

Aplicaciones terapéuticas de la ubiquitina

R. Barrio y M. Izquierdo

Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.

Introducción

La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos que se encuentra en todas las células animales, levaduras y plantas. Su secuencia es la más conservada de todas las proteínas conocidas, variando en sólo 3 aminoácidos desde levaduras¹ hasta humanos².

La ubiquitina tiene numerosas y diversas funciones, muchas de ellas poco conocidas. Interviene en la degradación de proteínas de vida media corta^{3,4}, se une a las histonas^{5,6} y a numerosos receptores de membrana^{7,8}, es muy abundante en los componentes neurofibrilares en forma de red de los pacientes con enfermedad de Alzheimer⁹, en los pacientes con enfermedad de Parkinson, en los pacientes con enfermedad de Pick y en otras enfermedades neurodegenerativas¹⁰. La ubiquitina se organiza en el genoma de dos maneras diferentes. Por un lado, aparece como repeticiones múltiples cabeza-cola que codifican para un precursor de poliubiquitina, que a su vez es rápida y eficientemente procesado en unidades de ubiquitina libre. La ubiquitina madura se genera por corte de enlaces peptídicos Gly-Met espaciados cada 76 aminoácidos en el precursor. Otro modo de presentarse es en combinación con otras proteínas diversas. Se forman proteínas híbridas que son posteriormente eficientemente procesadas dando lugar a las dos proteínas libres. Tal es el caso de híbridos ubiquitina-proteínas ribosomales^{11,12} que implican la ubiquitina en la biogénesis del ribosoma.

De todas estas características y propiedades lo que más nos interesa es la capacidad de la ubiquitina para ser procesada por corte enzimático entre su última glicina y el primer aminoácido de la proteína siguiente. Esto nos va a permitir elaborar proteínas quimeras que serán automáticamente procesadas generando proteína y ubiquitina libres. La enzima encargada de este proceso no está totalmente caracterizada, pero es específica para la secuencia gly-

gly-x y relativamente abundante en todas las células eucarióticas^{13,14}.

La idea fundamental del trabajo es aprovecharse de esta propiedad de inducción proteolítica específica de la ubiquitina para la elaboración de proteínas recombinantes por fusión génica entre genes hormonales, por ejemplo, y el de la ubiquitina.

La biotecnología nos permite producir grandes cantidades de casi cualquier proteína y esto, a su vez, nos facilita el estudio de su estructura, de su función o de sus posibilidades para el uso farmacéutico o biomédico. Sin embargo, muchas veces no resulta tan fácil alcanzar estas metas.

Las clonación de genes eucarióticos con interés biomédico y su producción a gran escala en células eucarióticas resulta enormemente costoso y, en muchos casos, no resulta rentable. Si por el contrario, hacemos uso de las grandes ventajas que supone la expresión de estos genes en bacterias, nos encontramos con que el procesamiento de la proteína deseada puede ser diferente al que tendría en un sistema eucariota. Un gen de mamífero, introducido en un huésped heterólogo, se encuentra sujeto a un sistema de síntesis y procesamiento proteico distinto al que tendría en su célula nativa. El nuevo huésped puede utilizar ciertos tripletes con mayor frecuencia que otros, puede no realizar (o hacerlo de modo diferente) determinadas modificaciones postraduccionales y puede incluso alterar el entorno bioquímico de la proteína e impedir su correcto plegamiento y adquisición de estructuras secundarias o terciarias. Todos estos aspectos pueden, en definitiva, alterar la función de la proteína o afectar a otros aspectos más sutiles, pero no de menor importancia, como son su inmunogenicidad o su toxicidad.

La obtención de proteínas recombinantes por fusión génica con el gen de la ubiquitina puede solucionar aquellos casos en los que la proteína deseada presenta algún impedimento es-

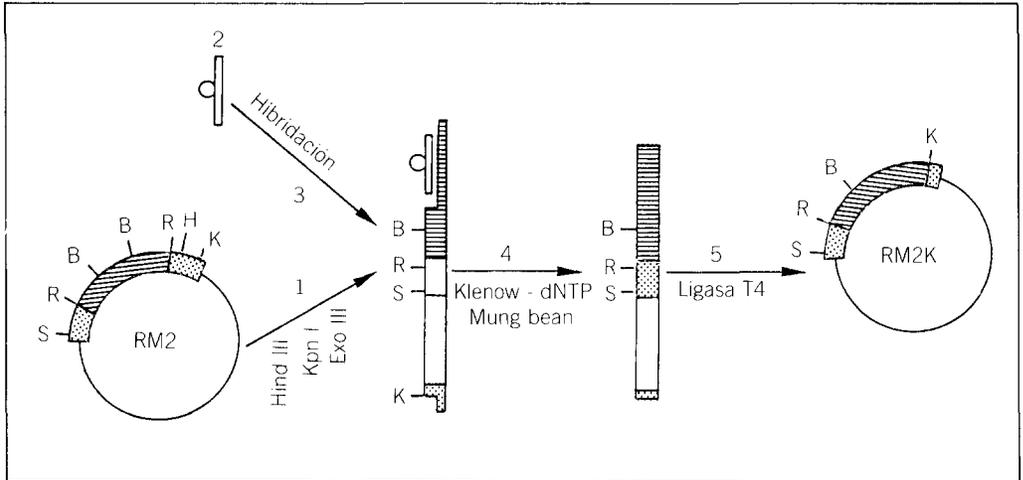


Fig. 2. El plásmido RM9 del cual partimos contiene 9 copias repetidas en tandem del gen de ubiquitina insertas en el sitio EcoRI del plásmido bluescript SK(+/-). Por digestión parcial con la enzima BqIII, obtenemos el plásmido RM2, que contiene una sola copia completa de ubiquitina: 1) digerimos totalmente RM2 con las enzimas HindIII y KpnI, que se encuentran en el poliligando del vector. HindIII produce extremos 3' cohesivos que pueden ser digeridos con ExoIII mientras que KpnI protege el otro extremo del vector de la digestión al generar extremos 3' protuberantes; 2-3) posteriormente hibridamos un oligonucleótido sintético de 30 nucleótidos que incluye el extremo carboxilo-terminal de ubiquitina; 4) rellenamos las zonas digeridas en exceso por ExoIII con la polimerasa de Klenow y una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos. Enlazamos todo con ligasa de T4 y los fragmentos monocatenarios resultantes se eliminan por digestión con Mung Bean; 5) enlazamos por los extremos romos con la enzima ligasa de T4. ZZZZ gen de la ubiquitina □□□□ poliligando del vector. Enzimas empleadas: BqIII (B), EcoRI (R), HindIII (H), KpnI (K), SacI (S).

Materiales y métodos

En cuanto a los plásmidos se partió del plásmido RM9. Este es un plásmido bluescript KS (+/-) que lleva inserto en su poliligando vía EcoRI el gen de poliubiquitina de *Drosophila melanogaster*. El fragmento posee 9 unidades codificantes para ubiquitina. El plásmido pG23 es un plásmido de 5,2 kb (1 kilobase = 1.000 pares de bases) que contiene la casi totalidad del ADNc correspondiente al gen de la hormona del crecimiento bovina. El inserto es el 0,8 kb y está clonado en la diana PstI de pBR322¹⁶. Se ha empleado también un oligonucleótido sintético, de 30 bases, que ha sido sintetizado en el centro de biología molecular. Los métodos empleados son estándar de ingeniería genética y se pueden encontrar en la referencia¹⁷.

Resultados

El primer objetivo del trabajo fue la fusión de la última glicina de ubiquitina con la primera alanina de la hormona de crecimiento bovina.

Se partió de RM9. Este es un plásmido bluescript KS (+/-) que lleva inserto en su poliligando

do vía EcoRI el gen de poliubiquitina de *Drosophila melanogaster* (fig. 1). El fragmento posee 9 unidades codificantes para ubiquitina. En primer lugar, dado que basta con una sola copia de ubiquitina para el funcionamiento del sistema, se dirigió el inserto parcialmente con BqIII. Al volver a religar y transformar elegimos un clon que poseía sólo una copia completa de ubiquitina en su interior. La denominamos RM2; De esta manera, conseguimos que la carga genética de la bacteria en el clonaje sea menor y, por tanto, el crecimiento bacteriano sea mayor.

A partir de RM2, hicimos coincidir la última glicina de la proteína con una diana de restricción. Para ello, realizamos una serie de cortes enzimáticos (fig. 2) e hibridamos con un oligonucleótido sintético de 30 nucleótidos, que es igual a la región 3' terminal del gen de ubiquitina. Tras la hibridación digerimos las zonas de banda simple que se han generado y recircularizamos el plásmido. Con todo ello generamos una nueva diana KpnI que incluye el codón de la glicina 76 de ubiquitina. El plásmido resultante es liberable en glicina por corte enzimático

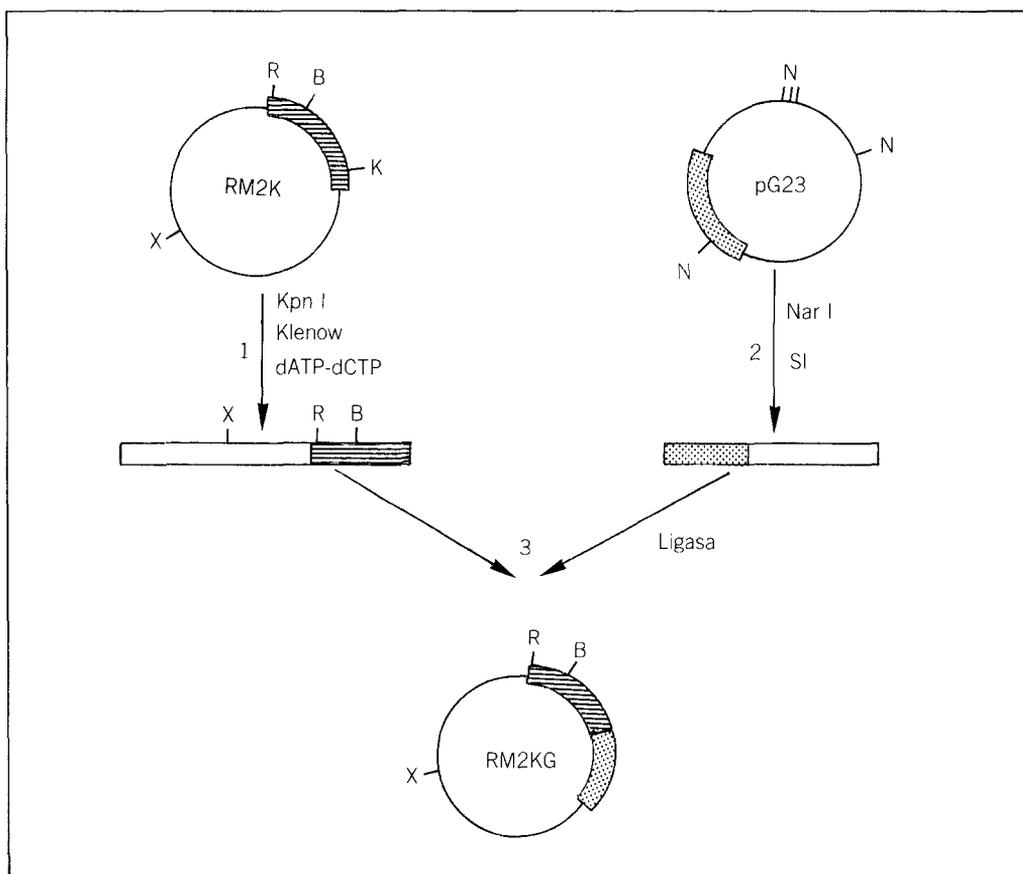


Fig. 3. Fusión del gen de ubiquitina con el de la hormona de crecimiento. Se partió del plásmido obtenido en el paso anterior, al que hemos llamado RM2K: 1) digerimos esta molécula con la enzima KpnI. Se rellena después con Klenow, añadiendo solamente dATP y dCTP. Se trataron los restos de cadena monocatenaria con endonucleasa S1; 2) por su parte el plásmido pG23 (derivado de PBR322 por clonaje en el sitio PstI del gen completo de la hormona de crecimiento bovina), se digirió con NarI y posteriormente con S1, originándose extremos romos; 3) por último se enlazaron los dos fragmentos obtenidos con ligasa de T4. : gen de la ubiquitina. : gen de la hormona de crecimiento. Enzimas empleadas: BglII (B), KpnI (K), NarI (N) Y EcoRI (R).

co y es el que utilizamos para fusiones posteriores. La secuencia obtenida fue verificada por secuenciación.

Como puede observarse en la figura 3, paso 1, tras dos reacciones enzimáticas nuestro plásmido nos proporciona la Gly⁷⁶ lista para unirse a otras secuencias. El plásmido que contiene el gen de la hormona pG23, (derivado de PBR322 por inserción en el sitio PstI de su secuencia total) hubo de ser sometido a dos reacciones enzimáticas y se hibridó con la construcción que contenía la ubiquitina.

De esta manera la fusión se obtiene en el punto deseado y al expresarse el conjugado se li-

berará la hormona de crecimiento con su extremo aminoterminal igual al natural, potenciándose a la vez su expresión (fig. 4).

El plásmido obtenido en la figura 2 no sólo es válido para esta fusión sino que, por la estrategia de clonaje seguida, es posible fusionarlo a cualquier proteína que deseemos.

Discusión

La producción a gran escala de productos con interés farmacéutico y biomédico aparece como una de las grandes posibilidades de la biotecnología actual.

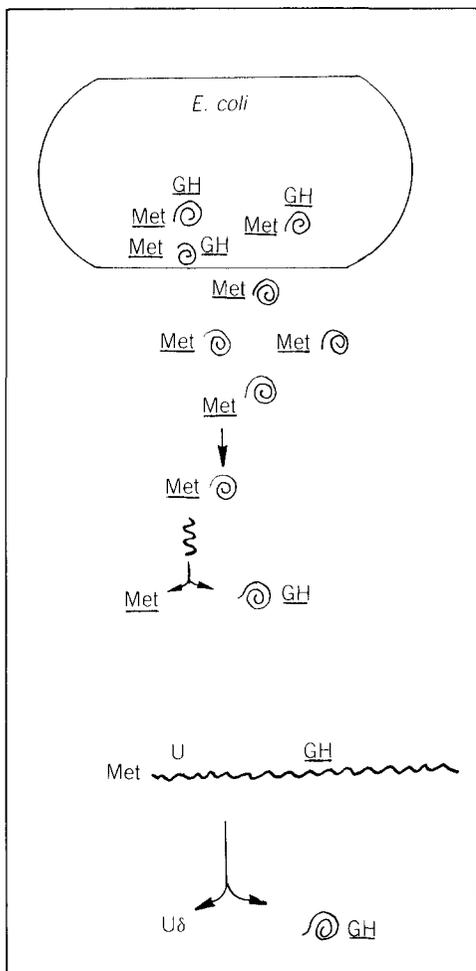


Fig. 4. Esquema sumario de la producción de la hormona del crecimiento (GH) en *E. coli* con la metionina (Met) no procesada en su extremo amino. La inserción del gen de la ubiquitina a la cabeza de la hormona del crecimiento nos producirá automáticamente la hormona sin metionina inicial.

Las bacterias, en especial *E. coli*, siguen siendo el organismo predilecto para la expresión y superproducción de proteínas clonadas. Las bacterias, efectivamente, son sencillas, baratas y fácilmente manipulables; sin embargo, *E. coli* no realiza glicosilaciones, fosforilaciones o acetilaciones de manera similar a los eucariotas, ni elimina completamente las metioninas iniciales.

La hormona del crecimiento no es el único caso en el que al producto final, producido en

bacterias, le sobra la metionina inicial. La enzima manganeso-superóxido-dismutasa (MnSODs) humana también se produce con una gran eficiencia en *E. coli* y así mismo posee una metionina adicional en su *terminal-NH₂*. Esta enzima es esencial en nuestro hígado para eliminar superóxidos, transformándolos en oxígeno molecular y, por lo tanto, eliminando ciertos compuestos tóxicos producidos en el metabolismo oxidativo de numerosas moléculas. Niveles altos de esta enzima podrían prevenir la formación de tumores, los efectos secundarios en la ingestión elevada de medicamentos, el envejecimiento y las inflamaciones¹⁸.

En el sistema que nosotros estamos poniendo a punto con la hormona del crecimiento tienen cabida todas aquellas proteínas que precisen de cortes proteolíticos específicos en su maduración.

Si la expresión de la proteína quimera se realiza en *E. coli*, el procesamiento no es totalmente eficiente, aunque se ha comprobado, que tanto transcripción como traducción aumentan considerablemente¹⁴. La fusión de genes a ubiquitina potencia de manera patente la producción de los genes clonados.

Si se desea obtener un procesamiento más eficaz, se puede realizar el clonaje y la expresión en levaduras. Recientemente¹³ se ha realizado la fusión de ubiquitina con diversas proteínas, las cuales han visto incrementada su expresión en levaduras, a la vez que han realizado su correcto plegamiento. El mecanismo que confiere este aumento en la producción de genes ligados a la ubiquitina no es conocido en la actualidad, pero los incrementos pueden ser tan espectaculares como, de pasar de ser prácticamente indetectable, a representar el 20 % de la proteína celular total¹⁴.

Todos estos resultados parecen indicar que las fusiones entre la ubiquitina y proteínas con problemas en su maduración pueden representar la solución a la producción en gran escala de hormonas y enzimas de interés farmacológico, tanto en eucariotas como en procariotas.

Resumen

Uno de los problemas en la producción a gran escala de proteínas de interés biomédico obtenidas por ingeniería genética es la incapacidad de los sistemas bacterianos de realizar determinadas modificaciones en las proteínas sintetizadas. Una de estas limitaciones es la eliminación de la metionina inicial de numerosas hormonas y enzimas. Presentamos un sistema

que puede eliminar este problema. La fusión génica entre la ubiquitina y la proteína de interés originará una proteína quimera que será procesada liberando la proteína en su forma «natural» carente de metionina inicial. Hemos puesto a punto el sistema con la creación de quimeras ubiquitina-hormona del crecimiento bovina, pero puede ser aplicado a otros casos con necesidades semejantes.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT). Proyecto n.º PB87-0120. El plásmido pG23 ha sido cedido amablemente por el Dr. F.H. Rottman.

BIBLIOGRAFÍA

- Özkaynak, E, Finley D, Varshavsky A. The yeast ubiquitin genes: Head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* (1984); 312: 663-666.
- Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA, Vuust J. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J* 1985; 4: 755-759.
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 1984; 37: 57-66.
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* 1984; 24: 27-53.
- Anderson MW, Ballal NR, Golknopf IL, Busch H. Protein A24 Lyase activity in nucleoli of thioacetamide treated rat liver releases histone 2A and ubiquitin from conjugated protein A24. *Biochemistry* 1981; 20: 1.100-1.104.
- Mueller RD, Yasuda H, Hatch CL, Bonner WM, Bradbury EM. Identification of ubiquitinated histones 2A and 2B in *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem* 1985; 260: 5.147-5.153.
- Siegleman M, Bond MW, Gallatin WM et al. Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science* 1986; 231: 823-829.
- Yarden T, Escobedo JA, Kuang WJ et al. Structure of the receptor for platelet derived growth factor helps to define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 1986; 323: 226-232.
- Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 1987; 235: 1.641-1.644.
- Gallo JM, Anderton B. Ubiquitous variations in nerves. *Nature* 1989; 237: 687-688.
- Redman K, Rechsteiner M. Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 1989; 338: 438-440.
- Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 1989; 338: 394-400.
- Ecker DJ, Stadel JM, Butt TR, et al. Increasing gene expression in yeast by fusion to ubiquitin. *Biol Chem* 1989; 264: 7.715-7.719.
- Butt TR, Jonnalagadda S, Monia BP et al. Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2.540-2.544.
- Chan V, Tobias JW, Bachmair A et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; 243: 1.576-1.583.
- Wyochik RP, Camper SA, Lyons RH, Horowitz S, Goodwin EC, Rottman FM. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7.197-7.210.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Beck Y, Bartfeld D, Yavin Z, Levanon A, Gorecki M, Hartman J. Efficient production of active human manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1988; 6: 930-934.

DISCUSIÓN

- F. MURILLO: ¿Es necesario colocar toda la proteína, toda la ubiquitina, para el procesamiento?
- M. IZQUIERDO: No, pueden eliminarse partes de la molécula y el proceso todavía funciona. Ahora bien, debe conservarse una parte substancial. Es difícil concretar, pero podría decirse

que cuando se quita más del 50 % ya no funciona.

- A. BORONAT: Ha comentado que la ubiquitina se une a proteínas que tienen una vida media corta, probablemente promoviendo su degradación. Mi pregunta se refiere a si el lugar de unión de la ubiquitina tiene algo que ver con

un tipo de secuencias, las secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina) precisamente identificadas en proteínas con una tasa elevada de recambio. ¿Hay alguna relación entre estos tipos de secuencias, los puntos de unión de ubiquitina y las secuencias PEST?

M. IZQUIERDO: La ubiquitina se une al grupo amino de determinadas lisinas y parece que el lugar de reconocimiento es bastante extenso, no habiendo una correlación directa entre las secuencias PEST y la unión de la ubiquitina. Además, la ubiquitina tiene funciones muy variadas. Por ejemplo, se une también a las histonas, pero no produce degradación de las mismas, con lo cual su función a este nivel no está clara. Al principio se pensaba que sólo se unía a regiones que luego se iban a expresar, pero esto tampoco está claro y según nuestra experiencia, yo diría que esto no es así. Es decir, la ubiquitina se une a numerosas proteínas con funciones muy distintas.

V. RUBIO: ¿Está presente en plantas o en eucariotas inferiores?

M. IZQUIERDO: La ubiquitina está presente en plantas, en todos los eucariotas.

E. MENDEZ: Me gustaría saber si esta enzima que usted ha mencionado, la carboxilasa, se encuentra disponible en el mercado.

M. IZQUIERDO: No, no está comercializada ya que la primera comunicación sobre el clonaje del gen se ha publicado hace muy pocos días en la revista SCIENCE. Por lo visto, el proceso de aislamiento es muy sencillo y nosotros vamos a tratar de aislarla en grandes cantidades. Puedo comentarle que por cada kilogramo de cerebro de buey se obtienen 18 mg de esta enzima pura con una actividad específica bastante buena. Así mismo, los mismos autores han descrito el clonaje del gen que sintetiza esta enzima, utilizando como huésped células B.

A. JUÁREZ: Ha mencionado la posibilidad de expresar estas proteínas quiméricas en grandes cantidades en *E. coli*. Especialmente para pro-

teínas expresadas en *E. coli* que no son excretadas al medio, uno de los problemas más importantes relacionados con la expresión génica es el efecto de las proteasas tanto citoplasmáticas como periplasmáticas sobre este tipo de moléculas. Puesto que me imagino que estas estructuras en las que interviene la ubiquitina las recuperan del citoplasma de *E. coli* me pregunto si no son destruidas en parte por las proteínas citoplasmáticas.

M. IZQUIERDO: Al contrario, son enormemente estables. A título de ejemplo me gustaría comentar que cuando se une la ubiquitina con la betagalactosidasa en levaduras, no sólo muestra una gran estabilidad, sino que además pasa de ser una proteína que no se expresaba en absoluto a representar el 20 % de la proteína total. No se sabe por qué, pero cuando la ubiquitina se une a cualquier otra estructura aumenta drásticamente la producción. Esto no solamente se ha comprobado con betagalactosidasa, sino también con uroquinasa humana y se ha observado una gran expresión en levaduras.

R. GONZALEZ: ¿Hay alguna hipótesis sobre cuál sería la función de la ubiquitina en las enfermedades neurodegenerativas?

M. IZQUIERDO: Se desconoce la función de la ubiquitina en estas enfermedades pero mi opinión personal es que actúa como un marcador de proteínas anormales ya que en este tipo de estados patológicos las concentraciones cerebrales de ubiquitina aumentan enormemente.

L. ENJUANES: Me gustaría preguntarle si han ideado alguna estrategia estructural para hacer que quede más expuesta la zona de corte, lo cual sería altamente conveniente.

M. IZQUIERDO: Pues no ha sido necesario ya que la estrategia que utilizamos no nos ha fallado en ningún caso en levaduras. Cuando decía que «no ha cortado muy bien» me refería a *E. coli*, ya que estamos intentando también utilizar *E. coli* para aprovechar todas sus ventajas.