



Caracterización funcional de la interacción de la proteína p53 con la ubiquitina ligasa HERC2

Mónica Cubillos Rojas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Caracterización funcional
de la interacción de la proteína p53
con la ubiquitina ligasa HERC2**

Mónica Cubillos Rojas

Tesis Doctoral

2014

Introducción

1. La familia de proteínas HERC

La familia de las proteínas HERC comprende un grupo de seis proteínas caracterizadas por presentar en su estructura un dominio HECT (*Homologous to E6AP C-terminus*) y uno o varios dominios RLD (*RCC1-like domain*). Se han clasificado en dos subgrupos de acuerdo a su tamaño: las proteínas gigantes HERC (HERC1 y HERC2) y las pequeñas HERC (HERC3-6). En ratón solo se han identificado cinco miembros (HERC1 a 5). Las proteínas gigantes tienen un peso molecular de más de 500 kDa y en su estructura un dominio HECT y más de un dominio RLD. Las pequeñas, con un peso molecular de ~120 kDa, tienen un dominio HECT y un solo dominio RLD (Figura 11) (García-Gonzalo and Rosa, 2005; Hochrainer et al., 2005). La presencia del dominio HECT las ha permitido clasificar como proteínas ubiquitinas ligasas, aunque esta actividad sólo se ha observado en HERC2 (Al-Hakim et al., 2012; Izawa et al., 2011; Kang et al., 2010; Wu et al., 2010).

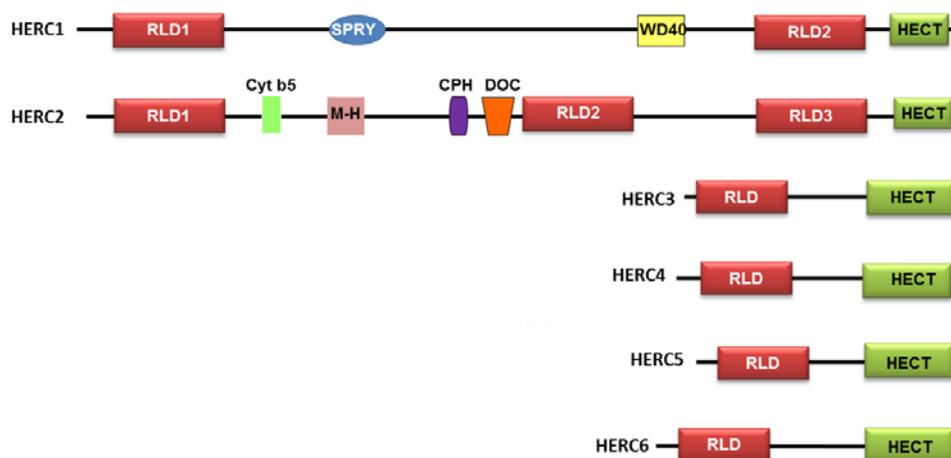


Figura 11. Familia de proteínas HERC en el humano. Las proteínas HERC son clasificadas en dos subfamilias: las HERC gigantes (HERC1 y HERC2) y las HERC pequeñas (HERC3, HERC4, HERC5 y HERC6). Todas presentan un dominio HECT en el extremo C-terminal. Las gigantes presentan más de un dominio RLD y las pequeñas solo uno.

1.1 El dominio RLD

Los dominios RLD son aquellos que presentan una alta homología con la proteína RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*). Se caracterizan por presentar siete repeticiones de 51-68 aminoácidos, originando dominios entre 350 y 450 aminoácidos, aunque excepcionalmente pueden tener tamaños de hasta 523 aminoácidos (Hadjebi et al., 2008). Mediante cristalografía de rayos X de RCC1, se ha descrito que cada una de las siete repeticiones corresponde a cada uno de

los siete lados de un dominio con simetría heptagonal formado por cadenas beta, asemejándose a una hélice de siete aspas (Renault et al., 1998; Renault et al., 1999) (Figura I2A).

La primera proteína descrita con dominios RLD fue la propia RCC1 en 1987. Una mutación en *RCC1* era la causa del fenotipo sensible a la temperatura en la línea celular de hámster ts-BN2, causando la condensación prematura de cromosomas y parada del ciclo celular en la fase G1. Este fenotipo se podía rescatar con la introducción de una copia *wild-type* de *RCC1* (Ohtsubo et al., 1987). Más adelante se encontró que RCC1 activaba a Ran (*Ras-related nuclear protein*), una proteína de unión a GTP que cataliza el intercambio de nucleótidos de guanina (actividad GEF: *guanine nucleotide exchange factor*), regulando procesos como el ciclo celular y el transporte nucleocitoplasmático (Seki et al., 1996). La creación de un gradiente de RanGTP por RCC1 también se ha observado en la nucleación de los microtúbulos, el ensamblaje del huso mitótico y la envoltura nuclear (Carazo-Salas et al., 1999; Clarke and Zhang, 2001; Clarke and Zhang, 2008; Hetzer et al., 2000; Kalab et al., 1999). Ran es una proteína principalmente soluble y está concentrada en el núcleo por un mecanismo de importación nuclear en el cual participa NTF2 (*Nuclear transport factor 2*), una proteína que interactúa principalmente con RanGDP (Ribbeck et al., 1998). RanGTP se forma en el núcleo cuando la interacción con RCC1 cataliza el intercambio de GDP por GTP y viceversa (Renault et al., 2001). Además, RCC1 puede interactuar con la cromatina, una asociación regulada a su vez por la interacción con Ran. RCC1 se une a las histonas H2A y H2AB, lo cual aumenta su actividad sobre Ran (Nemergut et al., 2001)(Figura I2B).

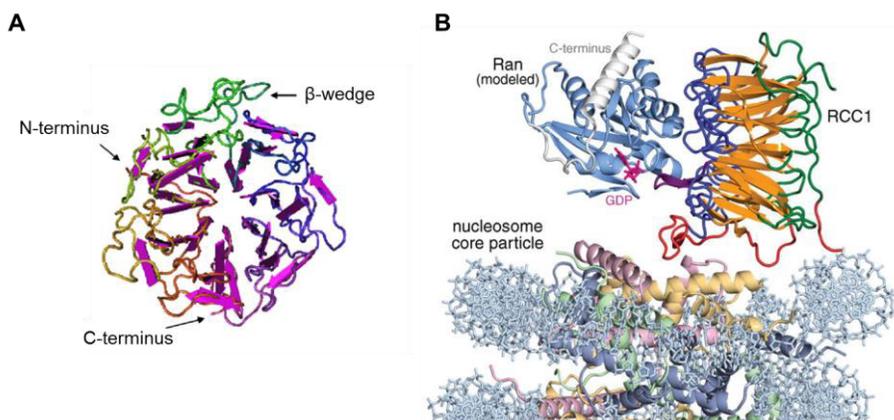


Figura I2. Estructura del dominio RLD de RCC1. (A). Estructura del dominio RLD de RCC1, donde se observan la simetría heptagonal con siete aspas, la cuña β (β wedge) necesaria para la interacción con Ran y los extremos N y C-terminal que se unen a las histonas. (B). Modelo de la interacción entre Ran-RCC1-nucleosoma, donde RCC1 simultáneamente actúa como un GEF sobre Ran e interacciona con el nucleosoma mediante las histonas H2A y H2B. (Adaptado de Makde et al. 2010).

Se conocen cerca de veinte proteínas con dominios RLD que pueden dividirse en cinco subgrupos según sus características estructurales: (1) subgrupo RCC1, (2) subgrupo HERC, (3) subgrupo RCBTB, (4) subgrupo quinasa y (5) el subgrupo miscelánea, que incluye a todas las proteínas que no pueden clasificarse en uno de los otros cuatro subgrupos (Hadjebi et al., 2008). Las diversas funciones que se conocen para cada una de ellas se muestran en la tabla I1.

Tabla I1. La superfamilia de las proteínas RLD

	Miembros subgrupo	Nombre alternativo	Función descrita	Función RLD	Referencias
Subgrupo RCC1	RCC1	Ran-GEF	Unión a cromatina y actuar con GEF sobre Ran para crear un gradiente de RanGTP alrededor de los cromosomas mitóticos	GEF Unión a Ran y a las histonas H2A y H2B	(Carazo-Salas et al., 1999; Hetzer et al., 2000; Kalab et al., 1999; Makde et al., 2010; Renault et al., 1998; Renault et al., 2001)
	TD-60 (telophase disk 60)	RCC2	Proteína asociada al centrómero para completar la mitosis. Regulador del progreso del ciclo celular durante la interfase. Interacción con Raf1 y Arf6		(Mollinari et al., 2003; Yenjerla et al., 2013)
	DelGEF (deafness locus-associated putative guanine nucleotide exchange factor)	SERGEF	Regulación de la secreción de proteoglicanos mediante la interacción con DelGIP1 y Sec5		(Sjölander et al., 2002; Sjölander et al., 2004; Uhlmann et al., 1999)
	WBSR16 (William-Beuren síndrome crítico región 16)	WBS16	Es uno de los genes delecionados en el síndrome de Williams-Beuren		(Merla et al., 2002)
Subgrupo HERC	HERC1		Interacción con clatrina, ARF/Rab, TSC2. Mutación puntual asociada al fenotipo <i>tambaleante</i> en ratón. Ubiquitina ligasa sin sustrato identificado	GRF Interacción con fosfolípidos (RLD2) Interacción con clatrina (RLD1)	(Chong-Kopera et al., 2006; Garcia-Gonzalo et al., 2003; Garcia-Gonzalo et al., 2004; Garcia-Gonzalo et al., 2005; Mashimo et al., 2009; Rosa and Barbacid, 1997; Rosa et al., 1996)
	HERC2		Mutación causa fenotipo <i>rjs</i> o <i>jdf2</i> en ratones. Ubiquitina ligasa de XPA, BRCA1, NEURL4. Reparación del DNA	Síndrome similar a Angelman (Mutación en RLD1) Actividad alostérica sobre E6AP (RLD2)	(Al-Hakim et al., 2012; Bekker-Jensen et al., 2010; Harlalka et al., 2013; Izawa et al., 2011; Lehman et al., 1998; Puffenberger et al., 2012; Walkowicz et al., 1999; Wu et al., 2010)
	HERC3		Ubiquitina ligasa sin sustrato descrito Interacción con hPLIC-1/2. Posible papel en tráfico vesicular		(Cruz et al., 1999; Cruz et al., 2001; Hochrainer et al., 2008)
	HERC4		Ubiquitina ligasa sin sustrato desconocido Posible regulador de la espermatogénesis		
	HERC5		Ubiquitina ligasa sin sustrato identificado Media ISGIlación de diversas proteínas	Reclutamiento de sustratos para ISGIlación	(Dastur et al., 2006; Kroismayr et al., 2004; Shi et al., 2010; Tang et al., 2010; Wong et al., 2006)
	HERC6		Implicada en la respuesta inmune Pueder unir ubiquitina Ubiquitina ligasa sin sustrato desconocido		

	Miembros subgrupo	Nombre alternativo	Función descrita	Función RLD	Referencias
Subgrupo RCBTB	RCBTB1 (RCC1 and BTB containing protein 1)	CLLD7	Implicado en la reparación del DNA Posible gen supresor de tumores		(Zhou and Münger, 2010)
	RCBTB2	CHC1L	Posible actividad supresora en cáncer de próstata Transporte de proteínas durante la formación del acrosoma		(Latil et al., 2002; Wang et al., 2012)
	IBtk (Inhibitor of Bruton's tyrosine kinase)		Inhibidor de la actividad quinasa de Btk		(Liu et al., 2001; Spatuzza et al., 2008)
Subgrupo miscelánea	Alsin	ALS2	Mutaciones recesivas autosomales en el gen están asociadas con esclerosis lateral amiotrófica de inicio juvenil, esclerosis lateral primaria y paraplegia espástica hereditaria ascendente de aparición infantil Se une a Myc e inhibe la adenilil ciclasa.	GEF? Es controversial	(Cai et al., 2008)
	PAM (protein associated with Myc)	MYCB2 (Myc binding protein 2)	Regulación de KCC2 (cotransportador de potasio y cloro en neuronas) Ubiquitinación de TSC2		(Garbarini and Delpire, 2008; Guo et al., 1998; Han et al., 2012)
	RPGR (retinitis pigmentosa GTPase regulator)	ORF15	Asociado con retinitis pigmentosa Regulación formación cilios Regulación formación filamentos de actina		(Bramall et al., 2010; Gakovic et al., 2011)

Como se observa en la tabla I1, la actividad GEF no es general para todas las proteínas con dominios RLD, restringiéndose únicamente a RCC1. Estos datos indican que el dominio RLD está estructuralmente muy conservado, pero funcionalmente es un dominio muy versátil, que puede participar en la interacción con fosfolípidos (García-Gonzalo et al., 2005), afectar a la localización de proteínas y actuar como disociador (Rosa and Barbacid, 1997) o como intercambiador de nucleótidos de guanina (Renault et al., 2001).

1.2 El dominio HECT

El dominio HECT está definido por la homología que presenta al dominio carboxilo-terminal de la proteína E6AP (*E6 associated protein*). La primera proteína descrita con dominio HECT fue la propia E6AP, identificada como una proteína que mediaba la interacción entre p53 y la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano HPV16/18 (*Human papilloma virus16/18*). Luego se describió que este complejo E6-E6AP actuaba como una ubiquitina ligasa de p53, induciendo su degradación vía proteasoma (Scheffner et al., 1993). Más tarde se encontró que en condiciones normales, p53 era ubiquitinado por otras ubiquitinas ligasas distintas a E6AP. Después se comenzaron a encontrar otras proteínas con homología al dominio carboxilo-terminal de E6AP que, además de ser similares por secuencia catalizaban la formación de enlaces tioéster con la ubiquitina dando lugar a la familia

HECT de las ubiquitinas ligasas (Huibregtse et al., 1995; Scheffner and Kumar, 2014; Scheffner and Staub, 2007).

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona implicada en la regulación de múltiples procesos celulares que va más allá de la degradación por el proteasoma de proteínas mal plegadas o disfuncionales, como se propuso por primera vez en 1980 (Ciechanover et al., 1980; Wilkinson et al., 1980). Treinta y cuatro años después, la complejidad del sistema de ubiquitinación ha aumentado con el hallazgo de que proteínas similares a la ubiquitina como SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*), Nedd8, FAT10 (*HLA-F-adjacent transcript 10*), Atg8 (*Autophagy-related protein 8*) e ISG15 (*Interferon induced gene*) tienen un mecanismo de activación similar. Proteínas modificadas por estas proteínas similares a la ubiquitina regulan múltiples procesos celulares como la transcripción, reparación del DNA, autofagia, ciclo celular, transducción de señales, respuesta inmune, estrés, entre otros. La desregulación de estos sistemas de modificación de las proteínas está asociada con patologías humanas esporádicas o hereditarias como cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, musculares o inmunitarias (Ciechanover 1998; Hochstrasser 2000b; Kornitzer & Ciechanover 2000; Kim & Zhang 2003; Schwartz & Ciechanover 2009; Komander & Rape 2012; Kravtsova-Ivantsiv & Ciechanover 2012).

El proceso de ubiquitinación implica la transferencia secuencial de una molécula de ubiquitina entre una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de ubiquitina (E2), una proteína ubiquitina ligasa (E3) y una lisina en la proteína diana (Figura 13A). La especificidad dentro de este sistema está dada por las E3, lo que explica por qué el genoma humano codifica para dos E1, treinta E2 y cerca de 600 genes para proteínas E3 (Rotin and Kumar, 2009; Schwartz and Ciechanover, 2009). Las modificaciones de las proteínas por ubiquitina o moléculas similares son procesos reversibles catalizados por isopeptidasas llamadas enzimas deubiquitinantes (DUB) (Kerscher et al., 2006).

Las proteínas E3 se han clasificado en dos grupos según el dominio con actividad ubiquitina ligasa que presentan: RING (*Really interesting new gene*) y HECT. La característica clave de las E3s tipo HECT es la actividad catalítica intrínseca que presentan. Esta reacción consiste en tres pasos: unión a una E2, unión a la ubiquitina a través de un enlace tioéster intermediario con la cisteína catalítica del extremo carboxilo-terminal del dominio HECT y la transferencia de la ubiquitina a una lisina en el sustrato. Las E3s tipo RING promueven la formación de cadenas de ubiquitina, pero la

ausencia de actividad catalítica impide que produzcan directamente la ubiquitinación del sustrato (Figura I3B) (Lu et al., 2008; Metzger et al., 2012).

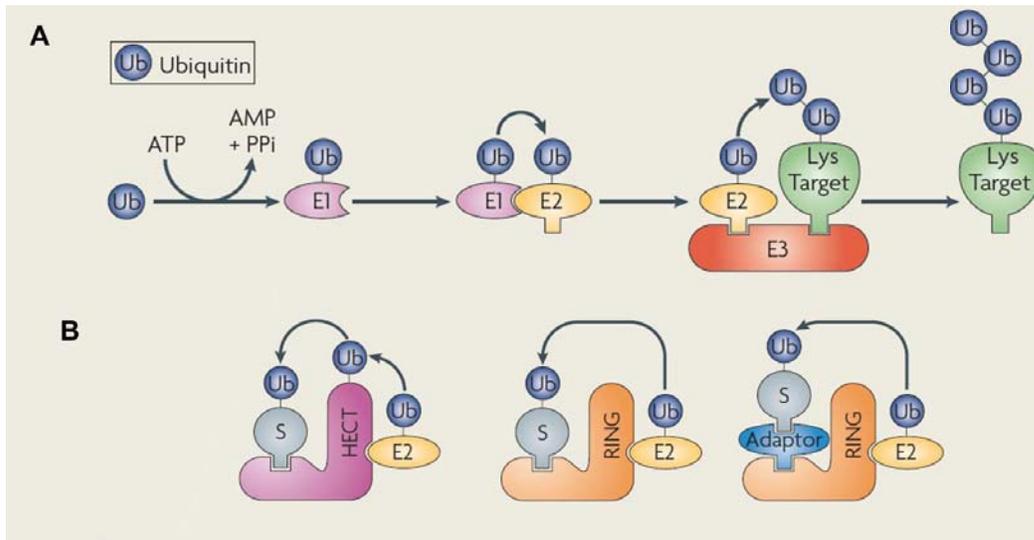


Figura I3. Cascada de ubiquitinación. (A). En un paso inicial se requiere ATP para formar un enlace tioéster entre la molécula de ubiquitina (Ub) y una enzima conjugadora de ubiquitina (E1). La molécula de ubiquitina activada es transferida a residuos de cisteína específicos de una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). La E2 dona la molécula de ubiquitina a una enzima ligasa de ubiquitina (E3) que la transfiere a residuos de lisina en el sustrato. Las E3 pueden ser del tipo HECT o RING (B). Las E3 HECT forman un enlace tioéster intermediario a través de un residuo de cisteína conservado y transfieren después la ubiquitina al sustrato. Las de tipo RING no presentan actividad catalítica intrínseca por lo cual funcionan como *scaffolds* que facilitan la transferencia de ubiquitina entre la E2 y el sustrato. (Adaptado de Rotin & Kumar 2009).

La ubiquitina puede ser ligada al sustrato como una molécula en un único aminoácido (monoubiquitinación) o en varios (multi-monoubiquitinación). La poliubiquitinación es la formación de una cadena de moléculas de ubiquitina sobre la proteína sustrato. En una cadena de poliubiquitinación, las moléculas de ubiquitina pueden ser ligadas a través de uno de los siete residuos de lisina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63) o a través de la metionina inicial (Met1) de las cadenas polipeptídicas. Los polímeros de ubiquitina a partir del mismo residuo son una cadena homotípica, mientras que las cadenas heterotípicas se forman con diferentes residuos dentro de la misma cadena y pueden ser ramificadas o no (Figura I4). Estudios sobre el tipo de cadena han establecido un papel esencial en la degradación proteasomal por cadenas ligadas vía Lys48 y en la señalización celular para las cadenas por Lys63. Para los otros tipos de cadena, el conocimiento es menor, pero lo que sí resulta claro es que todos los tipos de cadena pueden

coexistir dentro de la célula (Hochstrasser, 2000a; Kleijnen et al., 2000; Kulathu and Komander, 2012; Varshavsky, 2012).

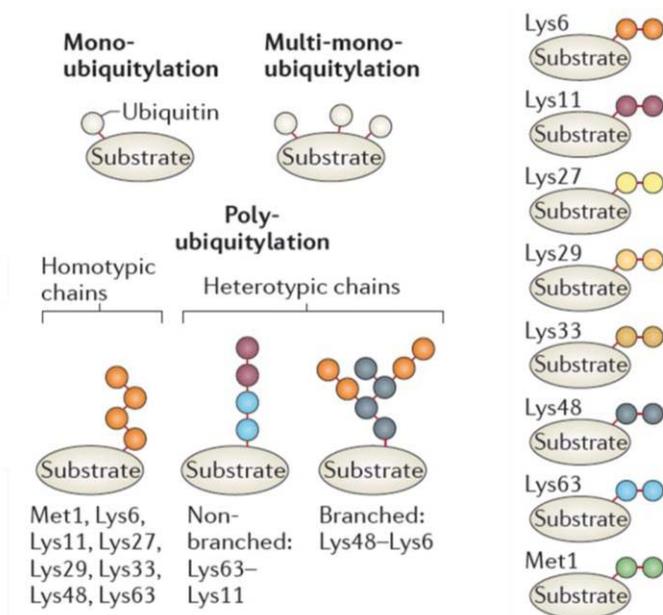


Figura 14. Formas de ubiquitinación. Los sustratos pueden ser mono, multi o poli-ubiquitinados. Las cadenas de poli-ubiquitinación pueden ser homo o heterotípicas. Las modificaciones del sustrato por la ubiquitina pueden darse a través de los residuos de las lisinas (Lys) 6, 11, 27, 29, 33, 48, 63 o metionina (Met) 1 (Adaptado de Kulathu and Komander, 2012).

Las proteínas E3 tipo HECT presentan dominios en el extremo amino terminal que permiten la interacción lípido-proteína o proteína-proteína y determinan la especificidad del sustrato. Así, basándose en la estructura del dominio amino-terminal, las veintiocho E3s HECT descritas hasta el momento se han agrupado en tres subfamilias: E3s Nedd4/Nedd4-like (nueve miembros) que contienen dominios WW, E3s HERC (seis miembros) con dominios RLDs y las restantes HECT (trece miembros) que no contienen ni dominios WW ni RLD. Esta clasificación no tiene en cuenta las relaciones evolutivas que pueden existir sino que se basa únicamente en la estructura de los dominios (Bernassola et al., 2008; Lu et al., 2008; Scheffner and Kumar, 2014). En la tabla I2 se muestra un resumen de los aspectos más relevantes descritos para las proteínas con dominio HECT.

Tabla I2. La superfamilia de proteínas HECT

	Miembros familia	Potenciales sustratos de ubiquitinación	Modelo de ratón	Enfermedad humana asociada
Familia NEDD4/NEDD4-like	NEDD4	Cbl-b Rap2A Tsp (thrombospodin-1) N-myc y c-myc Proteínas de la matriz virales como LMP2A y Lyn Grb10?	Retardo en el crecimiento, anomalías en el desarrollo de los sistemas nervioso y cardiovascular, defectos en las uniones neuromusculares y en la función de las células T	Sobreexpresión en cáncer de próstata y vejiga Infección retroviral
	NEDD4-2/NEDD4L	ENaC Numerosas proteínas/canales de membrana voltaje-dependientes. DAT (Transportador de dopamina) Dig3. JunB	Se desarrollan normalmente pero mueren a los pocos días por colapso de los pulmones e incapacidad para respirar	Síndrome de Liddle
	ITCH	TIEG1 Ubiquitin-editing enzyme A20 MAVS PI4KII α p63 y p73 CXCR4 c-FLIP	Desarrollan una enfermedad inflamatoria severa, defectos en la diferenciación celular de los T helper 2	Enfermedad autoinmune multi-sistema sindrómica
	WWP1	p53, KLF2, KLF5? JunB		Amplificación y sobreexpresión en cáncer de próstata y mama
	WWP2	DMT1 OCT4 PTEN?	Defectos en la región craneofacial	Tumorigénesis y supervivencia de células tumorales?
	SMURF1	Smad1/5 Prickle1	Desarrollo normal pero presentan un incremento en la masa ósea con la edad	Amplificación y sobreexpresión en cáncer de páncreas
	SMURF2	Smad1/2/3. SnoN Receptor TGF- β . Prickle1 SOD1	Desarrollo normal. Sin embargo, el doble <i>knockout</i> Smurf1/2 muere al día embrionario E10.5	Sobreexpresión en carcinomas de células escamosas de esófago
	NEDL1/HECW1	Dishevelled-1 Translocon-associated protein-delta Erb4	Disfunción motora, degeneración de neuronas en la médula espinal y atrofia muscular	Esclerosis amiotrófica familiar (FAL)
	NEDL2/HECW2	p73	-	-
Familia HERC	HERC1	-	Fenotipo <i>tambaleante</i> : degeneración células de Purkinje, ataxia, crecimiento reducido, esperanza de vida menor	
	HERC2	XPA BRCA1 NEURL4	Fenotipo <i>rjs</i> o <i>jdf-2</i> : crecimiento reducido, movimientos descoordinados, esterilidad machos, defectos comportamiento materno	Síndrome like Angelman
	HERC3	-	-	-
	HERC4	-	Machos estériles por defectos en la fase tardía de la espermatogénesis	Cáncer?
	HERC5	-	-	Respuesta viral
	HERC6	-	-	-

	Miembros familia	Potenciales sustratos de ubiquitinación	Modelo de ratón	Enfermedad humana asociada
	E6AP	p53 en presencia de la oncoproteína HPV E6 HHR23A/B AIB1 PML α -Synuclein Ring1b ARC Scribble NFX-91 MAGI-I hDlg	Fenotipo del síndrome de Angelman	Cáncer cervical Síndrome de Angelman ASD (autism spectrum disorders)
Otras HECT	HUWE1/UREB1/HECTH9/ARF-BP1/MULE/E3 Histone/LASU1	p53 Histonas Mcl-1 c-Myc y N-myc Cdc6 TopBP1 Miz1 Rev-erb alpha HDAC2 DNA polimerasas β y λ Mitofusin2	-	Sobreexpresión en cáncer de mama, pulmón y colorectal
	EDD/URB5	TopBP1 Paip2 β -catenina p60 CDK9 PEPCK1 RNF168	-	Amplificación y sobreexpresión en cáncer de mama y ovario
	TRIP12/ULF	p14 RNF168	<i>Knockouts</i> son más sensibles a la carcinogénesis inducida por químicos	Leucemia mieloide aguda
	HACE1	Rac1	-	-

Las estructuras obtenidas por cristalografía de distintos dominios HECT, muestran que el dominio HECT adopta una estructura bilobular. Mientras que el lóbulo C-terminal contiene el residuo de cisteína catalítico, en el lóbulo N-terminal está el sitio de unión para la enzima E2 (Figura I5). Estos lóbulos estarían ligados por una región de bisagra flexible que facilita el correcto posicionamiento de la cisteína catalítica para el enlace tioéster con la enzima E2 y la molécula de ubiquitina. En ausencia de ubiquitina, la distancia es demasiado grande para permitir que este enlace ocurra, y se acorta significativamente cuando una enzima E2 y una ubiquitina se unen. De esta manera, la actividad de las E3s tipo HECT se regula tanto por la asociación con el sustrato como por interacciones proteína-proteína y motivos-dominios en el extremo N-terminal que facilitan o interfieren la interacción del sustrato con su respectiva E3 HECT (Huang et al., 1999; Kamadurai et al., 2009; Ogunjimi et al., 2005; Verdecia et al., 2003).

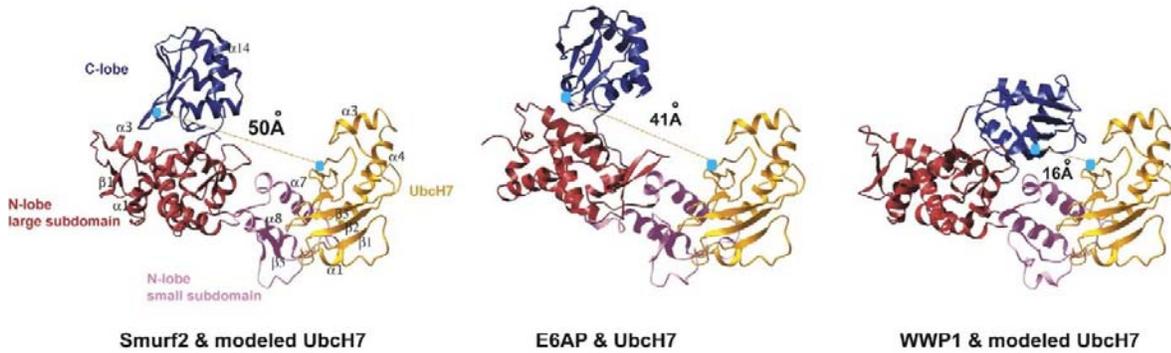


Figura I5. Estructura del dominio HECT. Estructuras de la cristalografía de los dominios HECT de Smurf, E6AP y WWP1 que indican una organización bilobal con un lóbulo en el extremo amino (rojo y rosa) y un lóbulo en el extremo carboxi (azul) y la localización de la enzima E2 Ubch7. El residuo de cisteína catalítico se indica en turquesa, así como las distancias calculadas entre la cisteína del dominio HECT y la E2. En presencia de ubiquitina, ocurre un cambio conformacional que acerca la ubiquitina desde la E2 hasta la cisteína y permitir la transtioesterificación (Adaptado de Ogunjimi et al. 2005).

1.3 Las proteínas HERC gigantes

1.3.1 HERC1

HERC1 es el miembro fundador de la familia. Anteriormente, se denominó p619/p532. Se identificó en la búsqueda de secuencias humanas oncogénicas después de transfectar DNA humano de adenocarcinoma de mama en ratones atímicos. El hallazgo de un exón similar a la proteína RCC1 llevó a la identificación de un gen que codificaba para una proteína de 4.861 aminoácidos que presentaba varios dominios estructurales en su secuencia como dos dominios RLD (RLD1 y RLD2), un dominio HECT en el extremo carboxilo-terminal, siete repeticiones del dominio WD, un dominio SPRY y otros menores como secuencias de unión a SH3 (*Src homology 3*) (Ver figura I1). Aunque los niveles de HERC1 están aumentados en líneas celulares transformadas, el cDNA de *HERC1* no induce por sí mismo transformación en fibroblastos NIH-3T3, permaneciendo todavía desconocido si HERC1 podría actuar como un oncogén. HERC1 está ubicuamente expresada en todos los tejidos humanos y de ratones, siendo los niveles mayores en cerebro y testículos, y más bajos en hígado. La localización subcelular de HERC1 se restringe al citoplasma y membranas internas como vesículas y aparato de Golgi (Rosa et al., 1996).

En cuanto a la función de HERC1, los primeros estudios se realizaron para determinar si los dominios RLD actuaban como intercambiadores de nucleótidos de guanina, como lo hace RCC1.

Debido a que la localización subcelular de HERC1 indicaba una clara asociación con estructuras similares al aparato de Golgi, se realizaron ensayos para encontrar interacción entre HERC1 y pequeñas GTPasas localizadas en Golgi de las familias ARF y Rab, así como con la proteína Ran. Estos estudios indicaron que HERC1 se une a ARF1, pero no a Rab3A, Rab5 ni Ran. Esta interacción ocurría a través del dominio RLD2 de HERC1 y requería la forma miristoilada de ARF1. También se observó que el dominio RLD1 estimulaba la disociación de nucleótidos de guanina en ARF1, Rab3a y Rab5, pero no sobre Ran, un aspecto que resultaba interesante al describirse la función opuesta para este dominio homólogo en la proteína RCC1 (Rosa et al., 1996). Estos datos sugerían además un posible rol de HERC1 en el tráfico intracelular, debido a que ARF1 es un importante componente del aparato de Golgi (Cukierman et al., 1995), mientras que Rab3A y Rab5, regulan procesos exocíticos y endocíticos, respectivamente (Darchen et al., 1995).

Posteriormente, estas observaciones parecían verse reforzadas con el hallazgo de la interacción de HERC1 con la cadena pesada de clatrina, un componente de muchas vesículas que se forman en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática. Este complejo ocurría solo en el citoplasma y estaba mediado por la formación de un complejo ternario con la chaperona Hsp70 y requería ATP (Rosa and Barbacid, 1997). Más adelante, se observó que HERC1 es reclutado dentro de protrusiones de actina en respuesta al fluoruro de aluminio por la activación de ARF6. En esta situación, HERC1 posee actividad disociadora de nucleótidos de guanina sobre ARF6 a través del dominio RLD1 (Garcia-Gonzalo et al., 2004). Esta actividad disociadora era dependiente de la interacción de HERC1 con el fosfolípido fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (Garcia-Gonzalo et al., 2005). Otra interacción observada ha sido la de HERC1 con la enzima glucolítica piruvato quinasa M2 (Garcia-Gonzalo et al., 2003), pero hasta el momento se desconoce la función de esta interacción.

Por otro lado, se ha descrito que el dominio HECT de HERC1 es capaz de unir conjugados de ubiquitina en presencia de la E2 UbcH5 (Schwarz et al., 1998), aunque ningún sustrato de ubiquitinación se ha descrito hasta el momento para HERC1. Uno de los posibles sustratos de ubiquitinación de HERC1 que ha sido propuesto es TSC2 o tuberina (*Tuberin*). HERC1 puede interactuar con TSC2 (Chong-Kopera et al., 2006). El complejo TSC1/TSC2 es un importante regulador negativo de la vía mTOR (*Mammalian target of rapamycin*). Este complejo actúa como una proteína activadora de GTPasas (GAP) para Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), una GTPasa de la familia Ras (Garami et al., 2003; Inoki et al., 2003), regulando la actividad quinasa de la proteína

mTOR (Inoki et al., 2003). Estos trabajos observaban que la coexpresión de TSC1 (*Tuberous sclerosis 1*) junto con TSC2 y un fragmento de HERC1 impedía la asociación de este HERC1 delecionado con TSC2. (Chong-Kopera et al., 2006). Experimentos adicionales realizados en nuestro grupo observaron que la proteína HERC1 endógena se puede asociar con el complejo TSC1/TSC2, permaneciendo así desconocido el papel de HERC1 dentro del complejo TSC1/TSC2 (Casas-Terradellas & Rosa, datos no publicados).

Más recientemente, se ha demostrado que una mutación puntual en el gen *HERC1* es la responsable del fenotipo *tambaleante* en ratones, causando una degeneración progresiva de las células de Purkinje, ataxia severa, un reducido crecimiento y menor esperanza de vida. Estudios bioquímicos han relacionado estos efectos con la inhibición de la vía mTOR y un aumento de la autofagia (Mashimo et al., 2009).

Por último, HERC1 se ha asociado como uno de los cuatro genes reguladores de la degradación de MSH2 (*MutS homolog 2*), una importante proteína que mantiene la integridad del genoma y su deficiencia predispone a diversos tipos de cáncer y resistencia a su tratamiento (Diouf et al., 2011).

1.3.2 HERC2

HERC2 se identificó durante el análisis de la complementación entre distintos alelos mutantes del locus *p* situado en el cromosoma 7C del ratón (Lyon et al., 1992). El locus *p* (*pink-eyed dilute*) fue uno de los primeros en estudiarse por su efecto sobre la pigmentación de los ojos y el pelaje. Mutantes sobre este locus se obtenían por irradiación de las espermatogonias con rayos X. Inicialmente los mutantes presentaban diferentes grados de hipopigmentación, pero eran viables y fértiles. Después comenzaron a observarse alteraciones diferentes a la pigmentación que incluían: crecimiento reducido, movimientos descoordinados, fertilidad disminuida en las hembras, comportamiento alterado de la madre con las crías, espermatogénesis anómala, esterilidad en los machos y viabilidad reducida (Hollander et al. 1960). Este síndrome se denominaría después *rjs* (*runty, jerky, sterile*) o *jd2* (*juvenile development and fertility 2*). Aunque en un principio se descartó que la alteración de un único gen pudiera ser la causa de todos estos eventos, los análisis de complementación entre distintos alelos del locus *p* mostró claramente que aquellos alelos que daban lugar al fenotipo *rjs* eran incapaces de complementarse entre sí, mientras que sí eran

complementados por aquellos alelos del *locus p* que generaban exclusivamente alteraciones pigmentarias (Lyon et al., 1992). Un par de años después, se logró obtener mediante un protocolo de mutagénesis química, tres mutantes puntuales de una misma secuencia que en homocigosis presentaban todos los síntomas del síndrome *rjs*. Más tarde, dos grupos de manera independiente, clonaron el gen que causaba estos efectos y demostraron que el síndrome *rjs* o *pdf2* era causado por mutaciones en el gen *Herc2* (Lehman et al., 1998; Walkowicz et al., 1999). Cuando se clonó el gen ortólogo humano *HERC2*, se encontró que copias truncadas o duplicadas del gen estaban dentro de regiones conocidas como repeticiones de bajo número de copias, en los lugares de corte de las deleciones altamente predisuestas a rearrreglos cromosómicos y que en un 70% de los casos dan origen al síndrome de Prader-Willi o al síndrome de Angelman, por la pérdida de hasta 4 Mb en la región 15q11-q13 (Ji et al., 1999; Nicholls and Knepper, 2001). En un principio se planteó que *HERC2* fuera uno de los genes implicados en estos síndromes humanos, por la similitud de algunos síntomas a los ratones con fenotipo *rjs*. Análisis posteriores demostraron que estas copias de *HERC2* no eran funcionales, siendo pseudogenes donde el único gen funcional es *HERC2* (Ji et al., 1999; Ji et al., 2000).

Más recientemente, se ha demostrado que *HERC2* y *OCA2* (*Oculocutaneous albinism II*; homólogo al gen *p* en ratones) son los dos genes que principalmente determinan el color de los ojos (Sturm and Larsson, 2009; White and Rabago-Smith, 2011), aunque inicialmente se planteó que *OCA2* era el único gen, tres trabajos independientemente evidenciaron que *HERC2* alteraba los productos de *OCA2* (Frudakis et al., 2003; Liu et al., 2009; Sulem et al., 2007). Ambos genes están localizados en el cromosoma 15: *OCA2* está en la región 15q11.2-12 y *HERC2* comienza en 15q13 (White and Rabago-Smith, 2011).

OCA2 codifica para una proteína transmembranal involucrada en el proceso de maduración del melanosoma: proteína P. De manera similar a una proteína transportadora asociada a membrana, la proteína P transporta los melanosomas y controla su pH. Esto afecta a la cantidad y la calidad de melanina que se deposita en los melanocitos, lo cual determina el color observado del ojo (White and Rabago-Smith, 2011). Cuando la luz pasa a través de una gran cantidad de melanina, la mayoría de la luz visible es absorbida y la pequeña cantidad reflejada es vista como marrón. En los ojos claros, hay menos cantidad de melanina, por lo cual se refleja más del espectro visible (Sturm and Larsson, 2009).

Se ha determinado que un SNP (*single nucleotide polymorphism*) dentro del intrón 86 del gen *HERC2* ubicado a 21.1 kb del primer exón de *OCA2* afecta a un sitio de unión al DNA que regula la transcripción del gen *OCA2*, alterando su expresión. El SNP, rs12913832, cambia la base de timina a citosina, lo cual causa que el genotipo cambie de ojos marrones a azules (Eiberg et al., 2008; Sturm and Larsson, 2009) al disminuir la expresión de la proteína P codificada por *OCA2* (White and Rabago-Smith, 2011). Esta secuencia está altamente conservada dentro de las especies analizadas, además parece representar un sitio de unión consenso para factores de transcripción como HLF (*Helicase-like transcription factor*), MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) y LEF1 (*Lymphoid enhancer-binding factor 1*). HLF permiten el acceso a la maquinaria transcripcional por modificación de la cromatina, mientras que MITF y LEF1 son críticos en la regulación de genes para el desarrollo del melanocito, diferenciación y transcripción específica dependiendo del tejido (Sturm and Larsson, 2009).

Con estas evidencias, se ha propuesto un modelo molecular para la regulación de sobre *OCA2*, donde el alelo rs12913832*T permitiría el reconocimiento de HLF, desplegando la cromatina y haciéndola más accesible a MITF y LEF1 permitiendo la expresión de *OCA2*, resultando en la producción de melanina y un iris marrón. Por el contrario, el alelo rs12913832*C impediría la transcripción de *OCA2*, la maduración y el depósito de melanina resultando en un iris azul (Sturm and Larsson, 2009) (Figura I6). También se ha propuesto un mecanismo de dominancia incompleta, donde regularían los efectos epistáticos del SNP dentro del intrón 86 de *HERC2*. Así, aunque el gen *OCA2* contuviera los alelos para ojos marrones, este SNP podría prevenir su expresión (White and Rabago-Smith, 2011).

Otros estudios han descrito que el SNP rs12913832 también estaría asociado con el color del pelo y el tipo de piel, debido probablemente a las interacciones entre *HERC2* y *MC1R* (*Melanocortin 1 receptor*) (Branicki et al., 2009; Eiberg et al., 2008). *MC1R* codifica para un receptor acoplado a proteínas G asociado con la membrana del melanocito, cuya activación permite la eficiente producción de melanina. Polimorfismos de *MC1R* que afectan la función del receptor, permiten una sobreproducción de feomelanina lo que causa pelo rojizo y piel con tonalidad roja a rosa (Rees, 2003). Así, se ha asociado el polimorfismo *HERC2* rs12913832 con cabello negro y pigmentación oscura de la piel (Branicki et al., 2009). Otros efectos epistáticos han sido sugeridos entre *HERC2* e *IRF4* (*Interferon regulatory 4*), *HERC2* y *SLC24A4* (*Solute carrier family 24, member 4*) y *HERC2* y

TYRP1 (*Tyrosinase-related protein 1*) que podrían tener efectos sobre el color de ojos azul *versus* no azul o verde *versus* no verde (Liu et al., 2010; Pośpiech et al., 2011).

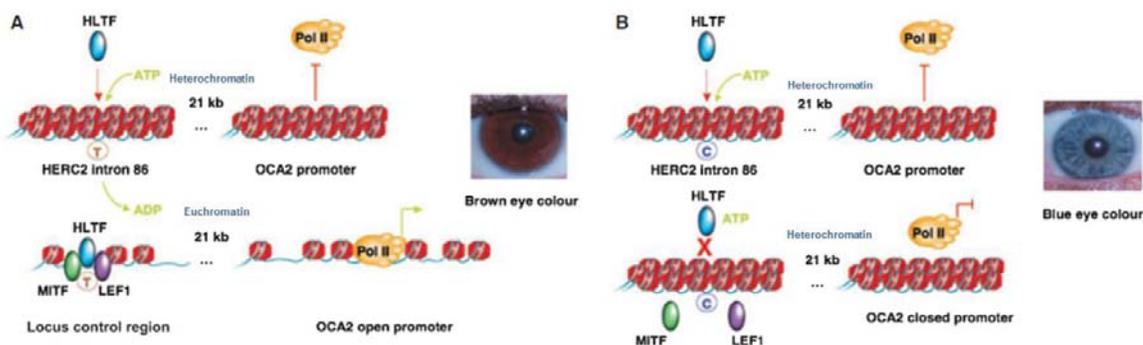


Figura I6. HERC2 y la determinación del color de ojos. (A) El locus *HERC2-OCA2* está en la heterocromatina altamente empaquetada y la transcripción de *OCA2* está inhibida. Cuando el factor HLTF reconoce el elemento conservado que contiene rs12913832*T dentro del intrón 86 de *HERC2*, otros factores como MITF y LEF1 se unen a la región de control del locus y permiten que la cromatina esté en un estado más relajado. Esta nucleación puede activar la región promotora de *OCA2* situada a 21 kb y permitiendo a la RNA polimerasa II iniciar la transcripción. La producción de la proteína codificada por *OCA2* estimula la maduración de los melanosomas y la alta producción de melanina en los melanocitos resultando en el color marrón del iris. (B) Cuando el SNP rs12913832*C está dentro del intrón 86 de *HERC2*, todos estos eventos no se dan, la producción de melanina es baja y los ojos son de color azul. (Adaptado de Sturm & Larsson 2009).

A nivel de proteína, *HERC2* es una proteína gigante con 4.834 aminoácidos y un peso molecular de 528 kDa, que presenta diferentes dominios conservados como un dominio HECT, tres dominios RLD, un dominio DOC, un dominio M-H, una región homóloga al citocromo b5 y un dedo de zinc tipo ZZ (ver figura I1) (García-Gonzalo and Rosa, 2005). Varios de estos dominios están relacionados con la actividad ubiquitina ligasa aparte del dominio HECT, como lo son el dominio DOC y el dominio M-H. El dominio DOC es un dominio de 33kDa con homología a la subunidad APC10/Doc1 del complejo ubiquitina ligasa APC (*Adenomatous polyposis coli*) involucrado en el progreso de la mitosis, que incrementa la afinidad del complejo APC por sus sustratos para estimular la poliubiquitinación (Grossberger et al., 1999). El dominio M-H (Mib-HERC2), se encuentra también dentro de una ubiquitina ligasa del pez cebra llamada *Mind Bomb* (*Mib*), importante en la regulación de la proteína Notch y la diferenciación de progenitores neuronales (Itoh et al., 2003). El dominio homólogo al citocromo b5 no presenta las dos histidinas necesarias para la unión del grupo hemo y su función en *HERC2* se desconoce (Ji et al., 1999). Por su parte el dominio ZZ presenta seis

cisteínas muy conservadas y dos histidinas que permiten la unión a iones de zinc. Recientemente, se ha demostrado que este dominio es susceptible de modificación por sumoilación (Danielsen et al., 2012). Otro dominio identificado es el CPH (CUL7, PARC, HERC2) que se ha sugerido como un dominio de unión a p53 (Kasper et al., 2006 y este trabajo).

En los últimos años se ha demostrado que HERC2 participa en la reparación de la ruptura de la doble cadena del DNA. La ruptura de la doble cadena se origina como producto de fallos estocásticos en la replicación, daños por especies reactivas de oxígeno o agentes genotóxicos como la radiación ionizante (Bekker-Jensen and Mailand, 2010). La respuesta de la célula a este daño involucra modificaciones post-traduccionales tanto de componentes de la cromatina como de otras proteínas que se acumulan dentro de estructuras denominadas *foci* de reparación (Bekker-Jensen and Mailand, 2010). La reparación de la ruptura de la doble cadena comienza con el reconocimiento del sitio donde se produjo el daño por el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), el cual promueve la activación de quinasas de señalización como ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) y DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) (Figura 17). Estas serinas treoninas quinasas, fosforilan la serina 139 de la histona H2A.X situada en centro de los *foci* de reparación. La fosforilación de la histona H2A.X (γ -H2AX) y su posterior acetilación, permite el reclutamiento de MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint 1*) y de otras dos ubiquitinas ligasas RNF8 (*Ring finger protein 8*) y RNF168 (*Ring finger protein 168*). Subsecuentes ciclos de estos eventos permiten la formación de *foci* de γ H2AX del tamaño de una megabase alrededor del sitio de ruptura en la doble cadena. Esto amplifica la concentración local de factores de reparación como el complejo BRCA1 (*Breast cancer 1*).

La señal generada en el sitio de la ruptura debe ser transmitida hasta el núcleo para causar la parada en la progresión del ciclo celular. Los transductores claves de la señalización son las quinasas Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) y Chk2 (*Checkpoint kinase 2*), las cuales propagan y amplifican las vías iniciadas por ATM y ATR. Dentro de los blancos de Chk1/2 está la fosfatasa CDC25A (*Cell division cycle 25A*) que después de ser fosforilada es susceptible de degradación por el proteasoma, inhibiendo las quinasas CDK1 y CDK2 que determinan la progresión del ciclo celular. En paralelo, la fase S es ralentizada por la fosforilación mediada por ATM y ATR sobre la cohesina SMC1 (*Structural maintenance of chromosomes 1A*). En caso de que el daño sea más complejo o extenso, mecanismos mediados por p53 son activados, como la transcripción de p21 que refuerza la

detención del ciclo celular y puede mantenerlo así por un periodo más largo hasta que el daño esté totalmente reparado (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Hartlerode and Scully, 2009; van Attikum and Gasser, 2005; van Attikum and Gasser, 2009). Alteraciones en estas vías de reparación están asociadas con cáncer, desordenes neurodegenerativos, inestabilidad genómica en enfermedades hereditarias, deficiencias inmunitarias, esterilidad, síndromes metabólicos, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento, entre otros (Jackson and Bartek, 2009).

Bekker-Jensen *et al.* (2010) demostraron que HERC2 se recluta en los *foci* de reparación mediante la interacción con RNF8. Esta interacción es dependiente de la fosforilación de la treonina HERC2 en el residuo 4287 por ATM/ATR/DNA-PK, que permite la asociación con el dominio FHA (*Forkhead-associated domain*) de RNF8. En paralelo, la dimerización de RNF8 promueve la interacción simultánea de HERC2 con MDC1, formándose un complejo ternario entre MDC1-HERC2-RNF8 en los sitios de ruptura del DNA. Además, HERC2 parece actuar como un factor auxiliar en la especificidad entre la enzima E2 Ubc13 y E3 RNF8 para la poliubiquitinación de histonas tipo H2A, lo cual permite la acumulación de factores de reparación como 53BP1 (*p53 binding protein 1*), RAP80 (*Receptor associated protein 80*) y BRCA1 (Bekker-Jensen *et al.*, 2010). Sin embargo, estos mismos autores han mostrado que en la línea celular de pollo DT40, HERC2 no es fundamental durante la reparación del daño al DNA pero si RNF8 y RNF168 (Oestergaard *et al.*, 2012), sugiriendo que en otras especies podría haber una función redundante de HERC2, que sería ejercida por otro miembro de la familia HERC o una proteína no relacionada.

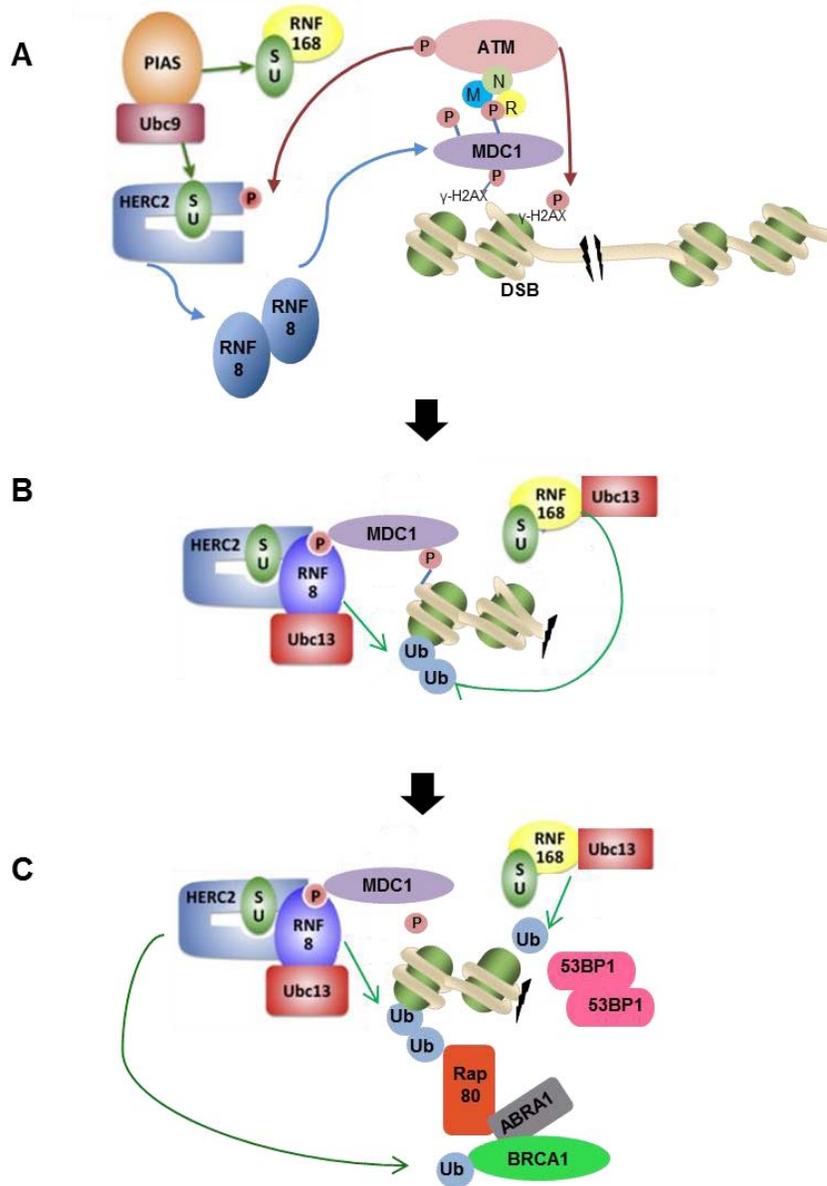


Figura 17. Modelo propuesto para HERC2 en la respuesta al daño al DNA producido por la ruptura de la doble cadena del DNA. (A) El daño causado sobre el DNA, activa el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) que se une a los extremos de la doble cadena donde se ha producido el daño para reclutar a ATM que fosforila a H2AX (ahora γ -H2AX) y a HERC2 en Ser4287. MDC1 es reclutado y se une a γ -H2AX. HERC2 y RNF168 son sumoilados por el complejo PIAS-Ubc9. HERC2 sumoilado y fosforilado interacciona con RNF8, que puede autoregular su dimerización. (B) Las fosforilaciones mediadas por ATM favorecen la formación de un complejo ternario HERC2-RNF8-MDC1. A su vez RNF8 forma un complejo activo con Ubc13 que promueve la formación de cadenas de ubiquitina en el sitio del daño. Esto funciona como señal para RNF168-Ubc13 que aumenta la formación de cadenas de ubiquitina sobre histonas tipo H2A. (C) El aumento de la poliubiquitinación por RNF168 en complejo con Ubc13, favorece que se recluten factores de reparación como 53BP1 y el complejo BRCA1. La acumulación del complejo BRCA1 es directamente mediada por los dominios UIM de RAP80 que se unen a las cadenas poliubiquitinadas de γ -H2AX. HERC2 además puede regular los niveles de BRCA1 por ubiquitinación. Todos estos eventos facilitan que el daño sea reparado (Adaptado de Zhao et al. 2014 y modificado).

Las lesiones sobre el DNA pueden producirse en una sola cadena o en las dos. Para el daño producido en la doble cadena, el mecanismo de reparación incluye la cascada iniciada por la γ H2AX, descrita anteriormente. En el caso de ruptura de una sola cadena, las lesiones son eliminadas por el sistema de reparación de escisión de nucleótidos que en humanos y ratones es mediada por seis factores de reparación: RPA (*Replication protein A1*), XPA (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A*), XPC (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C*), TFIIH (*Transcription factor IIH*), XPG (*Xeroderma pigmentosum, complementation group G*) y XPG-ERCC1 (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency*) (Reardon and Sancar, 2005). Estos factores eliminan la base afectada y luego una DNA polimerasa reemplaza y liga el espacio vacío (Lindahl and Barnes, 2000). La ruptura de una sola cadena puede ser causada por agentes quimioterapéuticos como la cisplatina o por la irradiación ultravioleta (Jackson and Bartek, 2009). HERC2 se une específicamente a XPA y la ubiquitina. La anulación de HERC2 en células tratadas con cisplatina, estabiliza XPA e incrementa su actividad de reparación. XPA es una proteína inestable con ritmicidad circadiana de su transcripción y traducción, sugiriendo que HERC2 participaría en el patrón de expresión oscilatorio circadiano de XPA (Kang et al., 2010; Kang et al., 2011). La actividad de HERC2 sobre XPA es antagonizada por la fosforilación de XPA mediada por ATR que protege la degradación de XPA por HERC2 (Lee et al., 2014).

HERC2 regula a la también ubiquitina ligasa BRCA1, involucrada en el mantenimiento de la estabilidad genómica regulando procesos de reparación del DNA, control del ciclo celular y apoptosis (Venkitaraman, 2002). Se ha descrito que HERC2 ubiquitina y degrada BRCA1 durante la fase S del ciclo celular. Al final de la fase S, la interacción entre BRCA1 y HERC2 se pierde, permitiendo la asociación de BRCA1 con BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein*) para formar un heterodímero que mantiene el complejo en el núcleo y previene la proteólisis de BRCA1 mediada por HERC2 (Wu et al., 2010). HERC2 interacciona con Claspin, una proteína que también interacciona con BRCA1 (Izawa et al., 2011). Claspin es un mediador de los puntos de control del ciclo celular que facilita la fosforilación y activación de Chk1 por ATR (Lee et al., 2005). Además, la interacción de Claspin con el complejo TIPIN-TIM1-AND1 que tiene actividad polimerasa y helicasa impide el colapso de la horquilla durante su replicación y su progreso (Petermann et al., 2008). Los autores sugieren que HERC2 participaría en la progresión de la replicación y el origen de la horquilla en un complejo con BRCA1 y Claspin (Izawa et al., 2011).

Más recientemente, se ha encontrado que HERC2 interacciona con NEURL4 (*Neuralized homolog 4*) y la proteína centrosomal CP110 (*Centriolar coiled coil protein*). Se ha observado que NEURL4 es ubiquitinado en una manera dependiente de HERC2. La disminución de la actividad de HERC2 altera la morfología del centrosoma, causando la aparición de estructuras filamentosas aberrantes que afectan a proteínas del material pericentriolar como la Pericentrina y CEP135 (Al-Hakim et al., 2012).

También se ha descrito que HERC2 interactúa con la ubiquitina ligasa E6AP (Kühnle et al., 2011), el miembro fundador de la familia de E3s HECT, cuya inactivación se asocia con el síndrome de Angelman, así como con ciertos tipos de cáncer cervical. Estudios *in vitro* demuestran que la actividad ubiquitina ligasa de E6AP puede ser potenciada por HERC2 a través de su dominio RLD2. Este es el primer ejemplo descrito hasta el momento de la formación de heterómeros entre E3s del tipo HECT (Kühnle et al., 2011).

1.4 Las proteínas HERC pequeñas

1.4.1 HERC3

El gen *HERC3* inicialmente referido como D25215, se identificó en 1994 en la búsqueda de cDNAs mayores a 2kb (Nomura et al., 1994). *HERC3* codifica para una proteína de 117 kDa localizada en el citosol y en estructuras similares a vesículas que expresan β -COP, Rab5 y ARF (Cruz et al., 2001). En ratones se ha observado una importante expresión en cerebro, especialmente en la corteza piriforme, el hipocampo y la amígdala (Davies et al., 2004).

HERC3 no actúa como un GEF sobre Ran, pero sí puede interactuar con ubiquitina aun cuando la cisteína del sitio activo para la unión a ubiquitina está mutada (Cruz et al., 2001). Además, se ha observado que *HERC3* puede autoregularse por degradación del proteasoma dependiente de ubiquitina, siendo así tanto una ubiquitina ligasa como un sustrato de ubiquitinación (Cruz et al., 2001; Garcia-Gonzalo and Rosa, 2005).

Posteriormente, se describió que *HERC3* se une a hPLIC-1 y hPLIC-2 (Hochrainer et al., 2008). Las hPLIC (*Human proteins linking integrin-associated proteins and cytoskeleton*) son proteínas similares a ubiquitina que interactúan con la subunidad 19S del proteasoma y proteínas poliubiquitinadas, así como con las ubiquitinas ligasas E6AP, β TRCP y Nedd4 para favorecer la

degradación de sustratos como p53, IκBα y presenilina (Kleijnen et al., 2000). Sin embargo hPLIC-1 y hPLIC-2 parecen ser más reguladores de la ubiquitinación de HERC3 que sus sustratos (Hochrainer et al., 2008).

1.4.2 HERC4

Similar a *HERC3*, *HERC4* fue originalmente identificado durante la búsqueda de nuevos cDNAs que codificaran para proteínas grandes (Nagase et al., 2000). La expresión del mRNA de *HERC4* se ha observado en todos los tejidos evaluados, siendo bastante alta en cerebro y testículos. Como otras proteínas HERC, *HERC4* se localiza en el citoplasma en estructuras similares a vesículas. *HERC4* posee 29 exones, de los cuales se transcriben 25 ó 26, sin embargo la relevancia funcional de este procesamiento alternativo se desconoce (Hochrainer et al., 2005).

La función de *HERC4* permaneció durante mucho tiempo desconocida, hasta que Rodríguez y Stewart (2007) observaron que una sobreexpresión de *HERC4* ocurría en el epitelio luminal del útero de ratones en el momento de la implantación del blastocisto, sugiriendo un papel de *HERC4* en la reproducción. La disrupción del gen *HERC4* no afecta la reproducción femenina, pero si reduce la esterilidad en machos por defectos en los estadios tardíos de la espermatogénesis, sin embargo se desconoce como *HERC4* podría estar regulando este proceso (Rodríguez and Stewart, 2007).

Más recientemente, se ha sugerido a *HERC4* como un marcador de diagnóstico en el carcinoma ductal invasivo de mama, al encontrar correlación entre los niveles de expresión de *HERC4* con el estado clínico avanzado en pacientes y metástasis en nodos linfáticos (Zhou et al., 2013).

1.4.3 HERC5

Inicialmente fue descrita como *Ceb1* (*Cyclin E-binding protein-1*) por su interacción con varias subunidades de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) en células humanas. Sus niveles se observaban especialmente elevados cuando proteínas supresoras de tumores como p53 o Retinoblastoma estaban alteradas por mutaciones u oncoproteínas virales (Mitsui et al., 1999). Sin embargo, no existen evidencias de la oscilación de los niveles de *HERC5* durante el ciclo celular que permitan relacionarla en la regulación de este proceso. El mRNA de *HERC5* se traduce en una proteína de 117 kDa, altamente expresada en testículos y cerebro fetal, y en niveles muy bajos en

tejidos como ovario, páncreas, corazón, placenta y músculo esquelético (Hochrainer et al., 2008). HERC5 es exclusiva de humanos.

Aunque probablemente, los hallazgos de HERC5 más interesantes se relacionan con el hecho de que es uno de los genes sobreexpresados en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (Kroismayr et al., 2004). Aumentos de los niveles de mRNA se han observado en células endoteliales, vasculares y fibroblastos tras el estímulo con citoquinas pro-inflamatorias como TNF α (*Tumor necrosis factor α*), interleuquina1 β o lipopolisacárido (LPS). Sin embargo, los niveles de mRNA no se correlacionan con el aumento de la proteína en las células endoteliales tras el estímulo con LPS, que sufre una temprana degradación y luego de unas horas, una recuperación de los niveles iniciales. El hecho que HERC5 puede unir ubiquitina en presencia de la E2 UbcH5, plantea que la rápida degradación observada con el LPS se debe a un aumento de la poliubiquitinación y de la degradación por el proteasoma, sugiriendo que HERC5, al igual que HERC3, puede ser tanto sustrato de ubiquitinación como ubiquitina ligasa (Kroismayr et al., 2004).

Poco tiempo después, otros estudios han demostrado que la función principal de HERC5 no es la de transferir moléculas de ubiquitina a sus sustratos, sino moléculas de ISG15 en un proceso conocido como ISGilación (Dastur et al., 2006; Wong et al., 2006). ISG15 es una proteína similar a la ubiquitina inducida por el IFN- α/β (*Inteferon α/β*) que se conjuga a diversas proteínas durante la respuesta inmune innata a infecciones virales y bacterianas (Jeon et al., 2010; Skaug and Chen, 2010). En el sistema de ISGilación participan también una E1, E2 y E3. Hasta el momento se han identificado a Ube1L, UbcH8 y HERC5 como las E1, E2 y E3 en el proceso de ISGilación, respectivamente (Jeon et al., 2010). La inhibición de HERC5 en células humanas mediante RNAs de interferencia, así como la mutación de la cisteína del centro activo, disminuyen dramáticamente la conjugación de ISG15 a varias proteínas diana de la ISGilación *in vivo*, lo cual ha sugerido a HERC5 como la principal E3 de ISG15. Mutaciones en el dominio RLD1 de HERC5 afectan la ISGilación aunque no la impide, sugiriendo que este dominio podría funcionar como un dominio de reclutamiento para las proteínas diana (Dastur et al., 2006; Wong et al., 2006).

Se han identificado más de 300 proteínas involucradas en el proceso de ISGilación (Zhao et al. 2005; Skaug & Chen 2010). Proteínas diana de ISGilación tienen diferentes funciones en la célula como el tráfico intracelular de proteínas, glicólisis, movilidad celular, regulación del citoesqueleto, procesamiento del RNA, remodelación de la cromatina, transducción de señales, respuesta al estrés,

entre otros (Giannakopoulos et al., 2005; Wong et al., 2006; Zhao et al., 2005). Aunque el mecanismo por el cual es importante la ISGilación para la protección viral se desconoce (Bogunovic et al., 2013), se han propuestos diferentes modelos para explicarlo. Uno de ellos, propone que las proteínas ISGiladas inducidas por la respuesta viral se movilizan de su localización subcelular normal al citoesqueleto para ejercer una actividad antiviral inhibiendo el tráfico de proteínas virales o la exocitosis de partículas víricas (Wong et al., 2006). También se ha sugerido un mecanismo de pérdida de función para la actividad antiviral del sistema de ISGilación, con los datos obtenidos a partir de la proteína NS1A, un componente del virus de la influenza A. La proteína NS1A se une directamente y específicamente a HERC5. El principal sitio receptor de ISG15 en la proteína NS1A es la lisina 41 (K41) del dominio amino-terminal que a la vez contiene el dominio de unión al RNA. Al parecer, la modificación de ISG15 en K41 previene la asociación del dominio de unión al RNA con la importina- α , la encargada de mediar el transporte nuclear de la NS1A, impidiendo de esta forma la replicación del virus de la influenza A (Zhao et al., 2010).

Otro modelo que se ha planteado para explicar la actividad antiviral de ISG15 y HERC5, es un mecanismo cotranscripcional, donde HERC5 promovería que nuevas proteínas virales sintetizadas fueran diana para la ISGilación en una manera no específica. De esta manera, la ISGilación de una pequeña fracción dentro del *pool* total de proteínas virales tendría un efecto negativo sobre la replicación viral debido al defectuoso ensamblaje de estructuras de mayor orden, como la cápsida. Esta función HERC5 la podría ejercer debido a su capacidad de interacción con los polisomas (Durfee et al., 2010).

ISG15 también podría ejercer un rol antiviral inhibiendo la ubiquitinación (Durfee et al., 2010). Evidencia de ello son los datos que respaldan que HERC5 inhibe la degradación mediada por ubiquitina de IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*). IRF3 es un factor de transcripción inducido por interferón tipo I e infección viral (Lu et al., 2006). IRF3 está sujeto a varias modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Bibeau-Poirier et al., 2006; Kubota et al., 2008; Lu et al., 2006) que induce la formación de homodímeros para reclutar los co-activadores p300/CBP y translocarse al núcleo y activar proteínas antivirales como IFN- β (Kumar et al., 2000; Lin et al., 1998; Sato et al., 2000). Aunque la ubiquitina ligasa de IRF3 se desconoce, está bien establecido que la ubiquitinación dependiente de fosforilación anula la función de IRF3 favoreciendo su degradación dependiente del proteasoma (Bibeau-Poirier et al., 2006; Lin et al., 1998). Pin1 es una peptidil-prolil isomerasa que

interactúa con IRF3 fosforilada y promueve su ubiquitinación por un mecanismo desconocido (Saitoh et al., 2006). Ante la infección con el virus Sendai, HERC5 se une e ISGila IRF3 atenuando la interacción entre Pin1 e IRF3, prologando la activación de IRF3 y la respuesta innata antiviral del hospedero (Shi et al., 2010).

Todos estos datos soportan la importancia de HERC5 en la protección antiviral y demuestra la versatilidad de las proteínas HERC al no restringirse a su actividad ubiquitina ligasa por su dominio HECT.

1.4.4 HERC6

El gen humano *HERC6* presenta una identidad cercana al 50% en el dominio HECT con respecto a *HERC5*. Al igual que *HERC4*, *HERC6* presenta procesamientos alternativos de su transcrito primario que codifican para proteínas truncadas o productos con deleciones internas, mecanismo que permanece igualmente desconocido (Hochrainer et al., 2008). El análisis de la distribución de la proteína HERC6, muestra una distribución ubicua por todos los tejidos, siendo importante en testículos y cerebro, y a nivel subcelular en citoplasma asociada a estructuras similares a vesículas (Hochrainer et al., 2008).

En humanos, HERC6 no parece tener un rol importante en la ISGilación como HERC5. Sin embargo, en ratones HERC6 (*mHERC6*) parece ser la contrapartida funcional de la HERC5 humana que media la ISGilación, al no existir ningún homólogo de *Herc5* en ratón. Los ratones *knockout* para *HERC6* tienen anulado por completo la ISGilación, mientras que su sobreexpresión incrementa la actividad antiviral contra el virus de la estomitis vesicular y el virus de la enfermedad de Newcastle (Ketscher et al., 2012; Oudshoorn et al., 2012).

2. El gen supresor de tumores p53

El gen supresor de tumores *TP53*, codifica para la proteína p53, un factor de transcripción clave en la regulación de múltiples procesos celulares. Este factor responde frente a diversos tipos de estrés con la activación o represión de genes, induciendo parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del DNA o cambios en el metabolismo (Vousden and Lu, 2002; Vousden and Prives, 2009). Estas funciones permiten que p53 prevenga la acumulación de células malignas que pueden progresar hasta la carcinogénesis. La mayoría de tumores escapan del control de p53 por mutaciones en el propio gen o alteraciones de la señalización *upstream* o *downstream* de p53 (Bourdon, 2007; Vousden and Lane, 2007).

En un individuo sano, las células están espacialmente confinadas a tejidos específicos y la proliferación celular está estrictamente controlada. El término cáncer abarca a ese grupo de enfermedades donde las células comienzan a crecer incontroladamente e invaden otros tejidos hasta formar tumores malignos. El conocimiento obtenido con el paso del tiempo sobre la biología del cáncer, ha permitido la formulación de ocho rasgos o *hallmarks* que distinguen una célula normal de una cancerosa (Figura I8) (Hanahan and Weinberg, 2011).

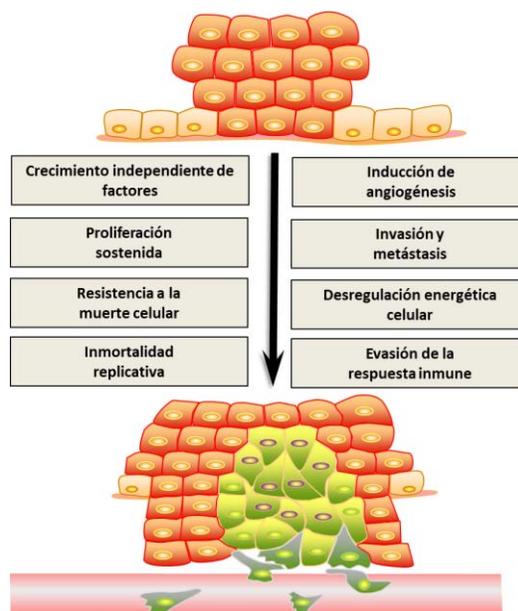


Figura I8. Los *hallmarks* del cáncer. La transición de una célula a la malignidad implica adquirir capacidad para proliferar de manera independiente de factores de crecimiento e ilimitada, resistencia a la muerte celular, inmortalidad, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis, transformación del metabolismo celular y evasión de la respuesta inmune.

Uno de los rasgos más característicos de las células cancerígenas es la proliferación celular incontrolada, debido al crecimiento independiente de señales mitogénicas. Mientras que en los tejidos normales, la homeostasis de estas señales mantiene la correcta arquitectura y función del tejido, en el caso de las células cancerígenas, estas tienen control sobre su propio crecimiento. Una célula cancerígena puede producir sus propios ligandos de factores de crecimiento, incrementando así la expresión de los receptores de estos ligandos (Perona, 2006). Además, estas señales estimulan la proliferación de las células normales de su entorno, que a su vez producen factores de crecimiento, alimentando el crecimiento celular de las células cancerígenas (Cheng et al., 2008). Las señales de proliferación mediada por receptores, están reguladas por mecanismos de *feedback* negativo de los receptores, que impiden la sobreactivación de estas vías de señalización (Amit et al., 2007). Defectos en este flujo de señales pueden eliminar ese punto de control y generar una transmisión de señales sostenida. Este tipo de defectos se asocian principalmente por alteraciones de la oncoproteína Ras (White, 2013), la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) (Jiang and Liu, 2009), así como la quinasa mTOR (O'Reilly et al., 2006).

La proliferación celular es regulada negativamente por los genes supresores de tumores. Los dos más estudiados en este aspecto son *TP53* y *Retinoblastoma (Rb)*. Mientras que Rb procesa las señales de crecimiento inhibitorias procedentes del exterior de la célula (Burkhart and Sage, 2008), p53 es el sensor de las señales de estrés y activación de oncogenes a nivel intracelular (Vousden and Lu, 2002). Así, dependiendo del tipo y grado del daño, induce la parada del ciclo celular o apoptosis, como será explicado más adelante. Además, la proliferación celular es regulada por la inhibición por contacto entre células. Alteraciones del gen *NF2 (Neurofibromin 2)* o de la proteína LKB1, son importantes para este tipo de regulación. Por ejemplo, *NF2* codifica para la proteína Merlin, que acopla moléculas de adhesión a la superficie celular como E-cadherina a receptores tirosina quinasa transmembranales, impidiendo la transmisión de señales proliferativas (Okada et al., 2005). Otro factor que contribuye a la proliferación sostenida en el cáncer es la vía del TGF β (*Tumor growth factor β*). Aunque en situaciones normales o en los primeros estadios de malignidad actúa como una vía antiproliferativa, en estadios tardíos su señalización es redirigida para incrementar la proliferación celular y activar un programa celular conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), que confiere alta malignidad a las células (Massagué, 2008).

Como se mencionó antes, p53 induce la muerte celular por apoptosis cuando ocurren alteraciones en el genoma que no pueden ser reparadas o por una excesiva activación de oncogenes. Principalmente, se conocen dos tipos de vías por las cuales p53 regula esta respuesta, conocidas como la vía intrínseca y la vía extrínseca de la apoptosis (Thornberry and Lazebnik, 1998), que serán explicadas más adelante. La pérdida de p53 se correlaciona con la adquisición de la capacidad de los tumores para limitar o evadir la apoptosis. Uno de los mecanismos que permiten esta capacidad de adaptación es la autofagia. La autofagia permite a las células en situaciones limitantes o bajas de nutrientes, reciclar catabolitos a partir de la degradación de organelos como ribosomas y mitocondrias y utilizarlos para la biosíntesis de nuevas moléculas para mantener así el metabolismo celular. Así, altos niveles de autofagia pueden llegar a tener un efecto citoprotector sobre las células cancerosas (Wang and Levine, 2010). La muerte celular por necrosis también puede favorecer la promoción de tumores. La liberación de señales proinflamatorias por una célula necrótica promueve el reclutamiento del sistema inmunitario, que libera más señales inflamatorias, activando la proliferación celular del entorno (Galluzzi and Kroemer, 2008). Así, mecanismos que parecen contrarrestar la hiperproliferación resultan teniendo el efecto contrario y favoreciendo el crecimiento del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011).

En una célula normal, repetidos ciclos de proliferación celular conllevan a la inducción de la senescencia, y si escapan de este control, entran en una fase de crisis para finalmente morir. Cuando las células proliferan sin evidencia de senescencia o de una fase crisis, se dice que están inmortalizadas (Hanahan and Weinberg, 2011). Los telómeros tienen un papel muy importante en este proceso, determinando el número de eventos de proliferación que puede tener una célula antes de morir por apoptosis. Los telómeros protegen los extremos de los cromosomas y van acortando su longitud tras cada división. La telomerasa, una DNA polimerasa especializada en adicionar los telómeros a los extremos del cromosomas, es prácticamente ausente en células no inmortalizadas, pero significativamente alta en aquellas células que si lo están (Blasco, 2005). La telomerasa además, a través de su subunidad la proteína TERT, puede amplificar la señalización de la vía Wnt, incrementando la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis (Park et al., 2009).

La progresión tumorogénica también implica un *switch* angiogénico de la vasculatura que normalmente está quiescente, a un estado continuo de producción de nuevos vasos sanguíneos. Alteraciones de factores proangiogénicos como VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) o

miembros de la familia FGF (*Fibroblast growth factor*), así como de la trombospondina (TSP-1), un inhibidor angiogénico, se correlacionan bien con el aumento de nutrientes y oxígeno por parte de las células endoteliales al tumor (Baeriswyl and Christofori, 2009). Otras células que favorecen este fenómeno son los pericitos, células mesenquimales especializadas que incrementan las señales paracrinas sobre las células endoteliales quiescentes (Raza et al., 2010), así como las células progenitoras derivadas de la médula ósea (Hanahan and Weinberg, 2011).

La nueva vasculatura promovida por las células cancerígenas aumenta la activación de señales de invasión y metástasis, que permiten que se dé una invasión local de células anómalas, seguida por la intravasación de estas células a la sangre y a los vasos linfáticos, y a continuación se extravasen a tejidos distantes para formar pequeños nódulos o micrometástasis que aumentan hasta el tamaño de un tumor macroscópico, colonizando tejidos diferentes al origen inicial (Fidler et al., 2007). Estas capacidades están mediadas por la pérdida de adhesiones celulares, cambio de morfología celular, expresión de enzimas que degradan la matriz, movilidad incrementada y resistencia a la apoptosis, así como por la reversión de la transición epitelio-mesenquimal a mesenquimal-epitelio (MET) (Hanahan and Weinberg, 2011).

La proliferación incontrolada así como la colonización de nuevos ambientes por las células cancerígenas, implica además la adaptación de su metabolismo para mantener su crecimiento. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, primero a piruvato vía glicólisis y después a dióxido de carbono en la mitocondria. En condiciones anaeróbicas, la glicólisis disminuye y el piruvato es destinado para el consumo de oxígeno en la mitocondria. Aún en condiciones aeróbicas, las células cancerosas reprograman el metabolismo de la glucosa y dependen mayoritariamente de la glicólisis (efecto Warburg). Para ello, aumentan el número de transportadores de glucosa como GLUT1 (*Glucose transporter 1*) para captar el mayor número de moléculas de glucosa. Este cambio en el metabolismo está asociado por la activación de oncogenes como Ras y Myc y de supresores de tumores como p53 (Jones and Thompson, 2009). Aunque en un principio se pensó que esta respuesta era ineficiente, debido a que por glicólisis se producen menos moléculas de ATP comparada con la fosforilación oxidativa en mitocondria, una glicólisis incrementada permite la síntesis de distintos intermediarios necesarios para la biosíntesis de macromoléculas y organelos necesarios para la proliferación de nuevas células. Además, se ha propuesto un modelo en el cual se distinguen dos subpoblaciones de células dentro de un tumor. Mientras que una población es

dependiente del efecto Warburg y secretan lactato, la otra población importa ese lactato como fuente del ciclo de Krebs y producir ATP (Kennedy and Dewhirst, 2010).

Por último, otra característica adquirida por las células cancerígenas es la evasión de la respuesta inmune. Aunque en un principio se aceptaba que era importante en los tumores de origen viral, actualmente se acepta que en tumores no virales también es crucial. Deficiencias en linfocitos T CD8 citotóxicos, células T CD4 o células *natural killer* promueven el crecimiento del tumor (Teng et al., 2008).

2.1 p53 como guardián del genoma

Cuando en 1979 se describió a *TP53* como un nuevo oncogen relacionado con los virus que producían cáncer, nadie se imaginaba que se terminaría convirtiendo probablemente en el gen más importante para entender la biología del cáncer. Más tarde, en 1989 se determinó que p53 era un supresor de tumores y que estaba frecuentemente mutado en diferentes tipos de cánceres humanos. Datos que serían confirmados con el primer ratón transgénico mutante para *Trp53* por Bernstein et al. (1989). Estos autores observaron que la expresión de dos alelos mutantes de p53 incrementaba significativamente la resistencia celular de varios linajes hematopoyéticos a la radiación gamma, sugiriendo que p53 actuaría como guardián del genoma previniendo la proliferación celular ante el daño genético sostenido (Ben-David et al., 1990; Lavigne et al., 1989). La falta de los dos alelos de *p53* en ratones está asociada con la aparición de tumores a los 6 meses de vida en el 75% de los casos. La incidencia para los animales *wild-type* es del 1% a los 18 meses, y para los animales heterocigotos del 2% a los 9 meses (Donehower et al., 1992).

La investigación alrededor de p53 ha crecido sin parar, prueba de ello son las más de 70.000 citas que se encuentra en Pubmed, los más de 60 modelos de ratones transgénicos descritos para intentar entender la regulación de la función y actividad de p53 y los numerosos esfuerzos para identificar y secuenciar las diferentes mutaciones somáticas de *TP53* asociadas con los diferentes cánceres esporádicos humanos, así como las mutaciones de p53 en la línea germinal (Donehower and Lozano, 2009; Levine and Oren, 2009). Y aunque muchas preguntas han recibido respuestas, el hecho que p53 sea importante en otro tipo de eventos que van más allá del cáncer, nos demuestra que aún queda mucho por seguir investigando.

p53 es un miembro de la familia de los factores de transcripción p53 junto con p63 y p73. p53 regula la expresión de muchos genes (Laptenko and Prives, 2006), sin embargo también se han propuesto funciones de p53 independientes de la transcripción (Moll et al., 2005). En un modelo simplificado, una célula ante un estrés transitorio o moderado, detiene el ciclo celular mediante la activación de genes diana de p53 como el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21 (también llamado CIP1 y WAF1) (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993), mientras que el estrés sostenido o severo induce la apoptosis a través de la inducción de genes como Bax (*Bcl2-associated X protein*) (Miyashita and Reed, 1995) y PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Nakano and Vousden, 2001). p53, además, puede regular otros procesos como la angiogénesis y el metabolismo (Vousden and Prives, 2009), de ahí su importancia como supresor de tumores (Figura 19).

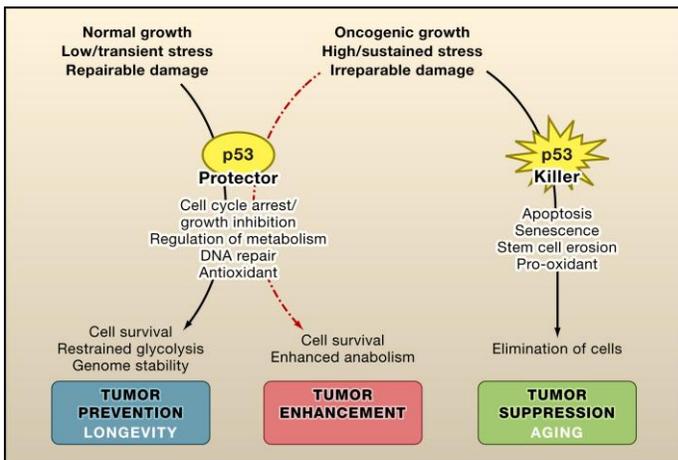


Figura 19. Función de p53 como supresor de tumores. p53 puede promover la reparación y parada transitoria del ciclo celular de células alteradas para prevenir su proliferación o inducir la muerte celular o senescencia. El tipo de respuesta dependerá del tipo de estrés. La función protectora de p53 puede contribuir al desarrollo de tumores si no es regulada apropiadamente. (Adaptada de Vousden & Prives 2009).

2.2 La respuesta de p53 ante bajos niveles de estrés: parada del ciclo celular y reparación del DNA

Cuando el daño celular es reparable, p53 no elimina la célula sino que desencadena una respuesta que repare el daño y para ello debe ocurrir una parada temporal del ciclo celular en fase G1 o G2 (Figura 110). Durante estas paradas, el DNA es reparado y se previene la proliferación de las células alteradas. El principal control inhibitorio del ciclo celular mediado por p53 ocurre a través de la inducción de p21, uno de los inhibidores más importantes durante la fase G1.

La transición de una fase del ciclo celular a otra ocurre de una manera coordinada y regulada por diferentes proteínas. Una de estas proteínas son las quinasas dependientes de ciclina (CDK),

una familia de proteínas quinasas treonina/serina que son activadas en puntos específicos del ciclo celular. Durante la fase G1, se activan CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6, en la fase S, la CDK2 y durante la fase G2/M, la CDK1 (Morgan, 1995). Los niveles de proteína de las CDK permanecen constantes durante el ciclo celular, mientras que los niveles de sus activadores, las ciclinas, son bastante bajos cuando el ciclo celular está detenido. Al igual que las CDKs, diferentes ciclinas se requieren en las distintas fases del ciclo celular. Las ciclinas del tipo D (ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3) se unen a CDK4 y CDK6, para formar un complejo CDK-ciclina D necesario para la entrada a fase G1. La ciclina E, otra ciclina de G1 forma un complejo con CDK2 para regular la salida de fase G1 y la entrada a fase S. La actividad del complejo ciclina A- CDK2 es necesaria durante la fase S. En la fase tardía de G2 e inicial de la fase M, la ciclina A junto con CDK1 promueve la entrada dentro de mitosis. Mientras que la mitosis es regulada por la ciclina B en complejo con CDK1 (Sherr, 1994). Por otro lado, la actividad de las CDK es contrarrestada por proteínas inhibitorias del ciclo celular, conocidos como inhibidores de CDK (CKI), que pueden unirse a la CDK sola o al complejo CDK-ciclina y regular la actividad de la CDK. Hay dos familias de CKI, la familia INK4 y la familia Cip/Kip. La familia INK4 incluye p15, p16, p18 y p19. Mientras que la familia Cip/Kip incluye a p21, p27 y p57 (Harper et al., 1995; Lee et al., 1995; Sherr and Roberts, 1995). Los niveles de los CKI son regulados tanto por señales extra como intracelulares, aunque la transcripción de *p21* está principalmente regulada por la actividad transcripcional de p53 (el-Deiry et al., 1993). El promotor del gen de *p21* contiene un sitio de unión para p53 lo que permite la activación de su transcripción cuando p53 se une (el-Deiry et al., 1993), mientras que p15 y p27 incrementan sus niveles en respuesta al TGF β (Lee et al., 1995; Sherr and Roberts, 1995).

En respuesta al daño al DNA, la activación de p53 induce la expresión de la proteína p21 para estimular la parada del ciclo celular en fase G1. p21 se une a la subunidad de la ciclina a través de un dominio conservado localizado en su extremo amino-terminal. Además puede unirse a CDK1 y CDK2 por un dominio diferente localizado también en el extremo amino-terminal. La interacción tanto con la CDK como con ciclina es necesaria para la total inhibición de la actividad quinasa del complejo CDK-ciclina. La unión de p21 interfiere con la unión de la CDK con su sustrato, que se une al mismo sitio que p21 sobre la CDK (Chen et al., 1996). Adicionalmente, p21 presenta en su estructura un dominio de unión para PCNA (*Proliferating cellular antigen*), un cofactor de la DNA polimerasa σ , importante para la síntesis de nucleótidos (Smith et al., 1994). Entre las primeras diana de p21 están CDK1 y CDK2 (Harper et al., 1995), cuya activación es requerida para la

fosforilación de retinoblastoma. Cuando retinoblastoma es fosforilado, se separa del complejo que forma con la proteína histona deacetilasa (HDAC), lo cual permite que los factores de transcripción E2F-1 y DP-1 se activen y regulen positivamente la transcripción de genes necesarios para la fase S, incluyendo la ciclina A, ciclina E y la fosfatasa CDC25A. Retinoblastoma se mantiene hiperfosforilado durante todo el ciclo celular por el complejo CDK2-Ciclina E (Brehm et al., 1998).

Adicionalmente, p53 induce otros inhibidores más específicos de la fase G2/M como las proteínas 14-3-3 σ y Gadd45A (*Growth arrest and DNA damage inducible alpha*). Mientras que la proteína 14-3-3 σ secuestra el complejo CDK-Ciclina en el citoplasma (Hermeking et al., 1997; Laronga et al., 2000), Gadd45 disocia CDK1 del complejo con la ciclina B1, impidiendo la entrada en mitosis (Zhan et al., 1999). La transcripción de la ciclina B1 (Innocente et al., 1999), ciclina B2 (Krause et al., 2000), ciclina A2 (Badie et al., 2000) y CDK1 (Yun et al., 1999) es inhibida por p53.

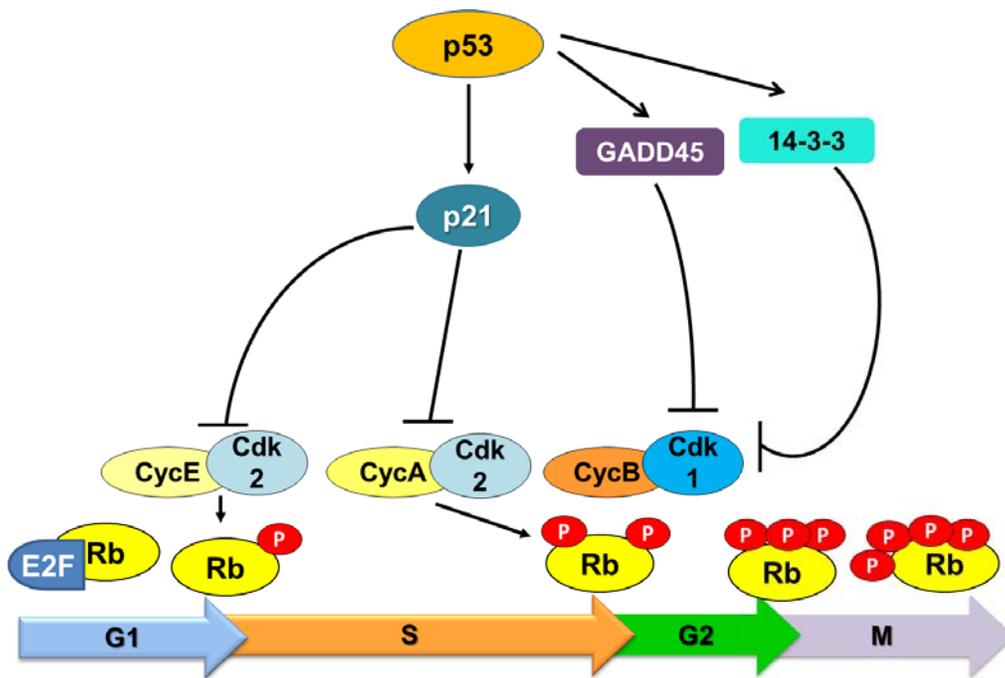


Figura I10. p53 induce la parada del ciclo celular ante situaciones de estrés celular. El progreso del ciclo celular entre las fases G1-S y G2-M puede ser detenido por la sobre-expresión de las proteínas p21, Gadd45 y 14-3-3 σ . La entrada a la fase S requiere la activación de Cdk2 que fosforila e inactiva a la proteína Rb, liberando a E2F y permitiendo que sea transcripcionalmente activo para permitir el progreso del ciclo celular, Rb debe ser defosforilado durante la fase G1 e hiperfosforilado en S, G2 y M; sin embargo la activación de p53 induce a p21 inhibiendo la actividad de las CDKs. Adicionalmente, la transición G2-M dependiente del complejo Cdk1/Ciclina B puede ser inhibida por Gadd45 y 14-3-3 σ .

A la vez que p53 induce la parada del ciclo celular, también activa factores para la reparación del daño al DNA. Uno de los mecanismos activados ocurren a través de los genes *mismatch repair* como PMS2 (*Postmeiotic segregation increased 2*) y MLH1 (*MutL homolog 1*), que junto a un complejo endonucleasa proveen acceso a las exonucleasas para remover los errores de la replicación (Chen and Sadowski, 2005). También p53R2 (*Ribonucleotide reductase M2 B*) es activado por p53, una reductasa de ribonucleótidos que produce los nucleótidos requeridos para reparar el daño (Tanaka et al., 2000). Mientras, la topoisomerasa II es inhibida por p53, para impedir la segregación de los cromosomas y el progreso de la mitosis (Sandri et al., 1996).

2.3 Inducción de apoptosis o senescencia por p53 cuando el daño es irreparable

La principal respuesta de p53 para impedir la transformación a un fenotipo maligno ante la activación de oncogenes o daño al DNA irreparable es la apoptosis. Se distinguen básicamente dos vías para iniciar la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Figura I11). La vía extrínseca se inicia por el procesamiento de señales extracelulares que permite la unión de efectores de muerte como receptores de superficie tipo Fas, mientras que la vía intrínseca procesa señales intracelulares generadas por la activación de oncogenes o daño sobre el DNA. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas 3, 6 y 7, que rompen componentes celulares como la actina o lámina nuclear, lo que desencadena en la formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados (Thornberry and Lazebnik, 1998).

La activación de la vía extrínseca por p53 induce la transcripción de genes que codifican para tres proteínas transmembranales principalmente: Fas, Killer/DR5 y PERP. El receptor de Fas sobre la superficie celular es activado por la unión del ligando de Fas (FasL), el cual es expresado principalmente por las células T (Muzio, 1998; Nagata and Golstein, 1995). La inducción de Fas por p53 ocurre en respuesta a la irradiación gamma y es específica de tejido. La inducción de Fas ha sido observada en bazo, timo, riñón y pulmón, pero no en hígado ni corazón (Bouvard et al., 2000). Los niveles de Fas a la superficie celular también pueden ser aumentados por el transporte del receptor desde el aparato de Golgi a la membrana (Bennett et al., 1998). El otro receptor inducido por p53 es Killer/DR5 (*Death domain containing receptor*), receptor de TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*). DR5 se induce por p53 en respuesta al daño al DNA y promueve la apoptosis través de la caspasa 8 principalmente (Wu et al., 1997). El otro gen apoptótico, PERP (*TP53 apoptosis effector*), se induce en respuesta al daño al DNA. Al parecer, PERP coopera con el factor

transcripcional E2F-1 para promover la apoptosis. Sin embargo, su papel más dentro de la apoptosis inducido por p53 se desconoce (Attardi et al., 2000).

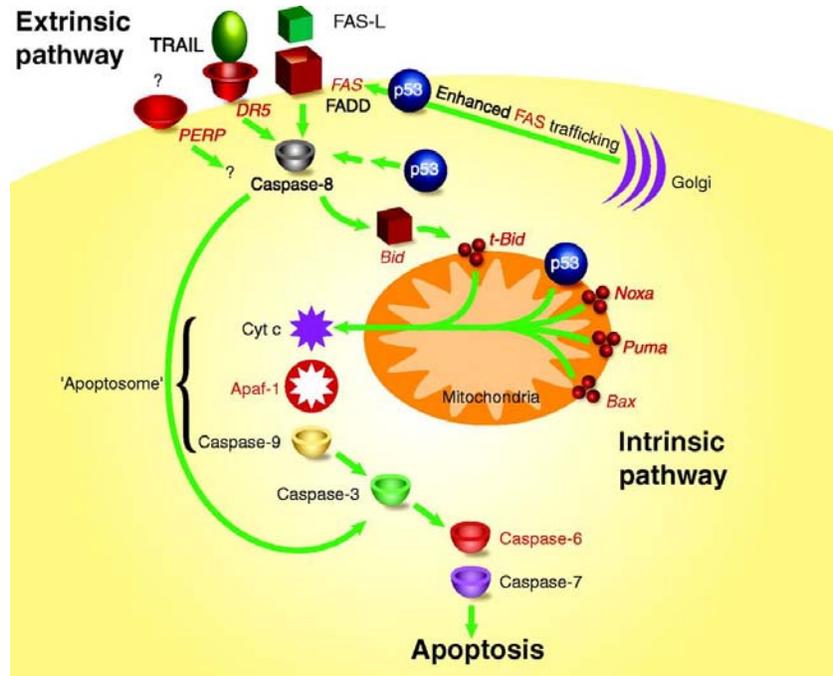


Figura I11. Apoptosis mediada por p53. p53 induce las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis que convergen en la activación de las caspasas 3, 6 y 7. p53 tiene funciones dependientes e independientes de transcripción que potencian la apoptosis. Mientras que el p53 nuclear induce la transcripción de genes como Noxa, Puma o Bax, el p53 que está en el citoplasma activa proteínas pro-apoptóticas en el citoplasma que inducen liberación de citocromo C. (Adaptado de Haupt et al. 2003).

En la vía intrínseca, las proteínas de la familia Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) son quienes controlan la liberación del citocromo c de la mitocondria. Dentro de la familia Bcl2 hay miembros tanto antiapoptóticos como proapoptóticos. Los miembros de la familia se han clasificado por la homología de los dominios a Bcl-2 (BH) (BH1, BH2, BH3 y BH4) y el dominio transmembranal. La familia Bcl2 se ha sido clasificado en tres clases: las proteínas antiapoptóticas, más similares a Bcl2 como Bcl-X_L, proteínas proapoptóticas como Bax y Bak (*Bcl2 antagonist/killer 1*), estructuralmente más similares a Bcl2 y Bcl-X_L y las proteínas proapoptóticas *BH3 only*, que incluyen distintos genes diana de p53 como Bax, Noxa, PUMA y Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) (Cory et al., 2003).

p53 induce la transcripción de Bax, que se localiza en la membrana externa de la mitocondria activando la liberación de citocromo c (Miyashita and Reed, 1995). El citocromo c y Apaf1, inducen a la caspasa 9 que rompe y activa las caspasas efectoras (Vousden and Lu, 2002). p53 también activa la transcripción de Apaf1 (*Apoptosis protease activating factor 1*). PUMA (Nakano and Vousden, 2001) y Noxa (Oda et al., 2000a) también contribuyen a la liberación del citocromo c y activan Bax y Bak (Du et al., 2011). La interacción entre p53 y Bak promueve la oligomerización de Bak y la formación de este complejo coincide con la pérdida de la interacción entre Bak y la proteína antiapoptotica Mcl1 (Leu et al., 2004). p53 además previene la activación de la transcripción de *Bcl2* inhibiendo su factor transcripcional Brn-3a (Budhram-Mahadeo et al., 1999).

La localización de p53 también es importante en la regulación de la apoptosis. Mientras el p53 nuclear regula genes proapoptóticos, el p53 citoplasmático activa directamente las proteínas proapoptóticas *Bcl2* para permeabilizar la mitocondria e iniciar la apoptosis. Después del daño genotóxico, *Bcl-X_L* secuestra al p53 citoplasmático y simultáneamente el p53 nuclear induce la expresión de PUMA. PUMA desplaza a *Bcl-X_L* de p53, permitiendo la permeabilización mitocondrial y el desencadenamiento de la apoptosis (Chipuk et al., 2005).

Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en la apoptosis inducida por p53, prueba de ello son los genes *PIG3* (*p53 inducible gene 3*) y *PIG6* (*p53 inducible 6*) que se inducen por p53. Mientras que *PIG3* codifica para una reductasa dependiente de NADPH que genera especies reactivas de oxígeno esenciales para la oxidación de los componentes mitocondriales (Contente et al., 2002), *PIG6* codifica para una prolina oxidasa, que genera también especies reactivas de oxígeno que promueven la apoptosis (Rivera and Maxwell, 2005). Además, p53 inhibe genes con actividad anti-oxidante como *x-CT* (*subunit of the cystine/glutamate transporter*), *GST-α1* (*Glutathione-S-transferase*) o *NQO1* (*NADPH Quinone oxidoreductase*) (Faraonio et al., 2006).

2.4 Regulación de p53

Los niveles de p53 son regulados principalmente por ubiquitinación y la posterior degradación por el proteasoma. La principal ubiquitina ligasa de p53 es *MDM2* (*Mouse double minute 2*). Sin embargo, existen diferentes modificaciones post-traduccionales durante la homeostasis normal y las respuestas inducidas por el estrés que regulan la actividad de p53 como la fosforilación, acetilación,

metilación y otras modificaciones similares a la ubiquitina como la sumoilación o neddilación, así como las interacciones proteína-proteína o la regulación de su estado oligomérico (Brooks and Gu, 2003; Kruse and Gu, 2009; Laptenko and Prives, 2006). Más recientemente, ha surgido la importancia de la regulación transcripcional de p53 por microRNAs (miRNAs) y la posibilidad de ser utilizada para diagnóstico y nuevas terapias en la prevención y tratamiento del cáncer (Hermeking, 2012).

2.4.1 Estructura de p53

La forma activa de la proteína p53 está formada por un tetrámero de cuatro subunidades idénticas. Cada monómero presenta un dominio de transactivación (TA) en el extremo amino-terminal (aminoácidos 1-63), una región rica en prolinas (63-91), el dominio central de unión al DNA (DBD) (100-300) y el extremo carboxilo-terminal que contiene el dominio de tetramerización (320-360) y un dominio regulatorio (363-393) sujeto a diversas modificaciones post-traduccionales (Laptenko and Prives, 2006) (Figura I12).



Figura I12. Estructura de p53. Cada monómero de p53 presenta un dominio de transactivación rico en prolinas, dominio de unión al DNA, dominio de tetramerización y un dominio carboxilo-terminal. Las cajas conservadas I-V se localizan en el dominio de transactivación y de unión al DNA.

Dentro del dominio de TA se identifican dos dominios distintos: TAD I (1-40) y TAD II (43-63), los cuales interactúan con la maquinaria basal de transcripción y con el dominio adyacente rico en prolinas para la transactivación de la mayoría de los genes inducidos por p53 (Joerger and Fersht, 2007).

También es posible identificar cinco cajas altamente conservadas (*box*) entre todas las especies (Pavletich et al., 1993). La I se localiza entre los aminoácidos 15 y 29 y se requiere para la interacción con MDM2. Las otras se localizan en el dominio central de unión al DNA. Los residuos

K120, S241, R248, R273, A276, C277, R280 y R283 son necesarios para la interacción con el DNA. El dominio de unión al DNA confiere la actividad de unión específica de p53 a la secuencia de los promotores de genes diana de p53 (Joerger and Fersht, 2007). Para ello, p53 debe reconocer los elementos de respuesta (RE) en estos genes mediante secuencias consenso localizadas en su estructura. Estas secuencias contienen dos copias del sitio de unión consenso 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' (Pu purina, Py pirimidina) separadas por 13 nucleótidos. La presencia de residuos AT en la mitad de cada sitio resulta en una fuerte activación positiva, mientras que bases no-consenso en este sitio se asocian con baja funcionalidad afectando la transactivación dependiente de p53 (Laptenko and Prives, 2006).

Además, en la estructura de p53 se localizan señales de localización nuclear (NLS) y exportación nuclear (NES), que permiten a la proteína entrar o salir del núcleo. Se distinguen tres señales NLS, la principal se localiza entre los residuos 305 y 322 y las otras dos entre los residuos 366 y 372 y 377 a 381. Cuando p53 adquiere la conformación de tetrámero, la señal NES es enmascarada (Joerger and Fersht, 2007; Laptenko and Prives, 2006).

2.4.2 Modificaciones post-transduccionales de p53

2.4.2.1 Fosforilación

La fosforilación de p53 se reconoce como el primer evento crucial en la estabilización de p53 al reducir su interacción con MDM2 (Figura I13). p53 puede ser fosforilado por un gran número de quinasas que incluye ATM, ATR, DNA-PK, Chk1, Chk2 entre otras (Vousden and Prives, 2009) (Figura I14). Ante un estrés genotóxico, los primeros residuos en fosforilarse son Ser15 (Serina 15) (Ser18 en ratón) y Ser20 (Ser23 en ratón), seguidos por los residuos Thr18 (Treonina 18) y Ser37, todos ellos afectan a la interacción con MDM2 y enmascaran la señal NES reteniendo a p53 en el núcleo (Kruse and Gu, 2009; Vousden and Prives, 2009).

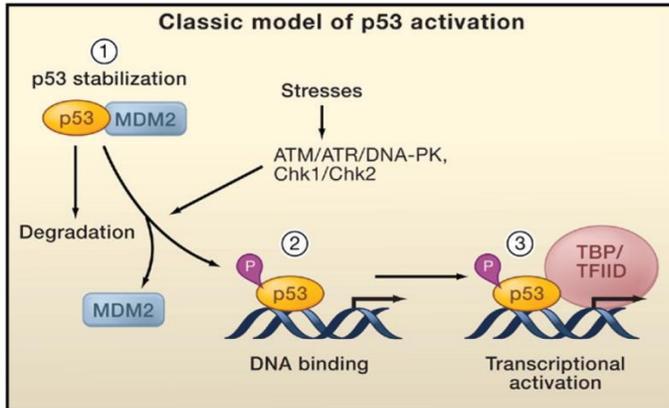


Figura 113. Modelo clásico de activación de p53. Durante la activación de p53 inducida por el estrés celular, se distinguen 3 pasos secuenciales: 1) estabilización de p53 a través de la fosforilación de residuos como Ser15, 2) unión al DNA y 3) reclutamiento de la maquinaria transcripcional. La fosforilación inhibe la degradación de p53 mediada por MDM2. (Adaptado de Kruse & Gu 2009).

Sin embargo, la fosforilación en otros residuos tiene consecuencias diferentes a impedir la interacción p53-MDM2, como es el caso de la fosforilación de la Ser46 (Ser58 en ratón) en respuesta al daño por inducido por rayos UV. La fosforilación de este residuo se correlaciona con la inducción de la proteína pro-apoptótica, p53AIP1 (*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*), que promueve la liberación del citocromo c mitocondrial (Oda et al. 2000). Una de las quinasas que fosforilan este residuo es HIPK2 (*Homeodomain interacting protein kinase 2*), una proteína regulada por el supresor de tumores *Axin*. Cuando el estrés es moderado, MDM2 induce la degradación de HIPK2; por el contrario si el daño es severo HIPK2 se estabiliza, fosforila a p53 en Ser46 para inducir apoptosis (D’Orazi et al., 2002; Rinaldo et al., 2007). Sin embargo, HIPK2 no es la única quinasa que fosforila Ser46, DYRK2 (*Tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2*) (Taira et al., 2007), AMPK (*AMP activated protein kinase*) (Okoshi et al., 2008), PKC δ (*Protein kinase C*) (Yoshida et al., 2006) y p38 (Perfettini et al., 2005) también pueden hacerlo. En ocasiones, eventos de fosforilación previos y específicos son requeridos para una segunda fosforilación. Es el caso de p38, que requiere la fosforilación de p53 en Ser15 antes de fosforilar el residuo Ser46 (Brooks and Gu, 2003).

En el extremo carboxilo-terminal también se han identificado residuos susceptibles de ser fosforilados con consecuencias sobre la actividad de p53. Uno de ellos es la fosforilación de la Ser315 que regula la capacidad de p53 para reprimir a Nanog, un factor requerido en la auto-renovación de las células madre, a través del reclutamiento del co-represor mSin3A (Vousden and Prives, 2009). Adicionalmente, la fosforilación de Ser315 es requerida por el factor transcripcional E2F para facilitar la retención nuclear de p53 (Fogal et al., 2005). Ante el daño al DNA, se induce la

fosforilación de Ser366, Ser378 y Thr387 por Chk1 y Chk2. Mutaciones en estos sitios de fosforilación disminuyen la acetilación de p53 y su actividad transcripcional (Ou et al., 2005).

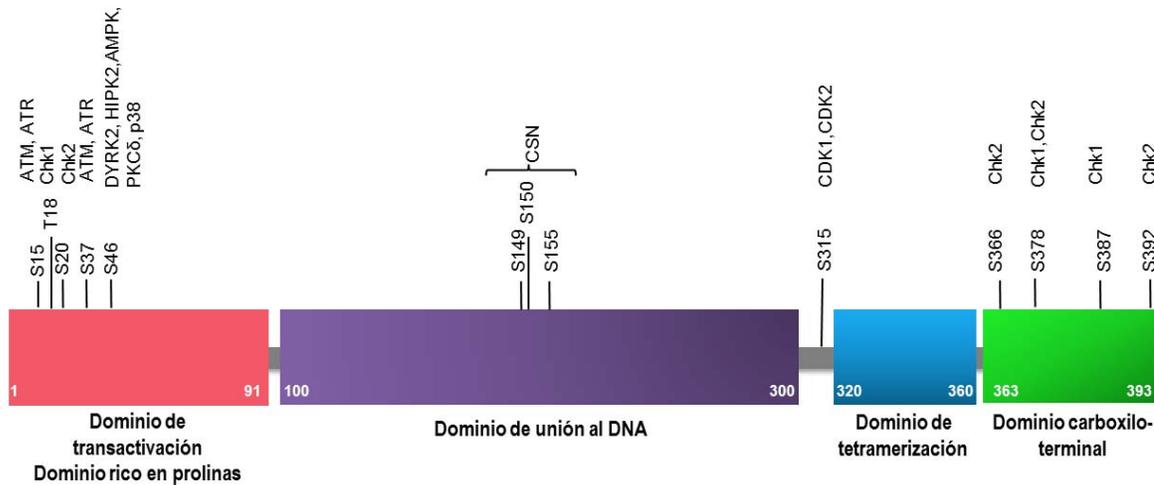


Figura I14. p53 presenta múltiples residuos de fosforilación. p53 puede ser fosforilado por diversas quinasas como ATM, ATR, Chk1, Chk2, DYRK2, HIPK2, AMPK, CSN, Cdk1, Cdk2 regulando su interacción con MDM2, activación transcripcional o localización subcelular, así como la respuesta de otros cofactores. (S, serina; T, treonina).

Algunos residuos de serina y treonina en el dominio de unión al DNA (Ser149, Thr150 y Thr155) son diana de la fosforilación por el complejo denominado signalosoma COP9 (CSN). Estos eventos de fosforilación al parecer ocurren en condiciones normales y promueven la degradación de p53 (Bech-Otschir et al., 2001).

2.4.2.2 Acetilación

Las enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs) representan un papel importante en la regulación de p53, particularmente regulando su transcripción. La unión covalente de un grupo acetilo hasta el grupo amino de lisinas, se describió inicialmente para las histonas. Esta reacción, permite que el grupo acetilo neutralice la carga sobre el residuo de lisina y la fuerza de las interacciones histonas-DNA, permitiendo así la relajación del nucleosoma. p53 fue la primera proteína no histona descrita que podía ser regulada por procesos de acetilación y desacetilación. Los niveles de acetilación de p53 son significativamente aumentados en respuesta al estrés celular y se correlacionan con la estabilización, activación de p53 y sus funciones biológicas (Kruse and Gu, 2009) (Figura I15).

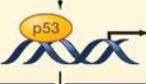
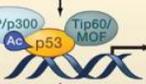
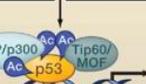
 DNA damage & other types of stress	Transcriptional targets	Biological consequence	p53 modification requirement
A 	MDM2 Pirh2	Feedback and cell survival	Acetylation is not required
B 	p21 GADD45	Growth arrest DNA repair	Partial acetylation is sufficient
C 	BAX PUMA FAS NOXA	Irreversible apoptosis	Specific acetylation is required

Figura I15. Los niveles de acetilación regulan la respuesta de p53. El tipo de estrés puede requerir diferentes modificaciones post-transcripcionales de p53 para mediar su función a diferentes niveles. (A) La primera clase de genes inducidos por p53 como MDM2 y Pirh2 protegen a la célula de una excesiva activación, en este caso la acetilación de p53 no es requerida. (B) La segunda clases de genes que se inducen están involucrados en la reparación del DNA o parada del ciclo celular y requieren para su activación y expresión el reclutamiento de acetiltransferasas y la acetilación parcial de p53. (C) Cuando el daño no es reparado y debe inducirse la apoptosis, se requiere la total activación de los genes pro-apoptóticos regulados por p53, lo cual se consigue mediante la total acetilación de p53. (Adaptado de Kruse & Gu 2009).

p53 es acetilado específicamente en múltiples residuos de lisina (Lys370, Lys371, Lys372, Lys373, Lys381 y Lys382) del dominio regulatorio del extremo carboxilo-terminal por p300-CBP, induciendo la unión de p53 al DNA y la activación transcripcional de varios genes (Gu and Roeder, 1997). La acetilación de los residuos Lys373 y Lys382 es inducida ante el daño al DNA (Ito et al., 2001). PCAF (*p300 and CBP associated factor*) acetila p53 en la lys320 localizada en la señal NLS en respuesta al daño al DNA, cuando las Ser33 y Ser37 están fosforiladas. La acetilación de este residuo incrementa la afinidad de p53 por su secuencia de unión en el DNA y promueve la activación de p21 (Liu et al., 1999) (Figura I16).

Otros cofactores que participan en la acetilación de p53 son Tip60 y hMof, que modifican el residuo Lys320 dentro del dominio de unión al DNA. Mutantes de este residuo retienen la habilidad para inducir parada del ciclo celular, pero fallan para inducir apoptosis (Sykes et al., 2006). La acetilación de la Lys320 se produce tanto por daño al DNA como por la activación del oncogen *p19(Arf)* (*p14(ARF)* en humanos) (Kruse and Gu, 2009). La Lys164 también ha sido identificada como un residuo que puede ser acetilado por p300/CBP.

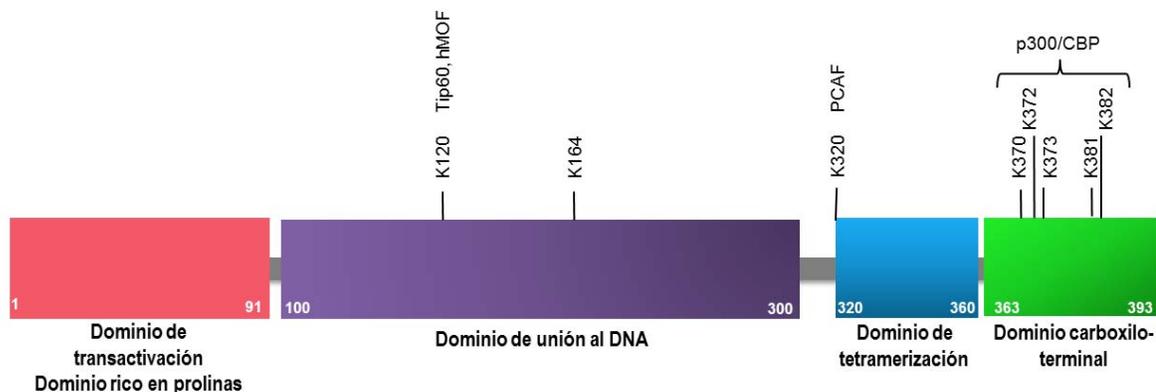


Figura 116. p53 es acetilado en varios residuos del dominio de unión al DNA y el dominio carboxi-terminal. Las acetiltransferasas Tip60, hMOF, PCAF y p300/CBP puede acetilar residuos de lisina de p53 que incrementan la afinidad por el DNA y regulan la activación de determinados genes dependiendo del tipo de daño. (K, lisina).

Los estudios con ratones mutantes han mostrado que la pérdida individual de la acetilación de algún residuo es compensada con la modificación de los otros sitios. Sin embargo, la pérdida de la acetilación de los seis residuos de lisina del extremo carboxilo-terminal así como de la Lys120 y Lys164, inhibe por completo a p21, incrementando la proliferación celular (Sykes et al., 2006; Tang et al., 2006). Otros datos más recientes con ratones mutantes de p53 en donde han sido reemplazados los tres sitios de acetilación del dominio de unión al DNA, han mostrado que estos mutantes pierden su habilidad para inducir la parada del ciclo celular, apoptosis y senescencia dependiente de p53, pero retienen la capacidad para inhibir la glicólisis y reducir los niveles de ROS, observando que estos eventos parecen ser suficientes para suprimir la formación de tumores (Li et al., 2012).

2.4.2.3 Metilación

Se han identificado tres metiltransferasas que metilan residuos de lisina del extremo carboxilo-terminal de p53 (Figura 117). La metiltransferasa Set9 metila a p53 en Lys372, incrementando la expresión de p21 (Chuikov et al., 2004). Por el contrario, la metilación de Lys370 y Lys382 por Smyd2 (*SET and MYND domain containing 2*) (Huang et al., 2006) y Set8 (Shi et al., 2007), respectivamente, reprimen la actividad de p53. Además se ha observado que la metilación de Lys372 mediada por Set9, inhibe la metilación de Lys370 mediada por Smyd2 (Huang et al., 2007). La metilación de Lys370 y Lys382 provee un sitio de unión para 53BP1, un factor de reparación del

DNA, favoreciendo la interacción entre p53 y 53BP1. Por el contrario, la demetilasa LSD1 demetila la Lys370, alterando el punto de anclaje para 53BP1 (Huang et al., 2007).



Figura I17. p53 puede ser modificado por metilación. Las metiltransferasas PRMT5, Smyd2, Set7 y Set9 pueden metilar residuos de arginina (R) del dominio de tetramerización o lisinas (K) dentro del dominio carboxi-terminal.

También hay residuos de arginina que pueden ser metilados por PRMT5 (*Protein Arginine Methyltransferase 5*) en respuesta al daño al DNA, sin embargo la eliminación de PRMT5 no impide la apoptosis dependiente de p53 (Jansson et al., 2008). A pesar de todos estos estudios, los roles precisos de la metilación se desconocen, así como la importancia que puede tener que varios residuos puedan ser metilados o acetilados.

2.5 MDM2, un importante regulador de p53

Tres estudios independientes identificaron a MDM2 como la ubiquitina ligasa de p53 (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). No obstante, se ha observado que si bien los niveles de p53 son altos en animales *knockout* de MDM2, p53 todavía puede ser degradado (Ringshausen et al., 2006), sugiriendo que otros mecanismos independientes de MDM2 podrían estar operando. Esta hipótesis ha sido reconciliada con el hallazgo de las ubiquitinas ligasas COP1 (*Constitutive photomorphogenic protein*) (Dornan et al., 2004), Pirh2 (*p53 induced protein with a RING-H2 domain*) (Leng et al., 2003) y ARF-BP1 (Chen et al., 2005), que también contribuyen al control de los niveles de p53, demostrando la existencia de mecanismos redundantes en la regulación de los niveles de p53.

MDM2 es una E3 ubiquitina ligasa de la familia RING capaz de regular sus propios niveles a través de la autoubiquitinación. MDM2 en conjunto con la E2 enzima conjugadora de ubiquitina Ubch5, ubiquitina a p53 tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales residuos de lisina de p53 que son ubiquitinados por MDM2 se localizan en el extremo carboxilo-terminal: K370, K372, K373, K381 y K386 (Rodríguez et al., 2000). Varios de estos residuos ubiquitinados por MDM2 pueden también ser acetilados por la acetil transferasa p300-CBP, lo que permite la activación de p53. Cuando MDM2 ubiquitina p53, este no puede ser acetilado por p300-CBP y es degradado rápidamente por el proteasoma (Ito et al., 2001). p300-CBP no solo acetila p53, también puede acetilar MDM2, previniendo la ubiquitinación de p53 (Wang et al., 2004). Adicionalmente, la expresión de MDM2 es regulada en una manera dependiente de p53. Así, el incremento de p53 también induce un aumento en los niveles de MDM2 que degradaría p53, creando un *feedback* positivo-negativo de los niveles de ambas proteínas (Lee and Gu, 2010). MDM2 puede también monoubiquitinar a p53, lo cual no causa directamente la degradación de p53 sino que induce cambios en su localización y función, como la exportación del núcleo al citoplasma inhibiendo su actividad transcripcional o la translocación a la mitocondria para activar la apoptosis en una manera independiente de transcripción (Li et al., 2003).

La regulación del complejo MDM2-p53 se da a varios niveles (Figura 118). Un regulador muy importante en el complejo MDM2-p53 es MDMX, un homólogo de MDM2 que también presenta un dominio RING por el cual interactúa con MDM2, pero sin actividad ubiquitina ligasa, tampoco presenta señales de NLS o de NES, sugiriendo que su interacción con MDM2 es crítica para su localización nuclear (Sharp et al., 1999; Tanimura et al., 1999). MDM2 es capaz de ubiquitinar MDMX para regular sus niveles, mientras que MDMX y MDM2 pueden actuar sinérgicamente para aumentar la ubiquitinación de p53 (Ghosh et al., 2003). La eliminación de MDMX o MDM2 en ratones causa letalidad embrionaria, que puede ser rescatada por la eliminación de p53, sugiriendo que el complejo es necesario para regular a p53 (Jones et al., 1995; Parant et al., 2001).

residuos Ser166 y Ser186 de MDM2 y Ser367 en MDMX. La fosforilación mediada por CK1 α (*Casein kinase 1 α*) sobre MDMX incrementa la afinidad por p53, reduciendo su actividad (Wade et al., 2013).

Otro importante regulador de MDM2 es ARF, un supresor de tumores que se activa durante el estrés celular promoviendo la apoptosis dependiente e independiente de p53 (Lowe and Sherr, 2003). ARF interfiere con la interacción MDM2-p53, impidiendo la degradación de p53 por MDM2. ARF está a niveles muy bajos en células normales pero su activación es inducida de manera importante ante el estrés oncogénico, suprimiendo la proliferación celular incontrolada y promoviendo la apoptosis dependiente de p53 (Sherr, 2006). Por otra parte, ARF presenta una localización predominantemente nucleolar, lo cual permite retener a MDM2 en el nucléolo e impedir la degradación de p53 (Honda and Yasuda, 1999).

Enzimas desubiquitinantes también pueden regular la actividad de MDM2 sobre p53. Es el caso de HAUSP (*Herpesvirus associated ubiquitin specific protease*) que puede deubiquitinar p53 en el núcleo, incrementando su estabilidad. HAUSP también puede deubiquitinar a MDM2, incrementando la degradación de p53 (Brooks et al., 2007).

Un tipo de estrés que también se ha demostrado regular la interacción MDM2-p53 es el llamado estrés nucleolar o estrés ribosomal (Rubbi and Milner, 2003). La biogénesis ribosomal es un proceso esencial para la célula, que permite la síntesis de proteínas a través de la coordinada expresión del RNA ribosomal (rRNA) y proteínas ribosomales (RPs), procesamiento del rRNA y ensamblaje de las subunidades del ribosoma 40S y 60S en el nucléolo (Zhang and Lu, 2009). La alteración de cualquier paso de este proceso promueve la unión de varias RPs al dominio central de MDM2, que inhibe su actividad de degradación sobre p53, permitiendo que p53 se estabilice y active (Lindström et al., 2007). Entre las RPs que se han encontrado que inhiben a MDM2 están RPL5, RPL11 y RPL23 (Zhang and Lu, 2009). Otra RP que contribuiría a la estabilidad de p53 es RPL26 que incrementa la traducción del mRNA p53 uniéndose a su región 5' (Takagi et al., 2005), como también lo hace RPS27L (Zhu et al., 2009).

2.6 Otras modificaciones por ubiquitina y moléculas similares a la ubiquitina

Como se ha explicado anteriormente, MDM2 no es la única proteína que modifica a p53 por ubiquitina. Un resumen de las principales ubiquitinas ligasas y enzimas desubiquitinantes que modifican p53 se muestran en la tabla I3.

Tabla I3. Ubiquitinas ligasas y enzimas desubiquitinantes de p53 (Adaptada de Hock & Vousden 2014).

Enzima	Clase	Tipo	Cadena	Residuo modificado	Efecto sobre p53
MDM2	E3	RING	K48	K370, K372, K373, K381, K382, K386	Represión actividad transcripcional, degradación, exportación nuclear
MDMX	(E3)	RING	K48	K370, K372, K373, K381, K382, K386	Represión actividad transcripcional, degradación (con MDM2)
Arf-BP1	E3	HECT			Degradación
Carp1	E3	RING			Degradación
Carp2	E3	RING			Degradación
CHIP	E3	U box			Degradación
Cop1	E3	RING	K48		Degradación
Cul1	E3	RING			Degradación
Cul4a	E3	RING			Degradación
Cul5	E3	RING	K48		Degradación
Cul7	E3	RING			Represión actividad transcripcional
Cul9/Parc	E3	RING			Retención en el citoplasma, apoptosis
Hades	E3	RING	K24		Degradación
MSL2	E3	RING	K351, K357		Exportación nuclear
Pirh2	E3	RING	K48	K101, K164, K292, K305, K357, K382, K386	Degradación
Synoviolin	E3	RING			Degradación, exportación nuclear
Topors	E3	RING			Degradación
Trim24	E3	RING			Degradación
Trim28	E3	RING			Degradación
Trim39	E3	RING			Degradación
wwp1	E3	HECT			Estabilización, exportación nuclear
UBC13	E2				Estabilización como monómero
E4F1	E4		K63	K319, K320, K321	Modulación de la actividad transcripcional
Gankyrin	E4		K48		Degradación
p300/CBP	E4				Degradación
UB4B	E4	U box			Degradación
Ying Yang 1	E4				Degradación
Hausp	E4				Degradación (estabilización MDM2/MDMX)
Otubain 1	DUB				Estabilización
USP10	DUB				Estabilización
USP29	DUB				Estabilización
USP42	DUB				Estabilización

Más recientemente, ha surgido la modificación de p53 por moléculas estructuralmente similares a la ubiquitina como SUMO y Nedd8. Mientras SUMO presenta una homología del 18% con la ubiquitina, Nedd8 es más cercana a la ubiquitina con un 58% de homología. La cascada de activación también incluye una E1, E2 y E3, sin embargo la conjugación de NEDD8 requiere un conjunto diferente de enzimas con APPBP1-Uba3 como enzima E1 y Ubc12 como E2 (Hock and Vousden, 2010). MDM2 también actúa como una E3 Nedd8 sobre p53, promoviendo la neddilación de los residuos de Lys370, 372 y 373 que inhiben la actividad transcripcional de p53 (Xirodimas et al., 2004). Otra E3 Nedd8 es FBXO11 que media la neddilación de Lys320 y 321 favoreciendo la actividad de supresión mediada por p53 (Abida et al., 2007).

La mayoría de E3 SUMO ligasas que se han descrito modifican a p53 en una única lisina, el residuo Lys386. La principal pertenece a la familia PIAS (Stehmeier and Muller, 2009), aunque MDM2 puede también participar la SUMOilación de p53 junto con p14ARF. Los efectos de esta modificación aún no se conocen con exactitud, se ha asociado con un incremento modesto de la actividad transcripcional de p53 acompañada por una acelerada senescencia (Bischof and Dejean, 2007), pero también se ha reportado que reduce la actividad transcripcional al disminuir la acetilación de p53 y su afinidad por la cromatina. También se ha sugerido que la SUMOilación regularía la localización subcelular de p53 (Stehmeier and Muller, 2009), favoreciendo la monoubiquitinación de p53 que permite la exportación nuclear (Carter et al., 2007).

2.7 Regulación de la oligomerización de p53

p53 presenta la capacidad de formar un complejo proteico de cuatro moléculas idénticas (homo-oligomerización), lo cual incrementa su unión al DNA y su actividad como factor transcripcional. La funcionalidad de la oligomerización fue comprobada con el hallazgo de que proteínas mutadas de p53 en el dominio de unión al DNA actuaban como dominantes negativos sobre la proteína *wild-type*, alterando su actividad. En contraste a otros factores de transcripción que oligomerizan bajo la interacción con el DNA, p53 existe como tetrámero en ausencia del DNA (Chène, 2001).

El dominio de tetramerización se encuentra dentro del extremo carboxilo-terminal entre los aminoácidos 320-360. La estructura del dominio de tetramerización determinada por cristalografía de rayos X ha mostrado que cada monómero contiene una hoja plegada β (residuos 326-333) ligada a una hélice α (335 a 355) por un residuo de glicina (Gly334) asemejándose a la forma de una V

(Figura I19). También se ha determinado que un tetrámero de p53 es un dímero de dímeros. Cada subunidad dimérica es una doble hoja β antiparalela con dos hélices α . El tetrámero se forma a través de las interacciones hidrofóbicas entre las hélices, formando un ovillo de cuatro hélices (Clore et al., 1994). Estudios *in vitro* han demostrado que la formación de la subunidad dimérica es más rápida que la formación del tetrámero, y que la oligomerización es dependiente de la concentración de dímeros (Nicholls et al., 2002).

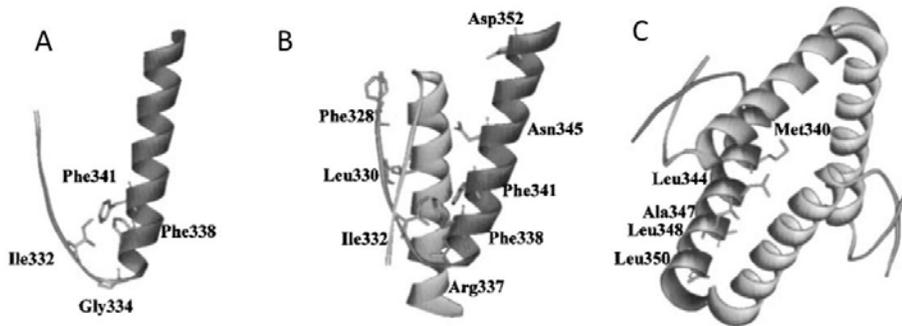


Figura I19. Estructura del dominio de oligomerización de p53. (A) Cada monómero presenta una cadena β y una hélice α , que cuando forman un dímero (B) se organizan las cadenas de manera antiparalela. (C) El tetrámero se forma a partir de las interacciones entre las hélices y es estable debido a las interacciones hidrofóbicas (Adaptado de Chène 2001)

El dominio de tetramerización puede influir tanto en la afinidad de la interacción como en la interacción de los complejos DNA-p53, así como en la preorganización de los dominios de unión al DNA de p53. Se ha sugerido que un dímero de dominios de unión al DNA se une primero a una mitad del sitio de unión consenso en el DNA, incrementando la probabilidad de la unión de un segundo dímero a la otra mitad adyacente (Nagaich et al., 1997). La coexpresión de proteínas p53 *wild-type* y mutantes resultan en la formación de un 50% de hetero-oligómeros con una capacidad alterada de unión al DNA. Esta alteración al parecer no se debe a la subunidad dimérica mutante que inhibe su asociación al complejo con el DNA, sino a la falta de contribución (cooperatividad positiva) de la subunidad mutante (Kitayner et al., 2006; Nicholls et al., 2002). Los estudios de estequiometría han mostrado que únicamente los complejos 4:1 de p53 a DNA son estables (Weinberg et al., 2004). Aunque la inactivación de la oligomerización disminuye bastante la actividad transcripcional de p53, existen otras funciones independientes de la función transcripcional de p53

que son retenidas por los mutantes de p53 defectuosos en el dominio de tetramerización (Kawaguchi et al., 2005).

También se ha propuesto la importancia de la oligomerización de p53 como un mecanismo regulador del transporte nucleo-citoplasmático de p53 (Figura I20). La señal NES está dentro del dominio de tetramerización y la señal NLS adyacente. Mutaciones de la señal NES impiden la exportación de p53 y disminuyen la formación de tetrámeros. Resultados que apoyan esta hipótesis fueron obtenidos con células de neuroblastoma que presentan p53 mayoritariamente citoplasmático debido a una exportación nuclear incrementada. La expresión ectópica de un dominio de tetramerización restauraba la retención nuclear de p53 (Stommel et al., 1999). También se ha demostrado que el p53 oligomerizado es capaz de entrar al núcleo, aunque no tan eficientemente como el monómero, sugiriendo que la oligomerización puede estar autoregulada, cambiando la disposición de p53 de oligómero a monómero en el momento en que p53 debe ser transportado hacia o fuera del núcleo. La fosforilación en Ser392 enmascara la señal NES, reduce la exportación nuclear y favorece la oligomerización de p53 (Liang and Clarke, 2001).

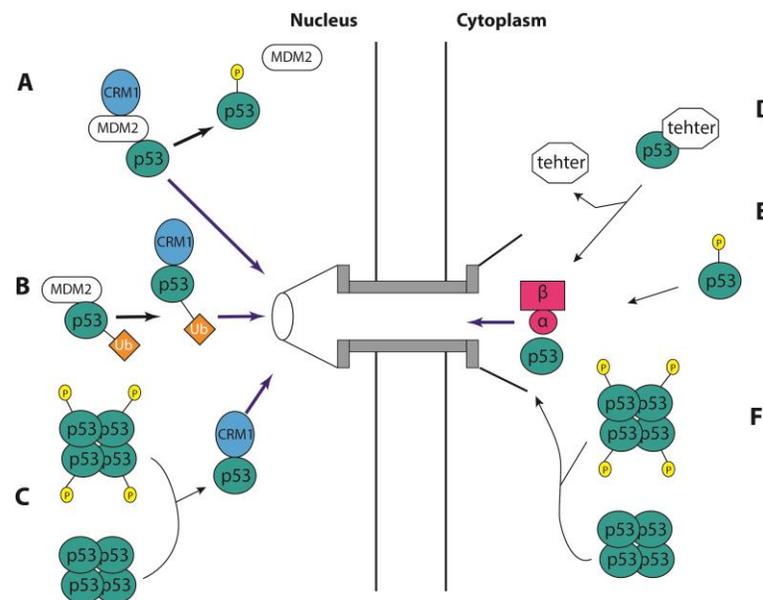


Figura I20. Regulación de la localización subcelular de p53. (A) MDM2 se une a p53 en el núcleo y se translocan juntos al citoplasma, mediado por la unión de CRM1 a MDM2. (B) MDM2 ubiquitina a p53 lo cual impide que la NES esté expuesta para la unión de CRM1 y la exportación nuclear. (C) La oligomerización de p53 aumentada por la fosforilación en Ser392 reduce su exportación nuclear, el monómero puede unirse a CRM1 para salir del núcleo. (D) Una posible proteína anclaje se une a p53 inhibiendo su importación nuclear al unirse a través de la señal NLS de p53 bloqueando la unión a la importina α . (E) La fosforilación de p53 bloquea su unión a la importina α . (F) La tetramerización de p53 enmascara la NLS y reduce la eficiencia para el importe nuclear. (Adaptado de Liang & Clarke 2001).

Adicionalmente, se ha demostrado la interacción entre miembros de la familia S100 (S100B, S100A4) y el dominio de tetramerización de p53. La familia S100 comprende un grupo de proteínas de unión al calcio que se componen de homo o heterodímeros y actúan como estímulo para la supervivencia neuronal y para la diferenciación y proliferación de astrocitos, además de actuar como señal de transducción. S100B y S100A4 se unen a p53 únicamente en estados bajos de oligomerización, alterando el equilibrio de los tetrámeros de p53. La presencia de las proteínas S100 incrementa la población de monómeros de p53 en el citoplasma, aumentando en consecuencia la eficiencia del transporte nuclear (Fernandez-Fernandez et al., 2005). La regulación de la localización celular de p53 mediada por su estado oligomérico también se ha mostrado estar regulado por la proteína ARC (*Apoptosis repressor with caspase recruitment domain*), un inhibidor endógeno de apoptosis expresado principalmente en miocitos del musculo esquelético y cardiaco así como en neuronas (Koseki et al., 1998). La interacción directa entre ARC y el dominio de tetramerización de p53 inhibe la oligomerización de p53, relocalizando a p53 mayoritariamente en el citoplasma (Foo et al., 2007).

La acetilación de las lisinas del extremo carboxilo-terminal de p53 por la acetil-transferasa p300 también pueden regular la oligomerización y localización celular de p53. La acetilación regula el tráfico de p53 núcleo-citoplasma, neutralizando la carga de las lisinas y en consecuencia la exportación nuclear de p53 dependiente de la oligomerización. La sobreexpresión de p300 estimula la acumulación citoplasmática de p53. De esta manera, el nivel de acetilación funcionaría como una señal que promueve la exportación de p53 (Kawaguchi et al., 2006). Otros estudios sugieren que la oligomerización de p53 precede a la acetilación y provee sitios de unión para las acetiltransferasas, por lo cual la acetilación solo puede ocurrir cuando p53 ha oligomerizado. Mutantes que no pueden oligomerizar tampoco son acetilados ni inducen la expresión de p21 (Itahana et al., 2009). Muy recientemente, se ha observado que la proteína nucleolar, MYBBP1A (*Myb binding protein 1A*) actúa como una plataforma molecular para la oligomerización de p53, una vez que p53 está dispuesto como tetrámero es acetilado por p300 en situaciones de estrés nucleolar, aumentando la apoptosis dependiente de p53 (Ono et al., 2014) (Figura I21).

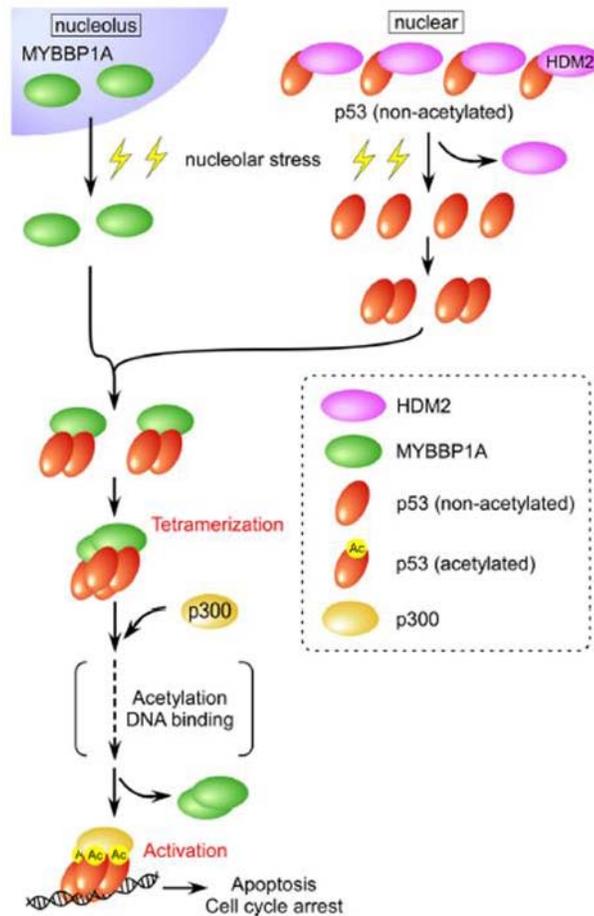


Figura I21. La oligomerización de p53 precede a la acetilación de p53 mediada por la acetiltransferasa p300. Antes el estrés nucleolar, la proteína MYBBP1A, favorece la formación de tetrámeros de p53, que no están sujetos a la inhibición ejercida por Mdm2. Una vez ensamblado el tetrámero de p53, la acetiltransferasa p300 acetila los residuos de lisina del extremo carboxi-terminal, activando la transcripción de genes dependientes de p53 como p21, PUMA o NOXA. (Adaptada de Ono et al. 2014).

Recientemente, se ha sugerido que la oligomerización es suficiente para activar los blancos transcripcionales de p53. Después del daño al DNA, los niveles totales de proteína de p53 incrementan lentamente, debido a que primero ocurre una estabilización de la proteína antes que un incremento de su expresión. La oligomerización de p53 incrementa más rápidamente durante los primeros 90 minutos del daño, seguido por un moderado aumento continuado, sugiriendo que la oligomerización precede a la estabilización (Gaglia et al., 2013). Adicionalmente, se ha observado que la interacción entre ArhGAP11A, una pequeña GTPasa, y el dominio de oligomerización de p53 estabiliza la conformación tetramérica de p53, aumentando la actividad de p53 para unirse al DNA e inducir parada del ciclo celular y apoptosis (Xu et al., 2013).

La oligomerización de p53 también es requerida para la eficiente ubiquitinación mediada por MDM2. Mutantes de p53 con un dominio de tetramerización alterado tienen menor afinidad por

MDM2 y son peores sustratos de ubiquitinación (Maki, 1999). También se ha demostrado que la interacción de p53 con la proteína 14-3-3 σ estabiliza el estado de oligomerización de p53 como tetramero, protegiendo a p53 de la degradación dependiente de MDM2 (Schumacher et al., 2010).

Mutaciones en el dominio de tetramerización de p53 han sido identificadas en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (Davison et al., 1998). El síndrome de Li-Fraumeni es un tipo de desorden que predispone al cáncer y está frecuentemente asociado con mutaciones en la línea germinal del gen *p53* (Malkin, 2011). Los pacientes presentan un temprano desarrollo de múltiples tumores. Los tipos más comunes de tumores son sarcomas de tejidos blandos y osteosarcomas, cáncer de mama, tumores cerebrales, leucemia y carcinoma adrenocortical (McBride et al., 2014). Sin embargo, el fenotipo del síndrome Li-Fraumeni no es únicamente explicado por mutaciones en *p53*, polimorfismos intragénicos, mutaciones o polimorfismos de genes reguladores de la vía de p53, así como variaciones aberrantes en el número de copias o reducción del tamaño de los telómeros, pueden modificar el fenotipo de la enfermedad (Malkin, 2011). Métodos bioquímicos y biofísicos con mutaciones en el dominio de tetramerización de p53 presentes en el síndrome Li-Fraumeni, han mostrado que estos mutantes no pueden unirse al DNA y son inactivos, pero no actúan como un dominante negativo. En algunos casos, el mutante puede oligomerizar pero su actividad transcripcional es demasiado baja (Davison et al., 1998; Itahana et al., 2009).