i específica amb proteïnes musculars.

Tant el funcionament del múscul esquelètic com del cor han estat vastament estudiats: és ben sabut que per mantenir un bon funcionament de l'activitat contràctil es requereix un balanç finament regulat de les proteïnes sarcomèriques i associades al sarcòmer. En aquest context, l'activitat del UPS i de la senyalització mitjançant Ub s'ha vist que té un paper rellevant (Bodine i col., 2001; Costelli i Baccino, 2003; Cao i col., 2005). Remarcablement, existeixen nombrosos estudis relacionant lligases E3 d'Ub amb processos de diferenciació muscular o patologies com per exemple l'atròfia (atrogenin, MURF-1, MURF-2, MURF-3) (Spencer i col., 2000; McElhinny i col., 2004; Witt i col., 2005). A més, com hem esmentat anteriorment, es coneixia ja la importància d'UBP45 i UBP69 en la miogènesi (Park i col., 2002), i recentment s'ha reportat l'expressió elevada de l'enzim deubiquitinant USP19 en processos de pèrdua de massa muscular (Combaret i col., 2004). No és estrany, doncs, que amb el temps vagi incrementant la llista de DUBs relacionats amb processos miogènics.

Degut a la importància del UPS en múscul esquelètic, a la presència d'hipotonia muscular en un 100% d'individus Down, i a l'existència de models cel·lulars ben definits per estudiar la miogènesi i altres processos musculars, vam triar la isoforma específica de múscul (USP25m) per intentar desxifrar el mecanisme d'acció d'aquest enzim deubiquitinant. Pels estudis cel·lulars hem fet servir la línia cel·lular C2C12 (**Figura 2**). Aquesta línia va ser obtinguda originàriament per Yaffe i col·laboradors mitjançant passatges seriatos de mio blasts provinents d'un múscul de ratolí C3H (Yaffe i Saxel, 1977). El canvi a un medi de creixement menys ric en factors de creixement (substituint el 10% de sèrum boví per un 2% de sèrum de cavall) indueix la seva diferenciació cap a cèl·lules musculars mitjançant l'expressió de marcadors típics de múscul esquelètic, i constitueixen un model idoni per estudiar la diferenciació de mio blasts a miotubs (miogènesi).

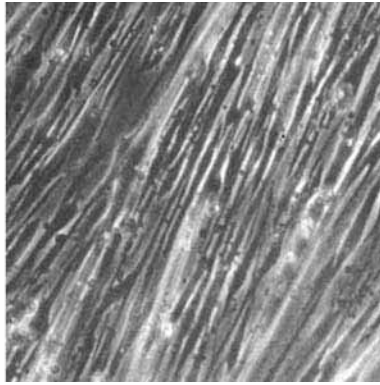
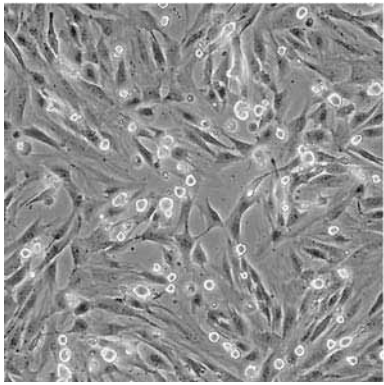


Figura 2: Cèl·lules C2C12. A l'esquerra es veuen les cèl·lules en estadi de mioblast, en presència de medi de creixement (10% de sèrum fetal boví). A la dreta, els mioblasts, en presència de medi de diferenciació (2% de sèrum de cavall), s'han fusionat i formen els miotubs.

Els nivells d'RNA i de proteïna d'USP25m al llarg de la miogènesi en cèl·lules C2C12 demostren que USP25m és específica de teixit muscular diferenciat. Es detecta un pic màxim d'expressió al dia 5 de diferenciació que es tradueix en un pic de proteïna al dia 6. Aquestes observacions fan pensar en un paper específic de la isoforma muscular d'USP25, probablement en la regulació del procés de miogènesi.

§§

Per determinar el mecanisme d'acció d'USP25m vam creure necessari aprofundir en i) la cerca dels substrats sobre els que actua, ii) la caracterització estructural de l'enzim i, iii) la regulació de la seva activitat.

3. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'USP25m: CERCA DE SUBSTRATS

La superfamília dels DUBs és una de les famílies enzimàtiques amb més membres del UPS. En un principi, totes les proteïnes ubiquitinades podrien ser substrats potencials d'aquests enzims, atès que la majoria són capaços d'hidrolitzar un substrat artificial format per la fusió d'un monòmer d'Ub a la β -galactosidasa. Per aquest motiu, inicialment es considerava que els diferents membres no mostraven especificitat de substrat, sinó que més aviat exhibien preferències o diferències subtils d'afinitat, i que els substrats serien intercanviables entre els diferents DUBs. Aquesta hipòtesi es basava en els resultats de *knockouts* en llevat, atès que una soca de *Saccharomyces cerevisiae* en què s'havien deletat quatre gens codificants per DUBs era perfectament viable (Baker i col., 1992). Així, doncs, el gran repte inicial en la recerca sobre aquests enzims va consistir en tractar d'assignar funcions fisiològiques específiques a cada membre de la superfamília.

Contràriament a la idea preconcebuda, en els últims anys s'ha vist que existeix una elevada especificitat per a un gran nombre d'enzims deubiquitinants respecte a les seves proteïnes diana ubiquitinades. Per exemple, *Fat facets* deubiquitina específicament a *Liquid facets*, HAUSP a l'ataxina-1, p53, MDM2 i a l'histona H2B, USP11 a RanBPM, etc (Hong i col., 2002; Ideguchi i col., 2002; Chen i col., 2002b; Graner i col., 2004; van der Knaap i col., 2005; Sheng i col., 2006; Zhang i col., 2006). La majoria d'aquestes relacions DUB-substrat es coneixen gràcies a assajos de doble híbrid. Tot i això, els casos en que s'ha fet servir l'enzim deubiquitinant com a esquer són escassos. Gairebé sempre, fent servir altres proteïnes com a esquer, s'ha pogut detectar algun tipus d'interacció molecular amb certs DUBs (Gnesutta i col., 2001; Hong i col., 2002; Ideguchi i col., 2002; Martinu i col., 2004). Molts grups de recerca van descartar les aproximacions encarades directament a trobar proteïnes interaccionants amb DUBs ja que es creia que no s'obtidrien resultats conclouents per la possible manca d'especificitat. Ha estat recentment quan, degut a l'increment de DUBs relacionats amb processos cel·lulars vitals o patològics, s'ha iniciat l'aprofundiment en la caracterització i el desenvolupament de noves tècniques encarades a desvetllar els mecanismes d'acció d'aquests enzims.

3.1. Cerca de substrats d'USP25m mitjançant el mètode del doble híbrid

Donat que l'assaig del doble híbrid (*Yeast 2 Hybrid*, Y2H) és un dels mètodes més utilitzats per identificar proteïnes interaccionants sense cap coneixement previ ni cap candidat conegut, vam decidir emprar-lo per trobar substrats d'USP25m. Prèviament a la realització de l'experiment, érem conscients que aquest mètode presenta certes limitacions. La principal, era l'aparició de falses interaccions a l'hora de fer el triatge, especialment en el cas d'aquelles proteïnes que poden unir-se al DNA, o que poden activar transcripcionalment de manera espúria gens marcadors. El problema es minimitza fent servir més d'un gen marcador i més d'una seqüència promotora. Tanmateix, una altra limitació trobada freqüentment és que les proteïnes que es fan servir com esquer han de ser correctament plegades i/o modificades posttraduccionalment i enviades al nucli. En el cas que algun d'aquests estadis no es doni adequadament, es podrien trobar interaccions no veritables, i de la mateixa manera podríem estar perdent aquelles interaccions que realment són fisiològiques. S'ha de tenir en compte, també, que algunes proteïnes poden resultar tòxiques en sobreexpressar-les en la soca de llevat. Finalment, s'ha de considerar que en l'assaig Y2H, tot el *pool* de proteïnes per les quals estem provant la interacció s'han de trobar localitzades al nucli, i podria ser que dues proteïnes que fisiològicament no interaccionen perquè es troben en compartiment cel·lulars ben diferenciats, generessin una interacció positiva en trobar-se ambdues a nucli. Com a conseqüència de les limitacions que presenta el mètode, són necessàries una sèrie de verificacions que exigeixen un alt cost en temps.

Vam optar per realitzar dos triatges en paral·lel per aprofundir en les possibles diferències funcionals que els 38 aminoàcids de l'exó 19a conferien a la proteïna. En el primer, es va fer servir com a proteïna esquer la isoforma muscular sencera d'USP25. D'aquesta manera preteníem caracteritzar aquelles proteïnes que, o bé serien substrats, o bé interaccionarien en certa mesura amb USP25m, ja fos com a cofactors, agents reguladors, etc. D'altra banda, en el segon triatge, la construcció que vam usar com a esquer corresponia únicament als nucleòtids que codificaven els exons 19a i 19b. Érem conscients de les limitacions amb què ens podíem trobar en fer servir aquest esquer. En ser molt petit, podria no ser capaç d'interaccionar específicament amb altres proteïnes, en particular si la hipòtesi de partida no era correcta, però d'altra banda, les interaccions fisiològiques verificades en aquest triatge serien fruit d'unions a la regió específica de múscul, i per tant, estarien, molt probablement, realitzant funcions específiques de teixit. Dades d'aquestes possibles interaccions ens podrien orientar en la funció que aquesta isoforma realitza en múscul esquelètic i cor.

Els experiments d'anàlisi del patró de restricció dels clons positius, les hibridacions Southern i la seqüenciació dels clons obtinguts ens van permetre triar

tres proteïnes interaccionants que van aparèixer representats diverses vegades. Aquests van ser el precursor α -1 de l'actina (ACTA1), la proteïna d'unió a la miosina C1 (MyBPC1) i la Filamina C (FLNC). Aquestes tres proteïnes s'expressen abundantment a múscul, formen part del citoesquelet cel·lular i de la maquinària contràctil i totes elles s'han trobat implicades en patologies que afecten la massa muscular (Gautel i col., 1998; Kunst i col., 2000; Thompson i col., 2000; van der Ven i col., 2000; Sparrow i col., 2003; Oakley i col., 2004).

Donada la interacció fisiològica detectada amb aquestes tres proteïnes, validada per mètodes alternatius com la coimmunoprecipitació, el GST-*pull down* o la colocalització, i la rellevància funcional que tenen en el citoesquelet, vam creure que USP25m podria estar implicada en el manteniment de l'estructura cel·lular. En relació a la síndrome de Down, alguns autors consideren que el retard mental observat en els individus amb trisomia 21 és degut a alteracions en el citoesquelet neuronal (Engidawork i Lubec, 2003), ja que mitjançant anàlisis d'expressió proteica s'ha vist que certes proteïnes que formen part d'aquesta estructura es troben subexpressades en trisòmics, en comparació amb disòmics. Per aquest motiu, no es pot descartar un efecte fenotípic en els pacients Down al teixit muscular causat per la sobreexpressió d'USP25, en cas que la triple dosi d'aquest gen afectés la taxa de degradació, o els mecanismes reguladors, d'ACTA1, MyBPC1 i FLNC.

Com ja hem esmentat anteriorment, aquestes tres proteïnes desenvolupen funcions crucials en la regulació de l'estructura del múscul, tant a nivell del manteniment del complex sarcomèric com de les propietats contràctils (Clark i col., 2002). MyBPC1, per exemple, estableix l'estructura dels filaments gruixuts de miosina, actuant de "pont" entre les diverses proteïnes de la banda A, i participant en la regulació de la contracció. Els seus dominis d'interacció amb altres proteïnes musculars com la miosina, l'actina i la titina, s'han mapat a la regió C-terminal, solapant-se amb el fragment que interacciona amb USP25m. Cal remarcar que aquest reconeixement és altament específic, ja que la isoforma cardíaca de MyBPC (MyBPC3), que presenta elevada homologia amb MyBPC1, no interacciona amb USP25m (resultats nostres, no publicats). La FLNC és una proteïna gegant (més de 290 kDa) que entrecreu els filaments d'actina. Té funcions estructurals i alhora senyalitzadores, i està localitzada als discs Z i al subsarcolema. Curiosament, la regió responsable de la seva localització als discs Z interacciona amb USP25m, fet que reforça la hipòtesi del possible paper estructural d'aquest DUB. Pel que fa a ACTA1, constitueix la isoforma més expressada de totes les actines al múscul esquelètic adult. Tot i això, no podem descartar que també es doni interacció d'USP25(m) amb les altres isoformes.

Malgrat encara no coneixem del cert la funció d'USP25m, els nostres resultats indiquen que forma part de l'estructura del sarcòmer i que interacciona amb elements crítics per al seu bon funcionament.

3.2. Especificitat tissular de les interaccions

L'esquer constituït pels exons 19a i 19b codifica per un pèptid que es troba només en la isoforma muscular d'USP25m. Per aquest motiu, els resultats del triatge realitzat amb aquesta construcció ens proporcionen dades interessants degut a que les interaccions trobades seran específiques de teixit muscular. A més, ens estaran mapant la regió d'interacció d'USP25m, i ens indicaran que l'esmentada regió és suficient per a que es doni la interacció.

En el triatge inicial amb la proteïna USP25m sencera vam obtenir aproximadament 300 clons positius. En canvi, amb els exons 19a i 19b només en van créixer 30 (a més, la majoria d'aquests clons creixia més lentament). La observació inicial d'aquests resultats ja ens indicava que, tot i que en alguns casos la presència dels esmentats exons era suficient per interaccionar amb els seus *partners*, el context proporcionat per la resta de la proteïna afavoreix el reconeixement i/o la intensitat de la interacció (possiblement degut al correcte plegament de la proteïna o a la presència de zones múltiples d'interacció).

L'extrem N-terminal de la filamina C va ser l'únic clon positiu que interaccionava alhora amb tota la proteïna USP25m i amb els exons 19a i 19b. A més, en assajar la interacció amb USP25b, aquesta va resultar negativa. Les dades indiquen, doncs, que el fragment generat pels exons 19a i 19b, més específicament el segment proteic codificat a 19a, és necessari i suficient per interaccionar amb la part N-terminal de la FLNC. Aquesta interacció, per tant, és específica de teixit i d'isoforma, ja que la FLNC és una proteïna que es troba únicament en teixit muscular i interacciona amb USP25m, també específica de teixit.

La MyBPC1 i l'extrem C-terminal de la FLNC poden interaccionar amb ambdues isoformes d'USP25, i en cap dels dos casos es detecta interacció amb el fragment 19a-19b. Segons aquestes dades, la interacció detectada no seria específica de teixit. Tot i això, MyBPC1 i FLNC s'expressen únicament a teixit muscular, per tant, només a múscul, coincidiran amb USP25(m). Hem de remarcar, a més, que la interacció amb la isoforma genèrica d'USP25 és, aparentment, més feble, atès que no es va obtenir creixement en totes les rèpliques realitzades de l'experiment.

El cas de l'ACTA1 és lleugerament diferent: es detecta interacció només amb la isoforma muscular, però no amb la isoforma genèrica ni amb el fragment 19a-19b. Aquestes observacions ens indiquen que, si bé el fragment específic de múscul (19a-19b) és necessari per a la interacció, no és suficient.

La petita dissecció del sistema que vam dur a terme mitjançant l'ús de dos esquers en el cribratge, ens proporciona dades per afirmar que la interacció d'USP25/USP25m amb els seus *partners* o possibles substrats no succeeix sempre de la mateixa manera. Mentre que en alguns casos la regió 19a-19b, ella sola sense context, és necessària i suficient per a la interacció (extrem C-ter de FLNC), en d'altres és necessària però no suficient (ACTA1) i en d'altres sembla no tenir cap funció (MyBPC1 i extrem N-ter de FLNC).

3.3. Rellevància funcional de les interaccions

No hem pogut determinar, fins al moment, l'abast de la rellevància fisiològica de la interacció d'USP25m amb MyBPC1, FLNC i ACTA1. Sabem, però, que ni FLNC ni ACTA1 són proteïnes de recanvi elevat ja que, en presència d'inhibidors de proteasoma, els seus nivells es mantenen inalterats. Per tant, la seva interacció amb USP25m segurament està relacionada amb aquelles funcions no degradatives de la Ub, és a dir, les reguladores del tràfic, la localització subcel·lular, interaccions proteïna-proteïna, etc. Tot i això, els experiments d'interferència d'RNA suggereixen que USP25 regula d'alguna manera els nivells d'ACTA1, ja que en silenciar USP25, els nivells d'ACTA1 disminueixen. Possiblement USP25m recluta ACTA1 i evita que aquesta es localitzi erròniament a la fibra muscular. Hipotèticament, la correcta localització d'ACTA1 podria dependre del seu estat d'ubiquitinació. En aquesta situació, USP25m, però també altres lligases E3 d'Ub o DUBs, serien crucials pel manteniment estructural del sarcòmer.

La MyBPC1, en canvi, és una proteïna de vida mitjana molt curta (aproximadament 3 hores), i els seus nivells intracel·lulars estan regulats pel proteasoma. Sorprenentment, vam detectar que en sobreexpressar la isoforma muscular d'USP25 (i no la isoforma genèrica, coincidint amb els resultats obtinguts en el Y2H), aquesta era capaç de rescatar la MyBPC1 d'ésser degradada. Fins i tot després de setze hores d'incubació amb inhibidors de la síntesi proteica en detectàvem nivells elevats. Hem pogut demostrar que USP25m inhibeix la degradació d'MyBPC1. Donada la funció deubiquitinant d'USP25m, el més probable és que aquesta hidrolitzi la cadena de poliubiquitina d'MyBPC1, impeding el seu reconeixement per el complex proteolític del proteasoma.

Sabem que MyBPC1 funciona com a interconnectora dels filaments primis i gruixuts, interaccionant amb la miosina, l'actina i la titina (Clark i col., 2002). Basant-nos en les nostres troballes, referents a la regulació dels nivells d'aquesta proteïna per USP25m, podem hipotetitzar que mutacions hipomòrfiques (o subexpressió) d'USP25m causaran un augment de la degradació de MyBPC1, generant filaments de miosina més curts i desordenats. De la mateixa manera, mutacions hiperomòrfiques (o sobreexpressió) d'USP25m causaran acumulació de MyBPC1, que seran responsables de la creació de filaments de miosina més llargs i gruixuts i, alhora, desorganitzats.

A més, tant la MyBPC1 com la FLNC són proteïnes d'unió als filaments d'actina, formant part dels macrocomplexos sarcomèrics. Petites diferències estequiomètriques poden resultar additives i, en última instància, fatals per l'estructura del múscul. Per tant, variacions subtils dels nivells d'expressió d'USP25m o de la seva afinitat pels substrats pot alterar, de manera sinèrgica, el *pool* d'actina monomèrica o la dinàmica de polimerització dels filaments primis i gruixuts.

3.4. Altres interaccions proteïques amb USP25m

Una taula completa dels clons interaccionants amb USP25m es pot veure a l'apartat de resultats suplementaris del capítol 1. Algunes de les interaccions trobades es discuteixen amb més profunditat als apartats 6, 7 i 8.

§§

4. CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL D'USP25 I USP25m

Les eines bioinformàtiques disponibles *on line* ens van semblar un bon punt de partida per a la caracterització estructural d'USP25. Ja sabem que consta de cinc motius conservats, que formen els dos dominis DUB o USP propis dels enzims deubiquitinants. El primer d'aquests motius conté una cisteïna (Cys-178), crucial per a l'activitat enzimàtica de les cisteïna-proteases. Hem demostrat que USP25 és, realment, una cisteïna-proteasa, ja que en mutar l'esmentada cisteïna per una serina (mutant C178S) es perd la seva activitat catalítica (en assajos *in vitro*). La construcció del mutant C178S ens proporciona una valuosa eina per a l'estudi funcional d'USP25, ja que ens permet discriminar quins efectes fisiològics són deguts a la seva activitat enzimàtica i quins són provocats per altres factors, com ara interacció proteïna-proteïna, canvis conformacionals, etc.

L'anàlisi *in silico* de l'estructura secundària d'USP25 prediu una distribució principalment d'hèlixs α i regions *coiled coil*. El fet de no trobar gaires làmines β ens indica que, molt probablement, es tracta d'una proteïna soluble. La majoria de làmines β presents es troben en el domini DUB1, fet que concorda amb les estructures provinents de dades cristal·logràfiques publicades de dominis catalítics d'altres enzims deubiquitinants (Hu i col., 2002; Hu i col., 2005).

Els dominis *coiled coil* estan formats per un nombre variable d'hèlixs α (generalment de dos a cinc) que giren de manera superposada unes al voltant de les altres, formant un "super-gir" (Mason i Arndt, 2004). La presència de nombroses hèlixs α i regions *coiled coil* en USP25, suggerida per diversos programes disponibles *on line*, fa pensar en una estructura enriquida en dominis *coiled coil*. De fet, el programa "COILS" (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), mitjançant comparacions amb una base de dades de dominis *coiled coil* confirmats experimentalment, prediu, amb elevada fiabilitat, l'existència de tres d'aquests dominis que s'estenen al llarg de la zona central de la proteïna. Els dominis *coiled coil* es troben sovint en proteïnes del cito- i del nucleoesquelet, entre d'altres, degut a que proporcionen interaccions proteïna-proteïna que serveixen de bastida a l'hora d'organitzar sistemes motors o membranosos (Rose i Meier, 2004). Algunes de les proteïnes motores, com la miosina o la kinesina, també contenen aquest tipus de motius (Cohen, 1998) i, per tant, es pot especular un possible paper d'USP25 en la funció muscular mitjançant interaccions amb aquestes proteïnes, que podrien servir per regular d'alguna manera la seva funció controlant els seus nivells d'ubiquitinació, o bé senzillament per reclutar-les i localitzar-les correctament.

5. MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS D'USP25

Altres programes disponibles a la xarxa ens permeten predir, amb la cautela corresponent als resultats dels mètodes *in silico*, l'existència de nombrosos llocs de fosforilació al llarg de la seqüència peptídica d'USP25. Tanmateix, hem demostrat experimentalment que USP25m es fosforila en tirosines i en serines o treonines, d'una manera independent de la seva activitat enzimàtica, ja que tant la proteïna mutada al residu Cys catalític com la catalíticament activa, produeixen un patró similar.

És ben sabut que la fosforilació és una modificació posttraduccional capaç d'afectar la funció proteica en resposta a senyals externs (com ara estimulació mitjançant factors de creixement), o interns (com el dany al DNA). L'afectació de la funció pot ésser deguda a un canvi conformacional en el substrat que modifica l'activitat catalítica, o a la creació de superfícies d'interacció proteïna-proteïna que recluten proteïnes reguladores (Pawson i Scott, 2005). Fins ara s'ha descrit un altre cas d'enzim deubiquitinant modificat per fosforilació: CYLD, un DUB específic de cadenes de poliubiquitina enllaçades per Lys63 i que, en cas d'estar mutat, causa cilindromatosi familiar, es fosforila mitjançant la quinasa IKK. La fosforilació de CYLD desemboca en la seva inactivació (Reiley i col., 2005). Ara ens manca desentrellar l'efecte concret de la fosforilació en USP25, i les condicions fisiològiques en les quals es dona.

Experimentalment, hem demostrat també que USP25m es pot acetilar, ubiquitinar i sumoïlar. De la mateixa manera que la fosforilació, aquestes es donen independentment de l'activitat enzimàtica d'USP25m, ja que en fer servir el mutant catalític C178S, les modificacions no es veuen alterades. Remarcablement, però, la ubiquitinació d'USP25m és molt més pronunciada en el mutant catalíticament inactiu C178S. Aquest resultat suggereix que la isoforma salvatge, amb la cisteïna activa, s'autodeubiquitina, fet que dificulta la detecció de les formes ubiquitinades. Experiments similars s'han realitzat amb l'enzim deubiquitinant USP6 (Shen i col., 2005). En aquest cas, Shen i col·laboradors detectaren la presència d'una banda de pes molecular més elevat només en utilitzar una variant d'*splicing* que codificava per una isoforma més curta que no disposava del domini catalític (l'ús de la proteïna salvatge emmascarava els resultats degut a la pròpia autodeubiquitinació de l'enzim). Van verificar els resultats gràcies a la construcció d'un mutant puntual on la cisteïna conservada va ser substituïda per una serina (equivalent al nostre mutant USP25 C178S).

L'autodeubiquitinació com a mecanisme regulador no és sorprenent, tenint en compte que diverses E3s regulen els seus nivells i la seva activitat mitjançant la seva pròpia activitat Ub-lligasa. Aquest és el cas, entre d'altres, de l'autoubiquitinació

de l'heterodímer format per les lligases BRCA1/BARD1 que, segons Chen i col·laboradors, enlloc de conduir a degradació, estabilitza el complex i intervé en vies de senyalització encara per determinar (Chen i col., 2002a). Nrdp1 (ligasa E3 que controla els nivells de ErbB3 i ErbB4 mitjançant ubiquïtinació per Lys48), en canvi, sí que regula els seus nivells per autoubiquïtinació. Curiosament, endemés, una de les proteïnes interaccionants amb Nrdp1 és USP8 que, mitjançant deubiquïtinació, afavoreix la seva estabilitat (Wu i col., 2004).

En el cas de l'autodeubiquïtinació d'USP6, cal esmentar que de no haver estat per l'ús d'una construcció catalíticament inactiva, Shen i col·laboradors no haurien detectat la ubiquïtinació d'aquest DUB. Tanmateix, aquest fet posa de manifest la subtilesa de les modificacions mitjançant Ub i la dificultat en la seva detecció. En la majoria de casos, un substrat ubiquïtinat constitueix un percentatge baix de la quantitat total de substrat. A més, en condicions fisiològiques, la ubiquïtinació és un fenomen altament dinàmic, on l'equilibri entre ubiquïtinació i deubiquïtinació està finament regulat per multitud de factors cel·lulars. El processament dels cultius cel·lulars per analitzar estats d'ubiquïtinació sovint requereix tractaments dràstics amb tamps de lisi, causant estressos irreversibles a les cèl·lules que dificulten, encara més, la detecció dels substrats ubiquïtinats. No és estrany, doncs, que a mesura que s'aprofundeixi en l'estudi dels mecanismes de regulació dels DUBs, es trobin més casos d'USPs que es modifiquin mitjançant ubiquïtinació. Els efectes d'aquestes modificacions, però, romanen encara incerts.

En els últims anys la llista de proteïnes multimodificades va augmentant ràpidament. Sembla que hi ha una correlació entre la multiplicitat dels llocs de modificació d'una determinada proteïna, la seva importància biològica i la complexitat de l'organisme (Yang, 2005). Segons aquesta hipòtesi, la funció que exerciria USP25 seria crucial a la cèl·lula, donades les seves nombroses modificacions posttraduccionals. De fet, ara s'obre un nou camp d'investigació, ja que s'hauria de provar l'efecte que tenen cadascuna d'aquestes modificacions en l'activitat enzimàtica, el reconeixement de substrats, la localització subcel·lular o la capacitat de dimerització (dades preliminars obtingudes per l'estudiant de doctorat Amanda Denuc mostren que USP25 és capaç de formar homodímers). Una altra contribució interessant seria determinar l'estat de modificació de la isoforma muscular d'USP25 al llarg de la miogènesi. De moment no sabem quina o quines són les formes actives, ni si les formes actives consten de les mateixes modificacions en els diferents teixits o estadis de diferenciació.

Tot i això, hem de tenir en compte que ens endinsem en un nou camp, ja que la rellevància fisiològica de les modificacions múltiples roman bastant incerta. És lògic pensar que l'ús combinat de la fosforilació, l'acetilació, la ubiquïtinació i la sumoïlació, entre d'altres, contribueix en un grau elevat en la complexitat biològica, potencialment exercint efectes de tipus "interruptor" o també de gradient. Tenint en

compte les possibles combinacions en funció del tipus de modificació i del residu modificat, apareixen nombroses isoformes que, potencialment, poden posseir una activitat i/o preferència de substrat diferent. Alguns autors comparen aquesta diversitat amb la generada per modificació posttranscripcional de l'mRNA (Pawson i Scott, 2005). En combinar ambdós tipus de modificacions, el nombre d'“isoformes proteiques” presents en un organisme augmenta exponencialment, explicant, en part, la gran complexitat fisiològica dels eucariotes superiors.

§§

6. ELS DOMINIS D'UNIÓ A UBIQUÏTINA

Els programes disponibles a la xarxa com Pfam, SMART o INTERPRO són sovint molt útils per determinar la presència de dominis prèviament descrits en una seqüència peptídica. De nou, s'ha d'anar amb compte amb aquests resultats perquè, tot i que aquests programes només mostren *hits* significatius, no tots els valors obtinguts són 100% fiables. En alguns casos no s'obtenen dominis reals, i en d'altres els dominis obtinguts no són certs.

Per aquest motiu vam decidir escrutar la presència de dominis d'USP25 en les tres bases de dades. Els resultats obtinguts van ser concordants: es va detectar un domini UBA (*ubiquitin associated domain*) i dos dominis UIM (*ubiquitin interacting motif*) a l'extrem N-terminal de la proteïna.

Els UBA i UIM són dominis modulars que interaccionen no covalentment amb la Ub (UBDs, *Ubiquitin binding domains*) (Buchberger, 2002; Hicke i col., 2005). El descobriment de l'existència d'aquests dominis, ara fa una dècada, marcava l'inici de l'estudi dels mecanismes bioquímics de senyalització mitjançant ubiquïtina, atès que fins aquell moment no s'entenia la multiplicitat de destins que podia tenir un substrat ubiquïtinat (proteòlisi, localització subcel·lular, endocitosi, etc.). La presència d'UBDs en USP25 ens proporciona pistes dels modes de reconeixement d'aquest enzim deubiquïtinant pels seus substrats.

La majoria d'estudis indiquen que els dominis UBDs, entre ells els UBA i els UIM, interaccionen amb la ubiquïtina (Polo i col., 2002; Davies i col., 2004; Trempe i col., 2005). Tot i que molts conclouen que tenen major afinitat per monoubiquïtina, existeixen evidències de que no existeix una norma general (Mueller i col., 2004) i, és important destacar, també, que existeixen membres de diverses famílies d'UBDs que sembla que no interaccionen amb la ubiquïtina, dels quals encara no s'ha demostrat la funció (Meyer i col., 2002; Miller i col., 2004). Tanmateix, nombrosos treballs demostren que un UIM és necessari i suficient per ubiquïtinació, ja que una fusió peptídica GST-UIM resulta en ubiquïtinació de la proteïna quimera (Oldham i col., 2002; Miller i col., 2004). També existeix certa controvèrsia en aquesta matèria ja que, mentre que la majoria d'autors defensen que els UIM promouen monoubiquïtinació (Klapisz i col., 2002; Polo i col., 2002), d'altres troben una barreja de mono-, multi-, i poliubiquïtinació (Miller i col., 2004). Aquest fet podria explicar-se degut a que en aquest últim treball, els estudis es van realitzar amb experiments d'Ub sobreexpressada i, per tant, pot ser que no reflecteixen el que succeeix en condicions fisiològiques.

Com que ja havíem vist que USP25 pot ser ubiquïtinat i sumoïlat, ens vam proposar avaluar l'efecte dels dominis UBA i UIM d'USP25 en aquestes modificacions

posttraduccional. Sorprenentment, vam veure que la deleció d'un o varis UBDs no alterava els nivells de proteïna modificada (ubiquitinada o sumoïlada). Per tant, les conclusions directes són que i) els llocs d'ubiquitinació i de sumoïlació no es troben a l'extrem N-ter d'USP25, tot i que en casos s'ha vist que en situacions de sobreexpressió d'Ub/SUMO i de manca de la Lys acceptora, residus de Lys addicionals presents al substrat poden servir de punt de modificació (C. Hecker, F. Melchior, no publicat) i ii), aquests dominis no semblen determinants per a la ubiquitinació/sumoïlació a d'altres regions d'USP25.

Curiosament, la presència de l'UIM2, només en aquells casos en que s'havia delectat algun altre UBD, inhibia lleugerament la sumoïlació d'USP25. Aquestes observacions són difícils d'interpretar, ja que si assumim un rol inhibitori d'UIM2 en la sumoïlació d'USP25, la sumoïlació de la proteïna sencera també s'hauria de veure disminuïda. Els resultats s'expliquen, però, si assignem a UBA i UIM1 una funció positiva en la sumoïlació, i negativa a UIM2. Aleshores, només en aquells casos on manqui UBA o UIM1, però en presència d'UIM2, es veurà afectada la sumoïlació de la proteïna. Aquesta hipòtesi requereix ser verificada mitjançant experiments addicionals, com per exemple l'estudi amb dominis UBA i UIM aïllats (que evita l'emascament degut a interaccions intraproteïques cooperatives o sinèrgiques). S'ha de tenir en compte, però, que el context que aporta la resta de la proteïna facilita el comportament fisiològic dels dominis, i els riscos artefactuals són menors.

Un d'aquests estudis amb UBDs aïllats va ser dut a terme per Miller i col·laboradors. Van fer una anàlisi descriptiva de la funció de diversos UIMs en la ubiquitinació i la unió a substrats ubiquitinats (Miller i col., 2004). Un dels UIMs que van fer servir en el seu treball era l'UIM2 d'USP25. Van determinar que en coexpressar en bacteris una fusió d'aquest UIM amb YFP (proteïna groga fluorescent), i Ub, i en presència d'un extracte cel·lular, es provocava la ubiquitinació de la proteïna quimera heteròloga. Segons aquest treball, doncs, l'UIM2 sí afectaria la ubiquitinació del substrat proteic on es trobés integrat.

El treball anteriorment esmentat (Miller i col., 2004), determina nivells molt baixos d'ubiquitinació dependent de l'UIM2 d'USP25, unes deu vegades inferiors als observats amb altres fusions artificials com per exemple YFP amb l'UIM d'Eps15. Nosaltres hem detectat una disminució lleugera de la sumoïlació d'USP25 dependent d'UIM2. La ubiquitinació dependent d'aquest domini reportada per Miller i col·laboradors podria resultar en una inhibició de la sumoïlació. Per aquest motiu els nivells de proteïna sumoïlada incrementen en delectar l'UIM2. De nou, convindria avaluar cada domini per separat per dilucidar l'efecte de cadascun d'ells en les modificacions posttraduccional d'USP25.

Les nostres aproximacions experimentals, però, evidencien la ubiquitinació d'USP25 independentment de l'efecte de l'UBA o els UIMs, atès que hom detecta

aquesta modificació fins i tot en absència dels tres UBDs. Per tant, altres senyals o motius presents a la seqüència peptídica d'USP25 són responsables de que un o varis monòmers d'Ub s'hi enllacin. Possiblement alguna dels centenars de lligases E3 d'ubiquitina és una proteïna interaccionant d'USP25, encarregada de la seva ubiquitinació.

En aquest sentit, l'aproximació de cerca d'interaccions proteïques amb USP25 ens ha resultat molt útil: dos dels clons interaccionants amb USP25m corresponen a la Makorina. Aquesta és una lligasa E3 d'Ub de tipus *ring finger* que regula la longitud dels telòmers mitjançant la ubiquitinació de la subunitat catalítica hTERT de la telomerasa (Kim i col., 2005). Possiblement, la Makorina és una de les lligases encarregades d'ubiquitar USP25, gràcies a la formació de complexos transitoris o estables. Existeixen altres casos d'interacció entre una lligasa E3 d'Ub i un DUB, entre ells, el de Nrdp1 i USP8 (Wu i col., 2004), que ja hem comentat anteriorment. El més documentat, però, és el referent a HAUSP/USP7 i HDM2. HAUSP/USP7 deubiquitina específicament p53 i, alhora, HDM2 (ligasa E3 que ubiquitina p53) (Li i col., 2004). Encara no es coneix, però, si HDM2 ubiquitina HAUSP/USP7.

USP25 és només un dels substrats modificats alhora per ubiquitina i SUMO. De fet, cada dia augmenta el nombre de treballs documentant proteïnes que es conjuguen a ambdós tipus de modificadors, fins i tot usant la mateixa lisina (Ulrich, 2005). En la via de l'NF- κ B trobem dos exemples d'aquests tipus de substrats: l'inhibidor de la via I κ B α i la subunitat reguladora d'IKK, NEMO. La ubiquitinació d'I κ B α (inhibidor de NF- κ B) en els residus Lys21 i Lys22 senyalitza per degradació via proteasoma. Tanmateix, Lys21 és també una diana de sumoïlació. Quan I κ B α es troba sumoïlat en aquesta lisina, l'inhibidor no es pot ubiquitar i no serà degradat pel proteasoma, inhibint l'activació de la via de l'NF- κ B (Desterro i col., 1998). En aquest cas, Ub i SUMO actuen de manera competitiva, generant efectes contraris. En el cas de NEMO, en canvi, els dos tipus de modificació actuen de manera cooperativa: mentre la sumoïlació reté NEMO al nucli, es fosforila mitjançant ATM i llavors podrà ser ubiquitat i retornat al citoplasma (Huang i col., 2003). De moment no coneixem els efectes reguladors que exerceixen Ub i SUMO sobre USP25. Hipotèticament, similarment al que es dona en I κ B α , ubiquitinació i sumoïlació podrien competir per l'UIM2. D'altra banda, els resultats obtinguts en els experiments d'ubiquitinació i sumoïlació evidencien unes diferències de pes molecular compatibles amb l'addició d'una o dues molècules d'ubiquitina (observem una o dos bandes extremes, depenent de l'experiment), o bé una de SUMO. En cap cas, però, es detecten variacions en la mida compatibles amb l'enllaç d'una molècula d'Ub i una de SUMO, reforçant la hipòtesi de la competència.

Per aprofundir en els mecanismes reguladors d'USP25, un dels projectes que es durà a terme al nostre laboratori té com a objectiu determinar, mitjançant espectrometria de masses, les lisines acceptores de cada modificació. Aquests

experiments ens permetran saber si les modificacions es donen sobre un mateix residu, i alhora ens facilitaran dades sobre la naturalesa de les modificacions (tipus de cadena, nombre de modificacions, etc.). De fet, el grup de Frauke Melchior, a Alemanya, han trobat que l'activitat d'USP25 disminueix quan es troba conjugada a SUMO (resultats no publicats), i al nostre grup, l'experiment del doble híbrid ens va revelar que USP25 interacciona, de manera no-covalent, amb SUMO-2. Ara esperem, mitjançant la col·laboració d'ambdós grups, aprofundir en els mecanismes de regulació d'USP25 mitjançant modificacions post-traduccionals.

§§

7. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'USP25 AL LLARG DEL DESENVOLUPAMENT

USP25 és un enzim deubiquitinant però, fins a l'actualitat, en desconexem la seva rellevància fisiològica. Sabem que mitjançant *splicing* alternatiu es generen tres isoformes en humans i que, molt probablement, la seva activitat està regulada mitjançant diverses modificacions posttraduccionals. L'estudi de la localització subcel·lular d'una proteïna ens proporciona pistes de quin tipus de funció realitza l'enzim. Havíem triat el sistema muscular com a model per estudiar la funció d'USP25m. Tal i com ja hem esmentat anteriorment, aquesta isoforma no es detecta en l'estadi de mioblasts C2C12 indiferenciats, però s'expressa progressivament arribant a uns màxims entre el dia 5 i 6 de diferenciació. La isoforma genèrica USP25a s'expressa, en canvi, al llarg de tot el procés. Les immunolocalitzacions d'USP25 en aquest tipus cel·lular al llarg dels diferents estadis de diferenciació ens mostren tres fets particulars: i) la detecció durant els tres primers dies és pràcticament nul·la, ii) USP25 localitza predominantment a nucli en certs miotubs entre els dies 6 i 8 de diferenciació i iii), a partir del dia 9 de diferenciació, la localització torna a ésser citoplasmàtica i adopta un patró reticular.

7.1. Expressió d'USP25 durant els primers dies de diferenciació

Els estudis d'expressió d'RNA i de proteïna mitjançant PCR quantitativa a temps real i transferència Western, respectivament, evidencien expressió d'USP25 (però no d'USP25m) durant els primers estadis de la miogènesi en cèl·lules C2C12. Així i tot, les immunodeteccions no mostren una intensitat de senyal que correlacioni amb els nivells expressats. Aquest fet es podria explicar per una manca de detecció en cèl·lules de la isoforma genèrica d'USP25 amb l'anticòs policlonal emprat. Tanmateix, sabem que aquest no és el cas, ja que en cèl·lules COS-7 (de nivells endògens baixos d'USP25) que sobreexpressen l'esmentada isoforma s'obtenen bons nivells de detecció fent servir el mateix anticòs.

Tot i això, els nivells d'USP25 obtinguts mitjançant sobreexpressió són molt superiors als nivells endògens de proteïna (dades obtingudes mitjançant detecció en transferència Western). A més, és possible que el plegament de la proteïna endògena en mioblasts C2C12 sigui lleugerament diferent del de la proteïna exògena expressada en COS-7 o que els llocs antigènics no siguin tan accessibles (per interaccions amb altres proteïnes, etc.). Conjuntament, aquests dos fets explicarien la baixa detecció d'USP25 en els primers estadis de diferenciació muscular.

7.2. USP25m; una proteïna de localització nuclear?

En la família dels enzims deubiquitinants existeixen casos documentats on per *splicing* alternatiu es generen proteïnes amb diferent localització subcel·lular: UBP-t1 i UBP-t2, dues isoformes d'una USP específica de testicle, contenen extensions aminoterminals diferents responsables de la seva localització (UBP-t1 és nuclear, i UBP-t2 és citoplasmàtica) (Lin i col., 2000). La presència d'USP25 al nucli cel·lular, precisament en els estadis de diferenciació on l'expressió d'USP25 és més acusada, podria indicar que la isoforma muscular d'USP25m té una localització eminentment nuclear, i que, en canvi, la isoforma genèrica predomina al citoplasma. També podria ser, però, que mitjançant una modificació posttraduccional específica temporal o per interacció amb un *partner* particular pugui translocar al nucli.

Dades obtingudes d'experiments addicionals ens fan descartar aquestes hipòtesis: en sobreexpressar la isoforma muscular USP25m en cèl·lules COS-7, i immunodetectar amb l'anticòs policlonal, la localització d'USP25m és sempre citoplasmàtica. En cap cas detectem USP25m al nucli. A més, en miotubs posteriors a dia 8 de diferenciació la localització d'USP25 torna a ser únicament citoplasmàtica, i els nivells d'RNA i proteïna mostren que USP25m encara s'hi troba present. Hem d'assenyalar, també, que la localització nuclear d'USP25 en C2C12 diferenciants no és generalitzada, es dona només en algunes cèl·lules. Certament, podria ser que l'estat de totes les cèl·lules del cultiu no fos el mateix, i que en condicions d'estrès fisiològic generat durant la diferenciació, USP25 realitzés una funció nuclear. En aquest sentit, seria bo determinar quins factors cel·lulars són determinants a l'hora de modificar la localització d'USP25, i quins són els responsables de la seva translocació.

L'escrutini dels clons positius obtinguts amb el Y2H ens va revelar la interacció d'USP25m amb RanBP9 (o RanBPM). Aquesta és una de les proteïnes d'unió a Ran, i té una localització subcel·lular dinàmica, variant entre citoplasma i nucli. S'ha proposat que RanBP9 contribueix a la localització nuclear de Ran (Nishitani i col., 2001). A més, s'ha associat també a nombrosos fenòmens, entre ells la proliferació cel·lular i la viabilitat, gràcies a interaccions amb diversos *partners* (Wang i col., 2002; Johnson i col., 2006). Possiblement, la unió de RanBP9 a USP25m seria la responsable de la seva localització nuclear transitòria detectada durant la diferenciació muscular.

Cal esmentar que la cerca de senyals de localització nuclear mitjançant programes disponibles en xarxa (PredictNLS, <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>) ha resultat infructuosa.

7.3. Patró reticular d'USP25 en miotubs diferenciats

Les cèl·lules musculars estan dotades d'un citoesquelet elevadament complex, crític per a la seva activitat contràtil. Els filaments primers (d'actina), gruixuts (de filamina), de titina i de nebulina formen unes xarxes interconnectades i òptimament compenetrades que constitueixen el sarcòmer, la unitat bàsica repetitiva de les fibres musculars.

Tots aquests sistemes moleculars filamentosos estan distribuïts amb un ordre cristal·lí, que queda palès fins i tot mitjançant microscòpia de camp clar, en forma d'alternança de bandes clares i fosques. Per aquest motiu el múscul esquelètic s'anomena també múscul estriat.

La localització subcel·lular d'USP25 en miotubs diferenciats apareix en forma d'estructura reticulada. Aquests resultats suggereixen que USP25m està formant part de la maquinària contràtil de la cèl·lula muscular. Nogensmenys, en seccions de múscul esquelètic de ratolí s'observa un patró estriat de la localització d'USP25, que corrobora el paper d'USP25(m) en la contracció muscular i/o la mioquènesi. Aquestes dades es veuen reforçades per l'experiment del doble híbrid, que demostra que USP25m interacciona amb elements estructurals de la fibra muscular.

§§

8. USP25 I CICLE CEL·LULAR

Diferents combinacions de ciclines i de quinases dependents de ciclines (CKD) són necessàries per una bona progressió del cicle cel·lular. De fet, l'activitat de cada CDK és controlada pels nivells de ciclines, així com pels nivells d'inhibidors específics de CDK (CKI). Els nivells d'expressió de les ciclines varien de manera periòdica al llarg del cicle cel·lular (per aquest motiu s'anomenen ciclines). La variació és deguda a una síntesi constant, combinada amb una proteòlisi que es dona en una finestra molt petita de temps, controlada pel UPS. Els inhibidors CKI també estan regulats pel proteasoma. No és d'estranyar, doncs, que nombroses lligases E3 d'Ub hagin estat catalogades com a oncogens o com a gens supressors de tumors, en funció de quins CKIs o ciclines ubiquïtinen (Nakayama i Nakayama, 2006).

Experiments inicials de transfeccions en C2C12 ens van permetre observar que aquelles cèl·lules que sobreexpressaven USP25m es dividien més lentament. Atès que moltes lligases E3 d'Ub, i també alguns DUBs, han estat relacionats amb el control del cicle cel·lular, els nostres resultats ens van induir a perseguir la hipòtesi d'un possible paper d'USP25m en la regulació de la proliferació o el creixement cel·lular.

Degut a la baixa eficiència de transfecció en C2C12 (5-10%), vam decidir enriquir la mostra en cèl·lules que expressessin USP25m mitjançant citometria de flux. Amb aquesta finalitat, vam transfectar una proteïna de fusió GFP-USP25m, i vam separar les cèl·lules positives per GFP d'aquelles que no eren fluorescents amb el citòmetre "separador" (*sorter*). En el mateix experiment, vam aprofitar per purificar també cèl·lules que expressaven els diferents mutants d'USP25m als quals s'havia deletat un o varis UBDs.

Per avaluar l'estat del cicle cel·lular, vam decidir determinar els nivells de proteïna de p21CIP1, un conegut marcador de l'aturada entre les fases G1 i S, ja que la seva inducció gairebé sempre condueix a un arrest, previ a la replicació del DNA (Gartel i Radhakrishnan, 2005). Sorprenentment, les cèl·lules que sobreexpressaven USP25m tenien uns nivells elevats de p21CIP1, mentre que era absent en cèl·lules que sobreexpressaven només GFP. Aquests resultats demostraven que USP25m és un enzim deubiquïtinant que causa una aturada del cicle cel·lular i confirmaven, sens dubte, les observacions inicials en que la població mixta inicial de cèl·lules transfectades i no transfectades es dividia més lentament. Alhora, ens explicaven perquè havia resultat impossible generar línies cel·lulars estables que sobreexpressessin USP25, probablement perquè les cèl·lules deixen de dividir-se o perquè un excés perllongat de proteïna esdevé tòxic.

Les cèl·lules que expressaven el mutant d'USP25m on s'hi havia delectonat tots els UBDs tenien, també, alts nivells de p21CIP1, tot i que l'increment era menor que en el cas de la proteïna salvatge. Aquesta observació apuntava cap a un efecte d'algun dels dominis d'unió a Ub en la regulació dels nivells de p21CIP1, malgrat encara fan falta experiments addicionals per concretar la contribució d'aquests dominis.

p21CIP1 és un inhibidor de les CDKs que té un paper crucial en el control del cicle. És una proteïna altament inestable, i es va demostrar que era un bon substrat de la lligasa E3 d'Ub SCF^{Skp2} (Bornstein i col., 2003). *In vivo*, els nivells màxims del complex SCF^{Skp2} s'assoleixen a l'inici de la fase S. Bornstein i col·laboradors suggereixen que per progressar de la fase G1 a la fase S és necessari que p21CIP1 sigui ubiquitinada, mitjançant el complex SCF^{Skp2}, i posteriorment degradada via proteasoma. Tot i això, la regulació dels nivells de p21CIP1 és bastant més complexa, ja que una versió d'aquesta proteïna en la qual s'han mutat totes les lisines (i per tant, no té llocs d'ubiquitinació), també és substrat del proteasoma (Bloom i col., 2003). Aquest fet s'explica gràcies a la formació d'una cadena d'Ub enllaçada a la metionina aminoterminal de p21CIP1, fenomen que es coneix amb el nom d'ubiquitinació a l'extrem N-terminal (Breitschopf i col., 1998). No es coneix encara si l'enzim responsable de formar aquest tipus de cadenes és també el complex SCF^{Skp2}.

Fins a l'actualitat no s'ha trobat cap enzim deubiquitinant encarregat d'hidrolitzar les cadenes d'Ub de p21CIP1. Tot i que l'expressió d'USP25m induïx l'acumulació de p21CIP1, amb les nostres dades no ens podem aventurar a afirmar que USP25m sigui l'enzim que realitza aquesta funció. Hem de remarcar que els nivells de p21CIP1 estan altament regulats a nivell transcripcional (Gartel i Radhakrishnan, 2005). Podria ser, doncs, que un dels substrats d'USP25m fos un factor de transcripció regulador de l'expressió de p21CIP1 com per exemple p53, Sp1/sp3, Smads, Aps, STATs, BRCA1, E2F-1 o C/EBP α/β .

El possible paper d'USP25 en el control del cicle cel·lular es veu reforçat pel recentment descrit efecte d'USP28 en el control de l'apoptosi en resposta al dany al DNA (Zhang i col., 2006). USP28 és un DUB que presenta una elevada homologia amb USP25 (Valero i col., 2001), i regula la resposta al dany al DNA a dos nivells: d'una banda, regula la claspina, proteïna que es fosforila en resposta al dany per radiació ionitzant (IR), i necessària per la resistència a aquesta radiació. D'altra banda, regula la via Chk2-p53, que controla l'apoptòsi. Zhang i col·laboradors hipotetitzen un efecte dual de mort i supervivència generat per USP28 (encara per mecanismes desconeguts) en situació de dany per IR i argumenten que, degut a la complexitat de la resposta fisiològica, els efectes específics sobre els substrats de l'enzim deubiquitinant són difícils de desentrellar (Zhang i col., 2006). Curiosament, en aquest treball fan servir USP25 com a control negatiu d'alguns experiments i

veuen que, en absència d'USP25 i presència de dany per IR, les cèl·lules no són tan resistents a l'apoptosi com aquelles en que s'ha inhibit USP28. Tot i això, hi ha un cert efecte de resistència a l'apoptosi en comparació amb les cèl·lules on no s'ha inhibit ni USP25 ni USP28, fet que donaria suport a una certa redundància funcional, que seria possible degut a l'elevada similitud de seqüència entre ambdues proteïnes.

§§

9. EPÍLEG: SÓN NECESSARIS MÉS D'UN CENTENAR D'ENZIMS DEUBIQUÏTINANTS?

Com ja hem esmentat diverses vegades al llarg d'aquesta tesi, existeixen cinc famílies d'enzims deubiquitinants, cadascuna d'elles constituïda (en humans) per un nombre variable de membres que oscil·la entre un i cinquanta. A aquesta gran complexitat hi hem d'afegir les diverses variants d'*splicing* presents per molts d'ells, amb o sense especificitat de teixit, i les possibles modificacions posttraduccionals que poden regular la seva funció. En el cas d'USP25, per exemple, hem demostrat que la isoforma que conté els exons 19a i 19b, té especificitat per substrats diferents a la isoforma que no els conté. La història es fa bastant més complicada quan es té en compte que alguns substrats, en canvi, són reconeguts per ambdues isoformes. A més, hem trobat que USP25 es modifica posttraduccionament i altres grups tenen indicis que aquestes modificacions poden afectar la seva funció deubiquitinant.

El camp de la ubiquitinació s'ha comparat freqüentment amb la fosforilació. Nombrosos processos cel·lulars es regulen mitjançant l'addició d'un grup fosfat en un o diversos estadis de la cascada de senyalització. A més, les quinases i les fosfatases sovint estan, alhora, regulades per fosforilació, constituint un sistema finament controlat gràcies a mecanismes de retroalimentació positiva o negativa. En conjunt, doncs, ens trobem davant d'un panorama similar al de la conjugació de monòmers d'Ub gràcies a les lligases E3 d'Ub i els DUBs. El camp de la fosforilació, però, ha estat objecte d'estudi dels últims cinquanta anys, mentre que tan sols fa poc més de vint anys que es va descriure el UPS i una dècada des que la ubiquitina es va relacionar amb processos de senyalització no degradatius.

Tanmateix, els mecanismes de senyalització mitjançant Ub estan resultant més complexos del que semblava inicialment. La Ub és un petit polipèptid de 76 aminoàcids que, en funció del nombre de monòmers i/o del residu de Lys que es fa servir per formar cadenes de poliubiquitina els efectes produïts seran diferents. La història es complica substancialment si, a més, es tenen en compte les UbLs. En els últims anys s'està observant que certes lligases determinen l'especificitat a l'hora de discernir entre els diferents tipus de modificació i que els DUBs, lluny de ser inespecífics i redundants com s'assumia anteriorment, tenen també un paper rellevant en el control de l'estat d'ubiquitinació. Aquesta especificitat i manca d'una inequívoca redundància funcional assumida inicialment es posa de manifest amb la recent aparició d'un article on es demostra l'efecte antiapoptòtic d'USP28, un DUB elevadament homòleg a USP25. Altres treballs referenciats durant aquesta tesi que descriuen l'aparició de desordres fisiològics deguts a mutacions puntuals en gens que codifiquen per DUBs reforçant la idea de l'elevada especificitat del sistema.

Una dada interessant és que, en només quatre anys, el nombre d'articles referents a enzims deubiquitinants de la base de dades *Pubmed* s'ha triplicat. Així i tot, encara són necessaris resultats referents als substrats i mecanismes de regulació de la majoria de DUBs. D'aquesta manera podrem arribar a comprendre el funcionament del sistema de manera global, ja que de moment només es coneix la punta de l'iceberg.

SS

CONCLUSIONS

1. Hem confirmat que USP25 és una cisteïna-proteasa de la família de les proteases específiques d'ubiquïtina, i que la cisteïna 178 és l'aminoàcid catalític.
2. La isoforma muscular de USP25, USP25m, interacciona específicament amb tres proteïnes sarcomèriques: MyBPC1, ACTA1 i FLNC.
3. USP25m s'expressa progressivament al llarg de la diferenciació muscular, coincidint amb el patró d'expressió de MyBPC1, ACTA1 i FLNC.
4. USP25 localitza principalment al citoplasma, tot i que durant la diferenciació muscular una part de la proteïna es transloca transitòriament als nuclis d'alguns miofibrils en formació.
5. MyBPC1 és una proteïna de vida mitjana curta que es degrada via proteasoma. USP25m induïx l'acumulació de MyBPC1, probablement mitjançant deubiquïtinació d'aquesta, i rescat de la degradació proteasomal.
6. La inhibició d'USP25 mitjançant interferència d'RNA provoca una disminució dels nivells d'ACTA1, per mecanismes encara desconeguts, no dependents de la seva degradació via proteasoma.
7. La localització d'USP25 en múscul esquelètic de ratolí presenta un patró estriat, que concorda amb la distribució de proteïnes estructurals del sarcòmer.
8. A més dels motius catalítics, USP25 conté dominis d'interacció amb la ubiquïtina: un domini UBA (aminoàcids 21-56) i dos motius UIMs (aminoàcids 97-113 i 124-140), a l'extrem aminoterminal de la proteïna.
9. Els dominis d'interacció a ubiquïtina d'USP25 intervien en el reconeixement dels seus substrats, de forma additiva o sinèrgica. El domini UBA és necessari per la interacció amb MyBPC1.
10. USP25 es modifica posttraduccionalment mitjançant ubiquïtinació, sumoilació, fosforilació i acetilació.
11. La sobreexpressió d'USP25m provoca una aturada del cicle cel·lular molt probablement en fase G1, evidenciada per la detecció de p21CIP1.

1. USP25 is a cysteine-protease belonging to the ubiquitin-specific protease family. The cysteine 178 is the catalytic residue.
2. The USP25 muscle isoform, USP25m, specifically interacts with three sarcomeric proteins: MyBPC1, ACTA1 and FLNC.
3. USP25m is expressed progressively throughout muscle differentiation, concurrently with the expression pattern of MyBPC1, ACTA1 and FLNC.
4. USP25 is mainly localized in the cytosol, although it is also transiently translocated to the nuclei of myotubes during muscle differentiation.
5. MyBPC1 is a short-lived proteasome substrate. USP25m over-expression induces MyBPC1 accumulation, most probably by deubiquitination and subsequent rescue from proteasome degradation.
6. RNAi mediated USP25 inhibition generates a decrease of ACTA1 levels through mechanisms yet unknown, albeit independent of proteasome degradation.
7. USP25 localizes following a striated pattern in mouse skeletal muscle, in agreement with the sarcomeric structural protein distribution.
8. Besides the catalytic motifs, USP25 harbors several ubiquitin-interacting domains at the N-terminus: one UBA domain (residues 21-56) and two UIM motifs (residues 97-113 and 124-140).
9. The USP25 ubiquitin interacting domains are involved, either additively or synergistically, in substrate recognition. The UBA domain appears to be required for MyBPC1 binding.
10. USP25 is post-translationally modified by ubiquitination, sumoylation, phosphorylation and acetylation.
11. USP25m over-expression induces cell cycle arrest, most probably in G1/S phase transition, as revealed by p21CIP1 detection.

REFERÈNCIES

A

- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D. i Hochstrasser, M. (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J*, **16**, 4826-4838.
- Amerik, A.Y. i Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Cell Res*, **1695**, 189-207.
- Amerik, A.Y., Li, S.J. i Hochstrasser, M. (2000a) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **381**, 981-992.
- Amerik, A.Y., Nowak, J., Swaminathan, S. i Hochstrasser, M. (2000b) The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*, **11**, 3365-3380.
- Antonarakis, S.E., Lyle, R., Dermitzakis, E.T., Reymond, A. i Deutsch, S. (2004) Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*, **5**, 725-738.

B

- Baek, K.H. (2003) Conjugation and deconjugation of ubiquitin regulating the destiny of proteins. *Exp Mol Med*, **35**, 1-7.
- Baker, R.T., Tobias, J.W. i Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J Biol Chem*, **267**, 23364-23375.
- Balakirev, M.Y., Tcherniuk, S.O., Jaquinod, M. i Chroboczek, J. (2003) Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep*, **4**, 517-522.
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K.R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R.S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I.W., Luga, V., Przulj, N., Robinson, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Jurisica, I. i Wrana, J.L. (2005) High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*, **307**, 1621-1625.

- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G. i Reed, S.I. (2001) UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol*, **8**, 417-422.
- Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., Weissman, S., Gerstein, M. i Snyder, M. (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science*, **306**, 2242-2246.
- Bignell, G.R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P.J., Lakhani, S.R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D.G., Schrandt-Stumpel, C., Beemer, F.A., van den Ouweland, A., Halley, D., Delpech, B., Cleveland, M.G., Leigh, I., Leisti, J., Rasmussen, S., Wallace, M.R., Fenske, C., Banerjee, P., Oiso, N., Chaggar, R., Merrett, S., Leonard, N., Huber, M., Hohl, D., Chapman, P., Burn, J., Swift, S., Smith, A., Ashworth, A. i Stratton, M.R. (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*, **25**, 160-165.
- Blau, H.M., Chiu, C.P. i Webster, C. (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, **32**, 1171-1180.
- Blencowe, B.J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell*, **126**, 37-47.
- Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. i Pagano, M. (2003) Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell*, **115**, 71-82.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. i Glass, D.J. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704-1708.
- Borden, K.L. i Freemont, P.S. (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 395-401.
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M. i Hershko, A. (2003) Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*, **278**, 25752-25757.
- Bounpheng, M.A., Dimas, J.J., Dodds, S.G. i Christy, B.A. (1999) Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J*, **13**, 2257-2264.

- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Coughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A.M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M.A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A.C., Jackson, D.B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. i Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, **6**, 97-105.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. i Ciechanover, A. (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J*, **17**, 5964-5973.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M. i Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, **424**, 797-801.
- Buchberger, A. (2002) From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol* **12**, 216-221.

C

- Cao, P.R., Kim, H.J. i Lecker, S.H. (2005) Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 2088-2097.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. i Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, **243**, 1576-1583.
- Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T. i Pan, Z.Q. (2002a) Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **277**, 22085-22092.
- Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G. i Madura, K. (2001) Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep*, **2**, 933-938.
- Chen, X., Zhang, B. i Fischer, J.A. (2002b) A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. *Genes Dev*, **16**, 289-294.
- Ciechanover, A. i Ben-Saadon, R. (2004) N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, **14**, 103-106.
- Clague, M.J. i Urbe, S. (2006) Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol*.

- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. i Gregorio, C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 637-706.
- Cohen, C. (1998) Why fibrous proteins are romantic. *J Struct Biol*, **122**, 3-16.
- Combaret, L., Adegoke, O.A.J., Bedard, N., Baracos, V., Attaix, D. i Wing, S.S. (2004) USP19 is a ubiquitin specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. *AJP - Endocrinol Metab*, 00281.
- Costa, C.F., Rommelaere, H., Waterschoot, D., Sethi, K.K., Nowak, K.J., Laing, N.G., Ampe, C. i Machesky, L.M. (2004) Myopathy mutations in {alpha}-skeletal-muscle actin cause a range of molecular defects. *J Cell Sci*, **117**, 3367-3377.
- Costelli, P. i Baccino, F.M. (2003) Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **6**, 407-412.
- Coupier, I., Cousin, P.Y., Hughes, D., Legoix-Ne, P., Trehin, A., Sinilnikova, O.M. i Stoppa-Lyonnet, D. (2005) BAP1 and breast cancer risk. *Fam Cancer*, **4**, 273-277.

D

- Dantuma, N.P., Groothuis, T.A., Salomons, F.A. i Neefjes, J. (2006) A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol*, **173**, 19-26.
- Davies, G.C., Ettenberg, S.A., Coats, A.O., Mussante, M., Ravichandran, S., Collins, J., Nau, M.M. i Lipkowitz, S. (2004) Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b. *Oncogene*, **23**, 7104-7115.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. i Hay, R.T. (1998) SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*, **2**, 233-239.
- Di Fiore, P.P., Polo, S. i Hofmann, K. (2003) When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 491-497.
- DiAntonio, A., Haghghi, A.P., Portman, S.L., Lee, J.D., Amaranto, A.M. i Goodman, C.S. (2001) Ubiquitination-dependent mechanisms regulate synaptic growth and function. *Nature*, **412**, 449-452.

E

- Emre, N.C., Ingvarsdottir, K., Wyce, A., Wood, A., Krogan, N.J., Henry, K.W., Li, K., Marmorstein, R., Greenblatt, J.F., Shilatifard, A. i Berger, S.L. (2005) Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell*, **17**, 585-594.
- Engidawork, E. i Lubec, G. (2003) Molecular changes in fetal Down syndrome brain. *J Neurochem*, **84**, 895-904.
- Evans, P.C., Smith, T.S., Lai, M.J., Williams, M.G., Burke, D.F., Heyninck, K., Kreike, M.M., Beyaert, R., Blundell, T.L. i Kilshaw, P.J. (2003) A novel type of deubiquitinating enzyme. *J Biol Chem*, **278**, 23180-23186.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. i Parkinson, J. (1997) A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J*, **16**, 1519-1530.

F

- Falquet, L., Paquet, N., Frutiger, S., Hughes, G.J., Hoang-Van, K. i Jatou, J.C. (1995) A human de-ubiquitinating enzyme with both isopeptidase and peptidase activities in vitro. *FEBS Letters*, **359**, 73-77.
- Fang, S. i Weissman, A.M. (2004) A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1546-1561.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., McCall, A., Canal, I., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y. i Botas, J. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101-106.
- Finley, D. i Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*, **7**, 25-69.
- Freemont, P.S. (2000) RING for destruction? *Curr Biol*, **10**, 84-87.
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. i Kobayashi, H. (2002) Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **99**, 745-750.

G

- Galan, J.M. i Haguenaer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J*, **16**, 5847-5854.
- Gardiner, K. i Costa, A.C. (2006) The proteins of human chromosome 21. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **142**, 196-205.
- Gardrat, F., Montel, V., Raymond, J. i Azanza, J.L. (1997) Proteasome and myogenesis. *Mol Biol Rep*, **24**, 77-81.
- Gartel, A.L. i Radhakrishnan, S.K. (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, **65**, 3980-3985.
- Gautel, M., Furst, D.O., Cocco, A. i Schiaffino, S. (1998) Isoform transitions of the myosin binding protein C family in developing human and mouse muscles: lack of isoform transcomplementation in cardiac muscle. *Circ Res*, **82**, 124-129.
- Gewies, A. i Grimm, S. (2003) UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. *Cancer Res.*, **63**, 682-688.
- Glickman, M.H. i Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Gnesutta, N., Ceriani, M., Innocenti, M., Mauri, I., Zippel, R., Sturani, E., Borgonovo, B., Berruti, G. i Martegani, E. (2001) Cloning and characterization of mouse UBP_y, a deubiquitinating enzyme that interacts with the ras guanine nucleotide exchange factor CDC25(Mm)/Ras-GRF1. *J Biol Chem*, **276**, 39448-39454.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A. i Goldberg, A.L. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14440-14445.
- Gong, L., Kamitani, T., Millas, S. i Yeh, E.T. (2000) Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins. *J Biol Chem*, **275**, 14212-14216.
- Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L.J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. i Loda, M. (2004) The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, **5**, 253-261.

H

- Haglund, K. i Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*, **24**, 3353-3359.
- Hamilton, B., Dong, Y., Shindo, M., Liu, W., Odell, I., Ruvkun, G. i Lee, S.S. (2005) A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev*, **19**, 1544-1555.
- Hanna, J., Hathaway, N.A., Tone, Y., Crosas, B., Elsassner, S., Kirkpatrick, D.S., Leggett, D.S., Gygi, S.P., King, R.W. i Finley, D. (2006) Deubiquitinating enzyme ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*, **127**, 99-111.
- Heessen, S., Masucci, M.G. i Dantuma, N.P. (2005) The UBA2 domain functions as an intrinsic stabilization signal that protects Rad23 from proteasomal degradation. *Mol Cell*, **18**, 225-235.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A. i Berger, S.L. (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev*, **17**, 2648-2663.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. i Soto, C. (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J*, **22**, 5435-5445.
- Heyninck, K. i Beyaert, R. (2005) A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci*, **30**, 1-4.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hicke, L. i Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hicke, L., Schubert, H.L. i Hill, C.P. (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 610-621.
- Hochstrasser, M. (2006) Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell*, **124**, 27-34.
- Hofmann, K. i Bucher, P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci*, **21**, 172-173.

- Hofmann, K. i Falquet, L. (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci*, **26**, 347-350.
- Hofmann, R.M. i Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-653.
- Hong, S., Kim, S.J., Ka, S., Choi, I. i Kang, S. (2002) USP7, a ubiquitin-specific protease, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 298-306.
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.W., Gu, W., Cohen, R.E. i Shi, Y. (2002) Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, **111**, 1041-1054.
- Hu, M., Li, P., Song, L., Jeffrey, P.D., Chenova, T.A., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E. i Shi, Y. (2005) Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J*, **24**, 3747-3756.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H. i Miyamoto, S. (2003) Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*, **115**, 565-576.
- Huang, Y., Baker, R.T. i Fischer-Vize, J.A. (1995) Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene. *Science*, **270**, 1828-1831.

I

- Ideguchi, H., Ueda, A., Tanaka, M., Yang, J., Tsuji, T., Ohno, S., Hagiwara, E., Aoki, A. i Ishigatsubo, Y. (2002) Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J*, **367**, 87-95.

J

- Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C. i Rauscher, F.J., 3rd. (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING

- finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, **16**, 1097-1112.
- Jentsch, S., Seufert, W. i Hauser, H.P. (1991) Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim Biophys Acta*, **1089**, 127-139.
- Joazeiro, C.A. i Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. i Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Johnson, P.R., Swanson, R., Rakhilina, L. i Hochstrasser, M. (1998) Degradation signal masking by heterodimerization of MATA α 2 and MATA1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **94**, 217-227.
- Johnson, S.E., Winner, D.G., Jr. i Wang, X. (2006) Ran binding protein 9 interacts with Raf kinase but does not contribute to downstream ERK1/2 activation in skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 409-416.
- Johnston, S.C., Riddle, S.M., Cohen, R.E. i Hill, C.P. (1999) Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J*, **18**, 3877-3887.

K

- Kampa, D., Cheng, J., Kapranov, P., Yamanaka, M., Brubaker, S., Cawley, S., Drenkow, J., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Helt, G., Tammana, H. i Gingeras, T.R. (2004) Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*, **14**, 331-342.
- Kim, J.H., Park, K.C., Chung, S.S., Bang, O. i Chung, C.H. (2003) Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 9-18.
- Kim, J.H., Park, S.M., Kang, M.R., Oh, S.Y., Lee, T.H., Muller, M.T. i Chung, I.K. (2005a) Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev*, **19**, 776-781.
- Kim, J.K., Gabel, H.W., Kamath, R.S., Tewari, M., Pasquinelli, A., Rual, J.F., Kennedy, S., Dybbs, M., Bertin, N., Kaplan, J.M., Vidal, M. i Ruvkun, G. (2005b) Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science*, **308**, 1164-1167.

- Kim, K.I. i Zhang, D.E. (2003) ISG15, not just another ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 431-434.
- Klapisz, E., Sorokina, I., Lemeer, S., Pijnenburg, M., Verkleij, A.J. i van Bergen en Henegouwen, P.M. (2002) A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem*, **277**, 30746-30753.
- Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T. i Tanaka, K. (2004) A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J*, **23**, 1977-1986.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. i Courtois, G. (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, **424**, 801-805.
- Kunst, G., Kress, K.R., Gruen, M., Uttenweiler, D., Gautel, M. i Fink, R.H. (2000) Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res*, **86**, 51-58.

L

- Laney, J.D. i Hochstrasser, M. (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, **97**, 427-430.
- Larsen, C.N., Price, J.S. i Wilkinson, K.D. (1996) Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochem*, **35**, 6735-6744.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A.L.E.X., Gomes, M.A.R.C., Baracos, V.I.C.K., Bailey, J.A.M.E., Price, S.R., Mitch, W.E. i Goldberg, A.L. (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*, **18**, 39-51.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H. i Finley, D. (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell*, **10**, 495-507.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D. i Polymeropoulos, M.H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, **395**, 451-452.

- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G. i Masucci, M.G. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, **375**, 685-688.
- Li, M., Brooks, C.L., Kon, N. i Gu, W. (2004) A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell*, **13**, 879-886.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. i Gu, W. (2002a) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **416**, 648-653.
- Li, Z., Wang, D., Na, X., Schoen, S.R., Messing, E.M. i Wu, G. (2002b) Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 700-709.
- Lima, C.D. (2003) Regulating UBP-mediated ubiquitin deconjugation. *Structure*, **11**, 3-4.
- Lin, H., Keriél, A., Morales, C.R., Bedard, N., Zhao, Q., Hingamp, P., Lefrançois, S., Combaret, L. i Wing, S.S. (2000) Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures. *Mol Cell Biol*, **20**, 6568-6578.
- Lindon, C., Montarras, D. i Pinset, C. (1998) Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *J Cell Biol*, **140**, 111-118.
- Lindsten, K., de Vrij, F.M., Verhoef, L.G., Fischer, D.F., van Leeuwen, F.W., Hol, E.M., Masucci, M.G. i Dantuma, N.P. (2002) Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol*, **157**, 417-427.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z. i Lansbury, P.T., Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, **111**, 209-218.

M

- Madura, K. (2002) The ubiquitin-associated (UBA) domain: on the path from prudence to prurience. *Cell Cycle*, **1**, 235-244.
- Makarova, K.S., Aravind, L. i Koonin, E.V. (2000) A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. *Trends Biochem Sci*, **25**, 50-52.

- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E. i De Camilli, P. (2005) Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12700-12705.
- Martinu, L., Masuda-Robens, J.M., Robertson, S.E., Santy, L.C., Casanova, J.E. i Chou, M.M. (2004) The TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain protein TRE17 regulates plasma membrane-endosomal trafficking through activation of Arf6. *Mol Cell Biol*, **24**, 9752-9762.
- Mason, J.M. i Arndt, K.M. (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem*, **5**, 170-176.
- Mattick, J.S. i Makunin, I.V. (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, **15 Spec No 1**, R17-29.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. i Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- Mayer, A.N. i Wilkinson, K.D. (1989) Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochem*, **28**, 166-172.
- McCullough, J., Clague, M.J. i Urbe, S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol*, **166**, 487-492.
- McElhinny, A.S., Perry, C.N., Witt, C.C., Labeit, S. i Gregorio, C.C. (2004) Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci*, **117**, 3175-3188.
- Melchior, F., Schergaut, M. i Pichler, A. (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci*, **28**, 612-618.
- Meulmeester, E., Maurice, M.M., Boutell, C., Teunisse, A.F., Ovaa, H., Abraham, T.E., Dirks, R.W. i Jochemsen, A.G. (2005) Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell*, **18**, 565-576.
- Meyer, H.H., Wang, Y. i Warren, G. (2002) Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J*, **21**, 5645-5652.
- Miller, S.L., Malotky, E. i O'Bryan, J.P. (2004) Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation. *J Biol Chem*, **279**, 33528-33537.

- Minsky, N. i Oren, M. (2004) The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Mol Cell*, **16**, 631-639.
- Mueller, T.D. i Feigon, J. (2002) Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J Mol Biol*, **319**, 1243-1255.
- Mueller, T.D., Kamionka, M. i Feigon, J. (2004) Specificity of the Interaction between Ubiquitin-associated Domains and Ubiquitin. *J Biol Chem*, **279**, 11926-11936.
- Muratani, M. i Tansey, W.P. (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 192-201.

N

- Nakamura, T., Hillova, J., Mariage-Samson, R., Onno, M., Huebner, K., Cannizzaro, L.A., Boghosian-Sell, L., Croce, C.M. i Hill, M. (1992) A novel transcriptional unit of the *trc* oncogene widely expressed in human cancer cells. *Oncogene*, **7**, 733-741.
- Nakayama, K.I. i Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 369-381.
- Naviglio, S., Matteucci, C., Matoskova, B., Nagase, T., Nomura, N., Di Fiore, P.P. i Draetta, G.F. (1998) UBPY: a growth-regulated human ubiquitin isopeptidase. *EMBO J*, **17**, 3241-3250.
- Naze, P., Vuillaume, I., Destee, A., Pasquier, F. i Sablonniere, B. (2002) Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. *Neurosci Lett*, **328**, 1-4.
- Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q. i Pastore, A. (2005) The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10493-10498.
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K. i Bernards, R. (2005) A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
- Nishitani, H., Hirose, E., Uchimura, Y., Nakamura, M., Umeda, M., Nishii, K., Mori, N. i Nishimoto, T. (2001) Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene*, **272**, 25-33.

O

- Oakley, C.E., Hambly, B.D., Curmi, P.M. i Brown, L.J. (2004) Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res.*, **14**, 95-110.
- Oldham, C.E., Mohney, R.P., Miller, S.L., Hanes, R.N. i O'Bryan, J.P. (2002) The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol*, **12**, 1112-1116.
- Oliveira, A.M., Hsi, B.L., Weremowicz, S., Rosenberg, A.E., Dal Cin, P., Joseph, N., Bridge, J.A., Perez-Atayde, A.R. i Fletcher, J.A. (2004) USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. *Cancer Res*, **64**, 1920-1923.

P

- Papa, F.R., Amerik, A.Y. i Hochstrasser, M. (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, **10**, 741-756.
- Papa, F.R. i Hochstrasser, M. (1993) The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature*, **366**, 313-319.
- Park, K.C., Kim, J.H., Choi, E.J., Min, S.W., Rhee, S., Baek, S.H., Chung, S.S., Bang, O., Park, D., Chiba, T., Tanaka, K. i Chung, C.H. (2002) Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9733-9738.
- Pawson, T. i Scott, J.D. (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci*, **30**, 286-290.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pickart, C.M. i Eddins, M.J. (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol Cell Res*, **1695**, 55-72.
- Pickart, C.M. i Rose, I.A. (1985) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem*, **260**, 7903-7910.

- Polo, S., Confalonieri, S., Salcini, A.E. i Di Fiore, P.P. (2003) EH and UIM: endocytosis and more. *Sci STKE*, **2003**, re17.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. i Di Fiore, P.P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, **416**, 451-455.
- Pray, T.R., Parlati, F., Huang, J., Wong, B.R., Payan, D.G., Bennett, M.K., Issakani, S.D., Molineaux, S. i Demo, S.D. (2002) Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat*, **5**, 249-258.
- Puente, X.S. i Lopez-Otin, C. (2004) A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res*, **14**, 609-622.

R

- Rao, H. i Sastry, A. (2002) Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem*, **277**, 11691-11695.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. i Sun, S.C. (2005) Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase γ -dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 3886-3895.
- Ritchie, K.J. i Zhang, D.E. (2004) ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 237-246.
- Rose, A. i Meier, I. (2004) Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1996-2009.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J. i Urbe, S. (2006) The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem*, **281**, 12618-12624.
- Ryu, K.S., Lee, K.J., Bae, S.H., Kim, B.K., Kim, K.A. i Choi, B.S. (2003) Binding Surface Mapping of Intra- and Interdomain Interactions among hHR23B, Ubiquitin, and Polyubiquitin Binding Site 2 of S5a. *J Biol Chem*, **278**, 36621-36627.

S

- Sambrook, J.F., E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Font, M.F., Bosch-Comas, A., Gonzalez-Duarte, R. i Marfany, G. (2003) Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2769-2777.
- Scheel, H., Tomiuk, S. i Hofmann, K. (2003) Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, **12**, 2845-2852.
- Schlesinger, D.H., Goldstein, G. i Niall, H.D. (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochem*, **14**, 2214-2218.
- Schnell, J.D. i Hicke, L. (2003) Non-traditional Functions of Ubiquitin and Ubiquitin-binding Proteins. *J Biol Chem*, **278**, 35857-35860.
- Schwartz, D.C. i Hochstrasser, M. (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci*, **28**, 321-328.
- Seeler, J.S. i Dejean, A. (2001) SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene*, **20**, 7243-7249.
- Semple, C.A. (2003) The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res*, **13**, 1389-1394.
- Shapiro, B.L. (1975) Amplified developmental instability in Down's syndrome. *Ann Hum Genet*, **38**, 429-437.
- Shen, C., Ye, Y., Robertson, S.E., Lau, A.W., Mak, D.O. i Chou, M.M. (2005) Calcium/calmodulin regulates ubiquitination of the ubiquitin-specific protease TRE17/USP6. *J Biol Chem*, **280**, 35967-35973.
- Sieburth, D., Ch'ng, Q., Dybbs, M., Tavazoie, M., Kennedy, S., Wang, D., Dupuy, D., Rual, J.F., Hill, D.E., Vidal, M., Ruvkun, G. i Kaplan, J.M. (2005) Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature*, **436**, 510-517.
- Song, A., Wang, Q., Goebel, M.G. i Harrington, M.A. (1998) Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 4994-4999.
- Sparrow, J.C., Nowak, K.J., Durling, H.J., Beggs, A.H., Wallgren-Pettersson, C., Romero, N., Nonaka, I. i Laing, N.G. (2003) Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscul Disord*, **13**, 519-531.

- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. i Finley, D. (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, **102**, 67-76.
- Spencer, J.A., Eliazar, S., Ilaria, R.L., Jr., Richardson, J.A. i Olson, E.N. (2000) Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol*, **150**, 771-784.
- Swanson, K.A., Hicke, L. i Radhakrishnan, I. (2006) Structural Basis for Monoubiquitin Recognition by the Ede1 UBA Domain. *J Mol Biol*, **358**, 713-724.

T

- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H. i Hay, R.T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, **276**, 35368-35374.
- Taya, S., Yamamoto, T., Kanai-Azuma, M., Wood, S.A. i Kaibuchi, K. (1999) The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes Cells*, **4**, 757-767.
- Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Tsuchiya, T., Tanaka, K., Kanai-Azuma, M., Wood, S.A., Mattick, J.S. i Kaibuchi, K. (1998) The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol*, **142**, 1053-1062.
- Thompson, T.G., Chan, Y.M., Hack, A.A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H.G., McNally, E.M., Watkins, S. i Kunkel, L.M. (2000) Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol*, **148**, 115-126.
- Trempe, J.F., Brown, N.R., Lowe, E.D., Gordon, C., Campbell, I.D., Noble, M.E. i Endicott, J.A. (2005) Mechanism of Lys48-linked polyubiquitin chain recognition by the Mud1 UBA domain. *EMBO J*, **24**, 3178-3189.

U

- Ulrich, H.D. (2005) Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol*, **15**, 525-532.

V

- Valero, R., Bayes, M., Francisca Sanchez-Font, M., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Duarte, R. i Marfany, G. (2001) Characterization of alternatively spliced products and tissue-specific isoforms of USP28 and USP25. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0043.
- Valero, R., Marfany, G., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Gonzalez, G., Puellas, L. i Gonzalez-Duarte, R. (1999) USP25, a novel gene encoding a deubiquitinating enzyme, is located in the gene-poor region 21q11.2. *Genomics*, **62**, 395-405.
- van der Knaap, J.A., Kumar, B.R., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A.J., Karch, F. i Verrijzer, C.P. (2005) GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell*, **17**, 695-707.
- van der Ven, P.F., Obermann, W.M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K. i Furst, D.O. (2000) Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil Cytoskeleton*, **45**, 149-162.
- Varshavsky, A. (2005) Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 283-286.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. i Deshaies, R.J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-615.

W

- Wang, D., Li, Z., Messing, E.M. i Wu, G. (2002) Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem*, **277**, 36216-36222.
- Weissman, A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 169-178.
- Welchman, R.L., Gordon, C. i Mayer, R.J. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 599-609.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. i

- Dixit, V.M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, **430**, 694-699.
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. i Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*, **3**, 939-943.
- Wilkinson, K.D., Tashayev, V.L., O'Connor, L.B., Larsen, C.N., Kasperek, E. i Pickart, C.M. (1995) Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochem*, **34**, 14535-14546.
- Wilson, S.M., Bhattacharyya, B., Rachel, R.A., Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D.B., Fletcher, C.F., Miller, R.J., Copeland, N.G. i Jenkins, N.A. (2002) Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet*, **32**, 420-425.
- Witt, S.H., Granzier, H., Witt, C.C. i Labeit, S. (2005) MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, **350**, 713-722.
- Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C. i Carraway, K.L., 3rd. (2004) Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol Cell Biol*, **24**, 7748-7757.

Y

- Yaffe, D. i Saxel, O. (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*, **7**, 159-166.
- Yamashita, K., Shinohara, M. i Shinohara, A. (2004) Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11380-11385.
- Yang, X.J. (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene*, **24**, 1653-1662.
- Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G.N., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W. i Cohen, R.E. (2006) Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nat Cell Biol*, **8**, 994-1002.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F. i Ben-Neriah, Y. (1998) Identification of the receptor component of the I kappa B alpha-ubiquitin ligase. *Nature*, **396**, 590-594.

Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M. i Rechsteiner, M. (1998) Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem*, **273**, 5461-5467.

Z

Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T.W. i Elledge, S.J. (2006) A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*, **126**, 529-542.

