

L a localización celular de la proteína ARD1/TRIM23 depende de su actividad de E3 ubiquitina ligasa¹

G. Pacheco-Rodríguez¹, C. Díaz-Pérez², J. Campos-García³, S. El-Chemaly⁴, J. Moss¹, M. Vaughan¹ y V. Meza-Carmen³

¹Cardiovascular and Pulmonary Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA.; ²Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zac.; ³Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH; ⁴Division of Pulmonary and Critical Care Medicine Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, EUA.

Resumen

ARD1/TRIM23 es una proteína multidominio, con un dominio "RING finger" con actividad de E3 ubiquitina ligasa en su extremo amino terminal y un dominio "ARF" en su extremo carboxilo terminal. La proteína ARD1 se ha encontrado en el aparato de Golgi y en los lisosomas, ambos organelos implicados en el tráfico vesicular en células de mamífero. Las proteínas ARF están implicadas en la formación de vesículas y el destino de estas estructuras hacia diferentes lugares dentro de la célula, como la membrana plasmática, organelos o incluso la secreción del contenido vesicular hacia el espacio extracelular. Por otra parte, las E3 ubiquitina ligasas catalizan el último paso de la ubiquitinación. Dicha modificación postraducciona está implicada en la degradación de proteínas y en dirigir a ciertas proteínas hacia compartimentos intracelulares, como los lisosomas. Los resultados de este trabajo demostraron la participación del dominio E3 ubiquitina ligasa de ARD1/TRIM23 en la localización intracelular, y no el dominio ARF. Además, la mutación en el dominio E3 ubiquitina ligasa resultó en una

¹ Parte de los resultados contenidos en este trabajo han sido publicados previamente en: Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108:10454-10459.

acumulación de la proteína ARD1/TRIM23 en el interior celular. Esto sugiere que la posible autoubiquitinación de esta proteína es necesaria tanto para su localización intracelular como en la regulación de su función celular.

Palabras clave: ARD1/TRIM23, proteínas ARF, ubiquitinación, lisosomas.

Abstract

Cellular localization of ARD1/TRIM23 protein depends on its E3 ubiquitin ligase activity

ARD1/TRIM23 is a multidomain protein, with a RING finger domain with an E3 ligase activity on its N-terminus and an ARF domain on its C-terminus. ARD1/TRIM23 has been found in Golgi apparatus and lysosomes, both organelles implied in vesicle trafficking in mammalian cells. ARF proteins are involved in vesicle formation and targeting of these structures to different cell fates like plasma membrane, organelles or secretion of their content to extracellular space. On the other hand, E3 ubiquitin ligases are involved in the last step of ubiquitination process, a posttranslational modification that has been implied in protein degradation and targeting of certain proteins to intracellular compartments like lysosomes. This work showed the implication of a non-functional E3 ligase domain of ARD1/TRIM23 protein on mistargetting to lysosomes, with no relevance of ARF domain on this process. Moreover, non functional E3 ligase of ARD1/TRIM23 resulted in its over-accumulation in the cell. These results suggest a possible autoubiquitination of this protein, which is needed to target ARD1/TRIM23 to the right intracellular localization, and regulation of its biological role in the cells.

Keywords: ARD1/TRIM23, ARF proteins, ubiquitination, lysosomes.

Introducción

Un factor indispensable en la función de una proteína es su localización celular. La deslocalización de las proteínas conduce a procesos fisiopatológicos. Un ejemplo lo representan las enzimas hidrolíticas que son destinadas hacia los lisosomas; una entrega incorrecta o ausencia de estas enzimas en los lisosomas se ha asociado con enfermedades. En la enfermedad de Pompe (también llamada glucogenosis tipo II), en la cual se presenta una deficiencia hereditaria de la alfa glucosidasa ácida (GAA, por sus siglas en inglés), la enzima lisosomal responsable de la degradación del glucógeno a glucosa (Hirschhorn y Reuser, 2001).

Las proteínas son dirigidas a sus organelos blanco en la célula o incluso fuera de la misma a través de diversos mecanismos. Los mecanismos más conocidos involucran la presencia de secuencias señal ubicadas en la estructura primaria de la proteína (Ben-Mena-chem et al., 2011), modificaciones postraduccionales (Gharakhanian et al., 2011) y/o mediante transporte vesicular (Giordano et al., 2011). El tráfico vesicular es uno de los procesos

más importantes que controlan el destino de las proteínas dentro de una célula eucariótica (Rothman y Wieland, 1996; Orlando y Guo, 2009).

Las proteínas ARF tienen una función crucial en el metabolismo de las vesículas, incluyendo el reclutamiento de las proteínas que constituyen la cubierta de las vesículas para iniciar la formación y gemación de las mismas (Popoff et al., 2011). Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas G monoméricas, las cuales tienen un peso molecular de alrededor de 20 kDa (Moss y Vaughan, 1995). Las proteínas ARF participan en el tráfico vesicular entre diversos compartimentos celulares, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los endosomas, la envoltura nuclear, etc. (Moss y Vaughan, 1995). Las proteínas ARF de origen humano se agrupan en tres diferentes clases: clase I (ARF1, ARF2 y ARF3), clase II (ARF4 y ARF5) y clase III (ARF6) (Donaldson y Jackson, 2011).

Por otra parte, se han descrito dominios ARF que son parte de otras proteínas de mayor tamaño respecto a las proteínas ARF típicas, como es el caso de la proteína ARD1 (por sus siglas del Inglés, **ADP-Ribosylation factor Domain protein 1**) (Mishima et al., 1993). ARD1 es un miembro atípico de la familia ARF asociada a lisosomas y al aparato de Golgi, organelos que forman parte del sistema endomembranoso involucrados en la recepción y generación de vesículas, respectivamente (Mishima et al., 1993; Vitale et al., 1998). ARD1 es una proteína de 64 kDa (574 residuos aminoácidos), con múltiples dominios (Meza-Carmen et al., 2011). Esta proteína contiene un dominio ARF en su extremo carboxilo terminal (residuos 402-574), de peso molecular similar a otras proteínas ARF, el cual es alrededor de 18 kDa (Vitale et al., 1996).

Las proteínas ARF ciclan entre un estado activado (uniendo GTP) y uno inactivado (uniendo GDP). Existen proteínas accesorias que en condiciones fisiológicas permiten los estados de activación e inactivación, como son las proteínas GAP (por sus siglas del Inglés, GTPase Activating Protein) y las proteínas GEF (por sus siglas del inglés Guanine Exchange Factor). Las proteínas GAP y GEF están involucradas en aumentar la actividad de GTPasa y promover el intercambio de GDP por GTP, respectivamente. Además se ha asociado a las proteínas ARF con la proteína GDI (por sus siglas del Inglés, Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor), involucrada en evitar la disociación del GDP de las GTPasas monoméricas. Se ha demostrado la presencia y funcionalidad de un dominio GAP (Vitale et al., 1998a) y un dominio GDI en ARD1 (Vitale et al., 1997). Los dominios GAP y GDI de ARD1 son similares funcionalmente a otras proteínas GAP y GDI de proteínas ARF típicas, pero diferentes debido a la asociación covalente con el dominio ARF en ARD1, sugiriendo una posible autorregulación en el ciclo de activación/inactivación del dominio ARF de ARD1.

Además de tener un dominio ARF, ARD1 contiene otros tres dominios estructurales, los cuales no se encuentran en las demás proteínas ARF típicas; estos son: dominio **RING** finger, dos dominios **B-BOX** y un dominio **Coiled-Coil** (Figura 1), ubicando a ARD1 en la familia de proteínas TRIM (del Inglés, Tripartite Motif), recibiendo el nombre de TRIM23 (Ozato et al., 2008). El dominio **RING** (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene, por sus siglas en Inglés) finger posee actividad de E3 ubiquitina ligasa, involucrada en el proceso de ubiquitinación (Reymond et al., 2001). La ubiquitinación es una modificación postraduccional que involucra

la transferencia de una o varias moléculas de ubiquitina a una proteína blanco. La ubiquitinación es un proceso jerárquico que involucra la participación las enzimas: E1, E2 y E3. Se ha identificado en el genoma humano una única enzima E1, docenas de E2 y cientos de E3 ubiquitina ligasas (Deshaies y Joazeiro, 2009; Kravtsova-Ivantsiv y Ciechanover, 2011). La desregulación en la ubiquitinación está relacionada con algunas enfermedades, como cáncer, desórdenes neurológicos (Parkinson, Alzheimer), infecciones y problemas inmunológicos, entre otras (Reymond et al., 2001; Ardley, 2009). Además de participar en la degradación de proteínas a través del proteosoma, también se le ha atribuido a la ubiquitinación un papel en la transducción de señales (Chen 2005).

Recientemente se demostró la función de la proteína ARD1/TRIM23 en la degradación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual es un regulador clave del crecimiento y la diferenciación celular. El estado de activación del dominio ARF de ARD1/TRIM23 conduce a un cambio en los niveles proteicos del EGFR (Meza-Carmen et al., 2011). Por lo tanto, es necesario comprender el mecanismo molecular mediante el cual ARD1/TRIM23 participa en regular las concentraciones del EGFR; una posibilidad es la participación de ARD1/TRIM23 en regular el tráfico vesicular del EGFR.

En este trabajo se demostró que la localización intracelular de ARD1/TRIM23 depende de su actividad de E3 ubiquitina ligasa, mientras que el dominio ARF de ARD1/TRIM23 no tiene influencia sobre su localización. Además, la pérdida de la función de la actividad de E3 ubiquitinina ligasa generó un aumento intracelular significativo de la proteína ARD1/TRIM23, indicando una posible autoubiquitinación, o ubiquitinación por alguna otra E3 ubiquitina ligasa de ARD1/TRIM23. Esto sugiere un mecanismo diferente de regulación de sus niveles proteicos a nivel intracelular.

Materiales y Métodos

Obtención de las secuencias

Se utilizó una metodología similar a la reportada por Díaz-Pérez et al. (2007). Se hizo una búsqueda de proteínas homólogas a la proteína ARD1/TRIM23 de humano (no. de acceso: NP_001647), mediante los programas Blastp y Psi-Blast (Altschul 1997). Se utilizó la base de datos nr (proteínas no redundantes del GeneBank), no se usó filtro de baja complejidad, y se eliminaron las secuencias con un número E menor a 1×10^{-5} ; los parámetros de penalización de huecos (gaps) y la matriz usada fueron los de uso por omisión. Se seleccionaron únicamente las proteínas que tuvieran un porcentaje de cobertura arriba del 80%. Se eliminaron las proteínas redundantes y los fragmentos proteicos, obteniéndose un grupo de trabajo de 40 secuencias de proteínas homólogas a ARD1/TRIM23. Para realizar el alineamiento del grupo final se utilizó el programa T-Coffee (Notredame et al., 2000), con los parámetros por omisión. El alineamiento obtenido se editó manualmente, usando como editor de secuencias el programa BioEdit (Hall 1999). Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011). Se siguieron cuatro algoritmos distintos:

de los métodos basados en matriz de peso (MMP) se usaron Vecino más cercano (NJ; Neighbor-Joining) y Mínima Evolución (ME); y de los métodos basados en características (MBC) se usó Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV). En la construcción de los árboles, se utilizó la eliminación pareada, y como modelos evolutivos, WAG para el método de MV y la matriz JTT para los métodos de NJ y ME. La prueba estadística aplicada fue un análisis de Bootstrap de 1000 repeticiones para cada árbol.

TABLA 1 Oligonucleótidos usados en este trabajo	
OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5' A 3')
F-RT	ATGGCTGCCCTCGCTGTAAACAAGC
R-RT	GAATTCGCCCTTCGCCGCAGCAACATCCAACACTC
GFP-F-I	AATTCGCCCTTAGCTTCCAGGGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
GFP-R-I	GTTTACAGCGAGGGCAGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
F-(C34A)	CTGGAGTGTGGGGTTGCTGAAGATGTCTTCTC
R-(C34A)	GAGAAGACATCTTCAGCAACCCACACTCCAG
F-(H53A)	CTCCTCCTCTGTGGCGCCACAGTCTGTCATGAC
R-(H53A)	GTCATGACAGACTGTGGCGCCACAGAGGAGGAG
F-(T418N)	GATGGTGTGGAAAAAATACCATTTTGTTC AAG
R-(T418N)	CTTGAACAAAATGGTATTTTTTCCAGCACCATC
F-(K458I)	GGGATGTGGGTGGAATCCACAAATTAAGACCATTGTGG
R-(K458I)	CCACAATGGTCTTAATTTGTGGATTCCACCCACATCCC

Clonación y mutagénesis del gen *ARD1/TRIM23*

El cDNA de *ARD1/TRIM23* fue amplificado en su totalidad mediante RT-PCR con el uso de los oligonucleótidos F-RT y R-RT (Tabla 1). Se usó como templado el RNA total aislado de hígado de ratón macho (cepa C57 black 6) de tres meses de edad. Posteriormente, el extremo 5' del cDNA de *ARD1/TRIM23* fue fusionado mediante PCR al gen que codifica la proteína verde fluorescente, usando los iniciadores GFP-F-I y GFP-R-I (Tabla 1). Dicho producto de PCR (*GFP-ARD1/TRIM23*) fue clonado en el vector pGene/His-V5 (Invitrogen), el cual permite la fusión traduccional en el extremo 3' del gen de interés a las etiquetas que codifican seis residuos de histidinas y para el epítipo V5 (15 aminoácidos, GKIPNPLLGLDST, proveniente del paramixovirus del virus de simio 5), el cual fue usado para detectar la presencia de la proteína recombinante mediante Western blot. Una vez obtenida la fusión traduccional *GFP-ARD1-V5* en el vector pGene/His-V5, se realizaron dos

mutaciones puntuales (C34A y H53A) en el dominio de E3 ubiquitina ligasa del gen *ARD1/TRIM23* con las dos parejas de oligonucleótidos: F-(C34A); R-(C34A) y F-(H53A); R-(H53A), respectivamente (Tabla 1). Se realizaron dos mutaciones de forma independiente en el dominio ARF del gen *ARD1/TRIM23*: (T418N y K458I), generando el dominio ARF-constitutivamente inactivado y activado, respectivamente. Dichas mutaciones fueron generadas mediante el uso de los oligonucleótidos F-(T418N)/R-(T418N) y F-(K458I)/R-(K458I), respectivamente (Tabla 1). Todas las construcciones fueron verificadas mediante la secuenciación del DNA, empleando un secuenciador automático ABI PRIMS 377 DNA sequencer (Perkin Elmer).

Sistema de expresión inducible del producto de los genes *ARD1/TRIM23* silvestre y mutantes

Se utilizó el sistema GENESWITCH SYTEM (Invitrogen) para llevar a cabo la expresión de las proteínas de interés. Este sistema consta de dos vectores; el primer vector pSwitch produce la proteína reguladora recombinante GAL4/p65, la cual se expresa en presencia de la hormona mifepristona. La selección del vector pSwitch se realizó en presencia de higromicina en el medio de cultivo. El segundo vector de expresión, pGene/His-V5, el cual expresa el gen de interés, está bajo el control de la proteína recombinante GAL4/p65. La selección del vector pGene/His-V se realizó con la adición de Zeocina al medio de cultivo. Células de *E. coli* DH5 α fueron usadas para la subclonación y propagación de DNA plasmídico.

Cultivos y transfecciones celulares

Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) se obtuvieron a partir de la piel de embriones de ratón de 12.5 días de gestación, los cuales son homocigotos mutantes en el gen de *ARD1* (KO). Las células MEF se crecieron en medio DMEM alta glucosa (4.5 g/L D-glucosa, Invitrogen), con 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomina, y 10% de suplemento de crecimiento mesenquimal (MCGS, Lonza). Las células se mantuvieron en cámaras de incubación a 37°C, con un flujo constante de CO₂ al 5% y una humedad relativa del 95%, hasta que alcanzaron un 90% de confluencia. Las células se transfectaron, de manera estable, con los plásmidos de interés mediante lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La selección de la línea MEF transfectada con el plásmido pSwitch se realizó mediante la adición de higromicina (0.2 mg/mL) al medio de cultivo. Posteriormente las líneas MEF transfectadas con el plásmido pSwitch se transfectaron nuevamente de manera independiente con cada uno de los plásmidos recombinantes que expresaban las proteínas de interés de ARD1/TRIM23; la selección se llevó a cabo mediante su capacidad de crecimiento en zeocina (0.8 mg/mL). Se generaron las líneas MEF transfectadas de manera estable con la versión silvestre del gen *ARD1/TRIM23* (KO-WT) y la versión mutante en la E3 ubiquitina ligasa (KO E3; C34A y H53A); así como también las versiones mutantes en el dominio ARF constitutivamente activado (KO-GTP; K458I) e inactiva-

do (KO-GDP; T418N) del gen *ARD1/TRIM23*. Dichas líneas MEF se denominaron: KO-WT; mutantes KO-E3, KO-GTP y KO-GDP. Además se obtuvo una línea MEF transfectada con el vector vacío, el cual expresa solamente el gen que codifica la proteína GFP (del Inglés, Green Fluorescent Protein), fusionado al epítipo-V5.

Análisis de expresión de transcrito y de proteína de ARD1/TRIM23

Se aislaron 5 µg de RNA total a partir de las distintas líneas MEFs usando RNeasy isolation Kit (Qiagen); la transcripción reversa se realizó usando el Kit Transcription III superscript (Qiagen). Se utilizaron sondas de hidrólisis tipo TaqMan (Applied Biosystem) para la cuantificación del transcrito de los genes *ARD1/TRIM23* y α -tubulina de origen murino. Los datos de expresión fueron analizados usando el programa Sequence Detector Version 1.6.3. En estos experimentos se utilizó la expresión del transcrito de α -tubulina como control de normalización. Para evaluar las diferencias de expresión de transcrito entre las líneas MEF, los CT (del Inglés Cycle Threshold, ciclos de amplificación en donde se registra la fluorescencia de la sonda a evaluar) de *ARD1/TRIM23* obtenidos a partir de cada una de las líneas MEF se expresaron con respecto al CT del transcrito de α -tubulina de la misma muestra. Los datos de cada línea MEF transfectada fueron ponderados respecto a la línea MEF control KO-WT.

Para la determinación de los niveles de las proteína silvestre y mutantes de ARD1/TRIM23, se prepararon homogenados celulares de las distintas líneas MEF transfectadas, mediante lisis celular en amortiguador de Tris 50 mM, pH 7.5, Tween 20 al 0.1%, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las proteínas del homogenado celular (60 µg) se separaron mediante electroforesis en geles de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del 4–20% y fueron posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron en amortiguador de Tris conteniendo 5% de leche descremada (BioRad) y 0.1% de Tween 20 por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-V5 (Invitrogen) o anti-GAPDH (usado para detectar GAPDH, utilizada como control de carga en los experimentos de inmunodetección), ambos a una dilución 1:2000. El anticuerpo secundario anti-ratón (Promega) se usó a una dilución 1:5000. La detección de la proteína se llevó a cabo mediante el uso del Kit de detección de sustratos quimioluminiscentes West Pico (PIERCE). Las imágenes fueron capturadas y cuantificadas con el fotodocumentador ImageGauge 4.0 (Fujifilm).

Distribución intracelular de ARD1/TRIM23

Las líneas MEF transfectadas KO-WT y mutantes en KO-E3, KO-GTP y KO-GDP se incubaron en cámaras de crecimiento de cuatro pocillos Lab-Tek II (3.5×10^4 células/pocillo), en 0.5 ml de medio de cultivo, permitiendo que se fijaran al fondo del pocillo tras 15 horas de incubación. Posteriormente fueron inducidas por 18 horas con 10 mM de mifepristona. Después de lavar con CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM en PBS, las células se fijaron (20 min) con para-

formaldehído al 4% (Electronic Microscopy, Inc.). Las células se lavaron nuevamente con PBS, se cubrieron con Vectashield (Vector Laboratories) conteniendo DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol), para la visualización del núcleo, y finalmente la laminilla se selló con un cubreobjetos. Para visualizar los lisosomas, las células se incubaron con 50 nM del fluoróforo LysoTracker durante 15 min a 37°C. Las imágenes se obtuvieron mediante el uso de un microscopio confocal de barrido láser modelo Zeiss LSM 510.

Resultados y Discusión

Se ha demostrado la funcionalidad *in vitro* únicamente de los dominios RING finger, ARF, GAP y GDI presentes en la proteína ARD1/TRIM23, mediante ensayos de autoubiquitinación de ARD1/TRIM23, así como su capacidad de unión e hidrólisis del GTP, lo que sugiere su participación en procesos de tráfico vesicular y ubiquitinación, respectivamente (Figura 1) (Vitale et al., 1998b; Vichi et al., 2005); sin embargo, no se conoce la función biológica del producto del gen *ARD1/TRIM23*.

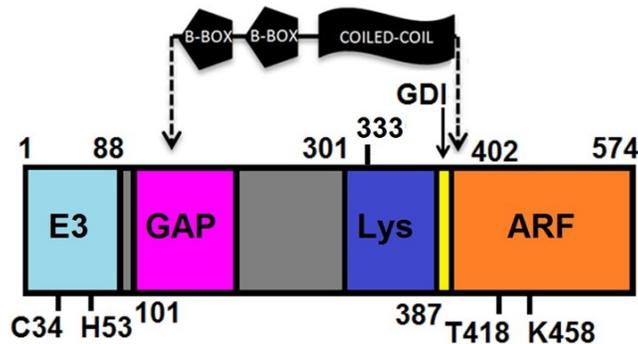


Figura 1. Dominios funcionales de ARD1/TRIM23. La proteína ARD1/TRIM23 tiene 574 residuos aminoacídicos. El dominio “RING finger” con actividad de E3 ubiquitina ligasa (residuos 31-75; E3), los residuos C34 y H53 son esenciales para esta actividad. Dominio GAP, proteína activadora de GTPasa (residuos 101-333). Los residuos 301-402 (región “Lys”) actúan como secuencia señal de direccionalidad hacia lisosomas. La región 387-402 actúa como un inhibidor de la disociación de GDP (GDI). El dominio ARF, factor de ADP ribosilación (residuos 402-574). En la región ARF las mutaciones T418N y K458I anulan la unión de GTP (dominio ARF constitutivamente inactivo) y actividad de GTPasa (dominio ARF constitutivamente activo), respectivamente. En la región 122-400 se localizan los dominios “B-Box” y “coiled coil” (Modificado de Meza-Carmen y col, 2011).

En este trabajo se llevó a cabo la reconstrucción de la filogenia, para entender la evolución de la subfamilia TRIM23. Esta subfamilia está constituida por 40 miembros, los cuales se encuentran distribuidos en tres grupos denominados I, II y III (Figura 2). Las proteínas de esta subfamilia sólo se presentan en el reino *Metazoa*. Sin embargo, durante la búsqueda de proteínas de la subfamilia se encontró que existen proteínas que contienen los dominios RING finger y ARF en otros eucariotes, como plantas y hongos. En el caso de los dominios B-box y coiled-coil, estos presentan menos del 25% de identidad y 50% de cobertura de se-

La localización celular de la proteína ARD1/TRIM23 depende de su actividad de E3...

cuencia con proteínas fuera del reino *Metazoa*, lo que sugiere que estos dominios son específicos de este phylum. Estas observaciones sugieren que el reclutamiento de los distintos dominios en una sola proteína especializada es posterior al origen del reino *Metazoa*, y posiblemente la importancia de la interacción de los dominios para una función fisiológica específica es mayor en este tipo de organismos. El reclutamiento de dominios no específicos, con dominios específicos de metazoarios, se ha observado también en otras proteínas, como es el caso de las integrinas α y β (Whittaker et al., 2002).

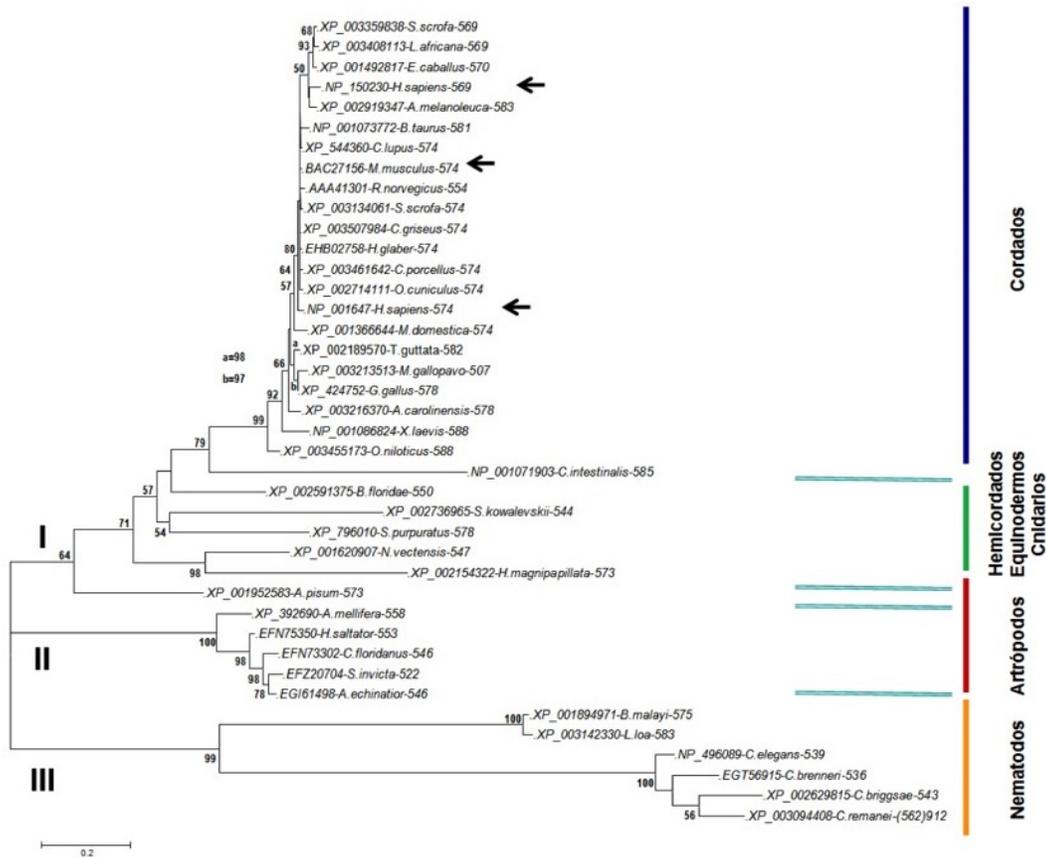


Figura 2. Árbol filogenético de la subfamilia TRIM23. Con números romanos se marcan los tres grupos principales. Las flechas señalan la localización de las secuencias de ARD1/TRIM23 de ratón y de humano. El árbol se realizó con el método de máxima verosimilitud y 1000 repeticiones de bootstrap.

Otros estudios sugieren que los dominios obtenidos durante la evolución de manera más frecuente entre las familias génicas de origen animal, comúnmente tienen un papel en

La localización celular de la proteína ARD1/TRIM23 depende de su actividad de E3...

procesos extracelulares o en la regulación celular de ciertos procesos, como la transducción de señales (Buljan y Bateman, 2009). Mas aún, se ha sugerido que estos eventos pueden ser responsables de la aparición de nuevos y complejos rasgos en metazoarios (Vogel y Choothia, 2006). Se sabe que los dominios RING finger y ARF de la proteína ARD1/TRIM23 son funcionales y tienen un papel clave en la autorregulación de los niveles proteínicos de la misma (Meza-Carmen et al., 2011). Debido a lo anterior, es probable que el reclutamiento de ambos dominios en una sola proteína tenga como ventaja una mejora en la eficiencia de la regulación de la función de la misma.

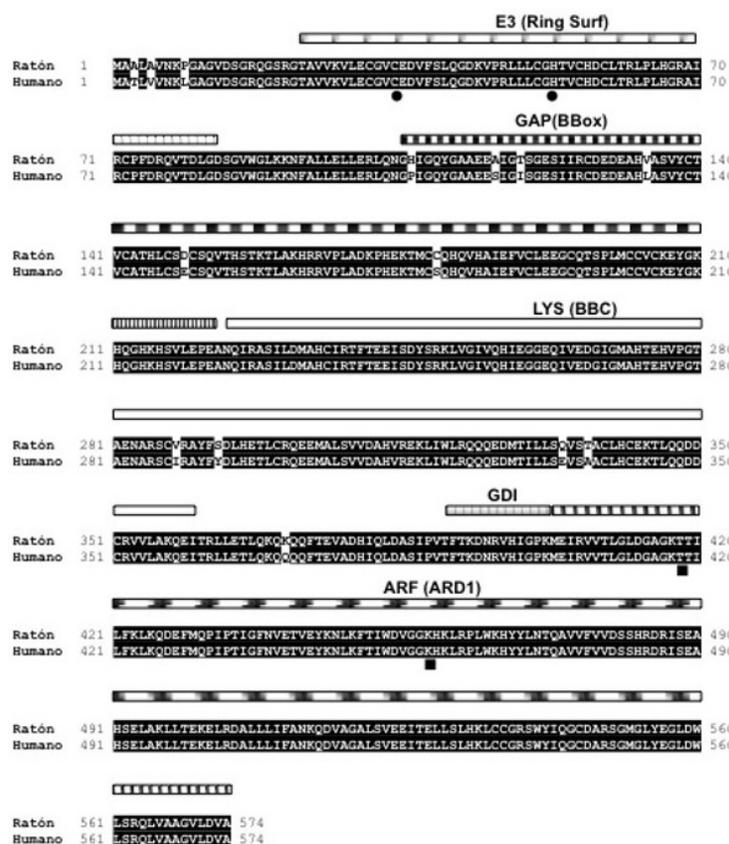


Figura 3. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de las proteínas ARD1/TRIM23 de ratón y de humano. Se muestran sobre la secuencia los cuatro dominios que conforman a esta familia de proteínas: el dominio “RING finger” (residuos 31-75; no. de acceso: c115348); el dominio GAP (residuos 101-333; no. de acceso: c100034); el dominio LYS (residuos 301-402; no. de acceso: smart00502); el dominio ARF (residuos 402-574; no. de acceso: c109099). Se señala la región GDI (residuos 387-402). Con puntos llenos se señalan los residuos C34 y H53 esenciales para la actividad de ubiquitina ligasa. Con cuadros se marcan las mutaciones T418N y K458I que anulan la unión de GTP o actividad de GTPasa, respectivamente.

Todos los estudios que describen a nivel bioquímico el papel de ARD1/TRIM23 se han obtenido mediante el uso de la proteína de origen humano (Vitale et al., 1996; 1998). Sin embargo, un modelo alternativo que ofrece una manipulación genético molecular más sencilla, por su facilidad de trabajo en el laboratorio, es el ratón (*Mus musculus*), especie donde esta proteína presenta un 98% de identidad con la de humano (Figura 3). A partir de la cepa de ratón C57 black 6 mutante, carente del gen *ARD1* (KO *ARD1*) (Meza-Carmen et al., artículo en preparación), se obtuvieron fibroblastos de la piel de embriones de 12.5 días de gestación. Estos fueron propagados y se obtuvieron clones individuales para ser utilizadas en estudios posteriores. Una de estas clones denominada 5-KO se transformó con los plásmidos pSwitch y con cada uno de los distintos plásmidos de manera independiente que expresan los genes silvestre, además de las distintas mutantes en el gen *ARD1/TRIM23*. Una vez obtenidas las células MEF transfectadas con los distintos genes *ARD1/TRIM23*, se analizó la expresión a nivel de transcrito y los niveles de la proteína ARD1/TRIM23, respectivamente (Figuras 4a y 4b). Los resultados indican que no existen cambios significativos en los valores de expresión a nivel de transcrito del gen *ARD1/TRIM23* entre las clones transformadas con los plásmidos que expresan los distintos genes *ARD1/TRIM23* (Figura 4a). Por otra parte, el análisis de los niveles de proteína reveló que la línea MEF que expresa el gen mutante ARD1-E3 (KO-E3) acumula 7 veces más proteína respecto a las líneas MEF que expresan el gen silvestre de ARD1 (KO-WT) o a los genes mutantes constitutivamente activado (KO-GTP) e inactivado (KO-GDP) en el dominio ARF (Figura 4b).

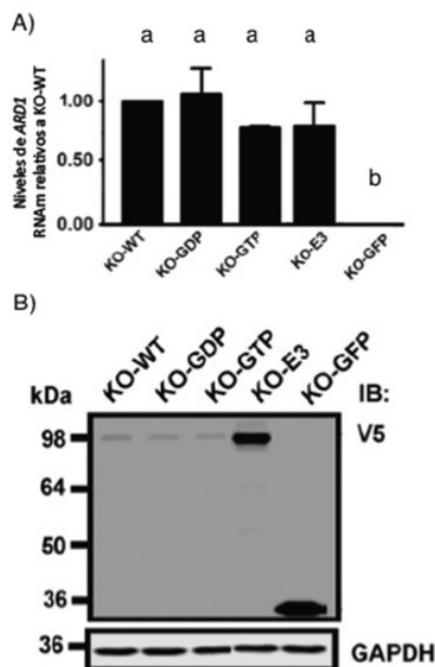


Figura 4. Expresión transcripcional y traduccional del gen *ARD1/TRIM23* WT y mutantes en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). A) Cuantificación de la expresión transcripcional de *ARD1/TRIM23* en las líneas MEF: KO-WT; KO-GDP; KO-GTP y KO-E3. Análisis de varianza ANOVA de una vía, $p < 0.005$. B) Análisis tipo Western blot usando el anticuerpo anti-V5 (parte superior) para detectar la expresión de las proteínas ARD1/TRIM23 en las distintas líneas MEF transfectadas; KO-GFP muestra la presencia de la proteína GFP-V5. En la parte inferior se detecta la presencia de la proteína GAPDH usada como control de carga (Modificado de Meza-Carmen et al., 2011).

Estos datos indican que los cambios en los niveles de proteína ARD1/TRIM23 en las líneas MEF transfectadas no están regulados a nivel transcripcional. Por otra parte, los resultados sugieren una posible autoubiquitinación *in vivo* de ARD1, debido a que la anulación de la actividad de E3 ubiquitina ligasa por las mutaciones en los residuos C34A y H53A, conduce a la acumulación de la proteína ARD1/TRIM23; y en congruencia se ha reportado que ARD1/TRIM23 se autoubiquitina *in vitro* (Vichi et al., 2005). La presencia de inhibidores del proteosoma durante el crecimiento de la línea MEF transfectada con el gen silvestre ARD1/TRIM23 conduce a un aumento en los niveles de esta proteína (Meza-Carmen et al., 2011). El conjunto de todos estos datos indican que la ubiquitinación de ARD1/TRIM23 y su posterior degradación proteosomal es un factor clave en la regulación de la cantidad de dicha proteína, y seguramente un mecanismo de regulación de su función biológica. Efectos similares a la autoubiquitinación de ARD1/TRIM23 se han reportado en otras E3 ubiquitina ligasas, en donde la autoubiquitinación de las mismas genera su eventual degradación, representando un mecanismo de autorregulación (Karbowski et al., 2007). Otra posible explicación es que ARD1/TRIM23 ubiquitina a otra E3 ubiquitina ligasa que a su vez tiene como sustrato a ARD1/TRIM23, como se ha reportado con la ubiquitinación entre las E3 ligasas 6-AP y RING1B (Zaaroor-Regev et al., 2010), lo cual indicaría una red de regulación entre diversas E3 ubiquitina ligasas.

La proteína ARD1/TRIM23 fue originalmente localizada en el aparato de Golgi y lisosomas en células tumorales humanas HEPG2 (Vitale, et al., 1998). De igual forma, cuando el gen silvestre de *ARD1/TRIM23* se expresó en células MEF (KO-WT), también fue localizada esta proteína en los lisosomas, indicando una colocalización cercana al 80% con este organelo (Figura 5). Estos datos indican una distribución intracelular similar entre los reportes de la distribución de ARD1/TRIM23 en células humanas, lo que hace sugerir funciones similares en ambos organismos. Sorprendentemente, el gen mutante en la actividad de E3 ubiquitina ligasa condujo a una deslocalización de esta proteína (Figura 5), además del aumento en sus niveles de proteína a nivel intracelular (Figura 4b). Por otro lado, la expresión de los genes mutantes constitutivamente activado (ARD1-GTP) e inactivado (ARD1-GDP) en el dominio ARF no contribuyeron de manera significativa a una alteración en la distribución intracelular de ARD1/TRIM23 (Figura 5).

Inicialmente se reportó a la ubiquitinación como un mecanismo de degradación de proteínas (Hershko y Ciechanover, 1998). Sin embargo, recientemente se le han atribuido otras funciones a esta modificación, como regulador en procesos de tráfico de proteínas, así como en eventos de señalización celular. Esta multiplicidad de funciones relacionadas al proceso de ubiquitinación depende del número de monómeros de ubiquitina unidos a la proteína blanco. Por ejemplo, una única subunidad de ubiquitina en una proteína blanco no conduce a la degradación de la misma, mientras que polímeros formados por más de cuatro subunidades favorecen la degradación. Por otra parte, la distintas funciones dependen además del residuo de lisina en la ubiquitina que esté involucrada en la polimerización (Ikeda y Dikic, 2008; Xu et al., 2009).

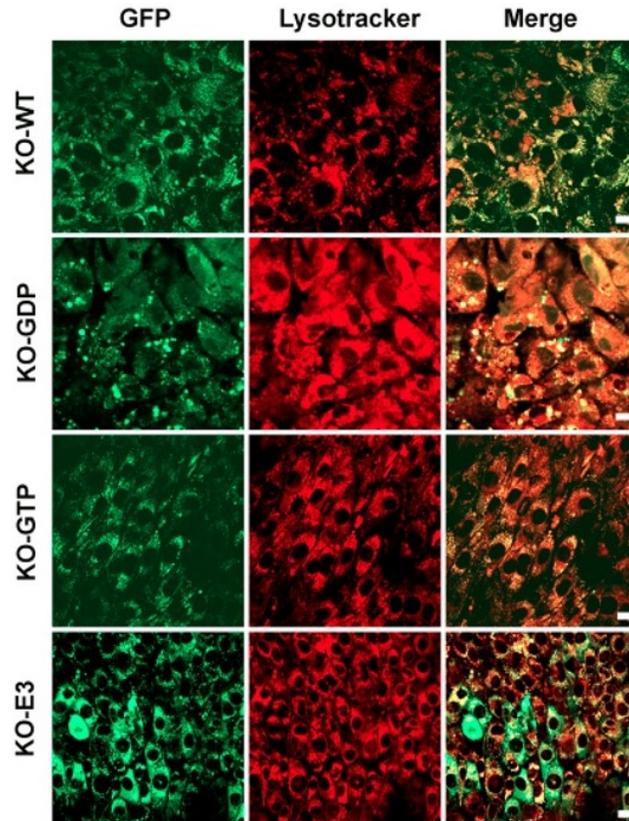


Figura 5. Influencia de los distintos dominios de ARD1 en la distribución celular de ARD1/TRIM23. Líneas celulares MEF fueron transfectadas establemente con los distintos genes *ARD1/TRIM23* fusionados a la proteína verde fluorescente-GFP; KO-WT, KO-GTP, KO-GDP y KO-E3. En color rojo, se muestra el marcador de lisosomas, Lysotracker. En color verde, se observa la fluorescencia emitida por la proteína GFP fusionada a la proteína ARD1/TRIM23. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopia confocal a una ampliación de 40X. MERGE, en tonalidad amarillo-naranja, muestra la colocalización de las señales de fluorescencia correspondiente a la proteína GFP y lisosomas (Tomada de Meza-Carmen et al., 2011).

Consideramos que los datos presentados en este artículo son relevantes. El hecho de encontrar homólogos a ARD1/TRIM23 únicamente en el reino *Metazoa* sugiere funciones específicas en miembros de este reino, como podrían ser en la participación de procesos inmunológicos, como se ha sugerido para otros miembros de la familia TRIM (Ozato et al., 2008). Además, la actividad de E3 ubiquitina ligasa ARD1/TRIM23 contribuye tanto a la estabilidad de la proteína, como a su localización en los lisosomas, quedando por determinar el tipo de ubiquitinación que experimenta ARD1/TRIM23. Sin embargo, el dominio ARF no está relacionado con la deslocalización de esta proteína.

Falta por explorar el efecto de la mutación del dominio RING Finger dentro del contexto de activación e inactivación del dominio ARF y la posible consecuencia en la deslocalización y/o niveles celulares del EGFR.

Agradecimientos

La investigación fue realizada mediante financiamiento del programa Intramuro del National Heart Lung and Blood Institute de los National Institutes of Health, EUA.

Bibliografía

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
2. Ardley, H. C. (2009). Ring finger ubiquitin protein ligases and their implication to the pathogenesis of human diseases. *Curr Pharm Desing.* 15:3697-3715.
3. Ben-Menachem, R., Regev-Rudzki, N. y Pines, O. (2011). The aconitase C-terminal domain is an independent dual targeting element. *J Mol Biol.* 409:113-123.
4. Buljan, M. y Bateman A. (2009). The evolution of protein domain families. *Biochem Soc Trans.* 37:751-755.
5. Chen, Z. J. (2005). Ubiquitin Signaling in the NF- κ B Pathway. *Nat Cell Biol.* 7: 758–765.
6. Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A. y Riveros-Rosas, H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274:6215-6227.
7. Deshaies, R. J. y Joazeiro C. A. P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 78:399-434.
8. Donaldson, J. G. y Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:362-375.
9. Gharakhanian, E., Chima-Okereke, O., Olson, D. K., Frost, C. y Kathleen-Takahashi M. (2011). env1 Mutant of VPS35 gene exhibits unique protein localization and processing phenotype at Golgi and lysosomal vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 346:187-95.
10. Giordano, F., Simoes, S. y Raposo, G. (2011). The ocular albinism type 1 (OA1) GPCR is ubiquitinated and its traffic requires endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8:11906-11911.
11. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41:95-98.

12. Hershko, A. y Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-479.
13. Hirschhorn, R. y Reuser, A. J. (2001). Glycogen storage disease type II: acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver, CR.; Beaudet, AL.; Sly, WS.; Valle, D., editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* McGraw-Hill; New York: . p. 3389-3420.
14. Ikeda, F. y Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.* 9:536-542.
15. Karbowski, M., Neutzner, A. y Youle, R. J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol.* 178:71–84.
16. Kravtsova-Ivantsiv, Y. y Ciechanover, A. (2011). Ubiquitination and degradation of proteins. *Methods Mol Biol.* 753:335-357.
17. Meza-Carmen, V., Pacheco-Rodríguez, G., Kang, G. S., Kato, J., Donati, C., Zhang, C. Y., Vichi, A., Payne, D. M., El-Chemaly, S., Stylianou, M., Moss, J. y Vaughan, M. (2011). Regulation of growth factor receptor degradation by ADP-ribosylation factor domain protein (ARD) 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:10454-10459.
18. Mishima, K., Tsuchiya, M., Nightingale, M. S., Moss, J. y Vaughan, M. (1993). ARD1, a 64-kDa guanine nucleotide-binding protein with a carboxyl-terminal ADP-ribosylation factor domain. *J Biol Chem.* 268:8801-8807.
19. Moss, J. y Vaughan, M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem.* 270:12327-12330.
20. Notredame, C., Higgins, D. G. y Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 302:205-217.
21. Orlando, K. y Guo, W. (2009). Membrane organization and dynamics in cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a001321.
22. Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H. y Morse H. C. 3rd. (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 8:849-860.
23. Popoff, V., Langer, J. D., Reckmann, I., Hellwig, A., Kahn, R. A., Bruegger, B. y Wieland F. T. (2011). Several Arf isoforms support COPI vesicle formation. *J Biol Chem.* 286:35634-35642.
24. Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G. y Ballabio, A. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20:2140–2151.
25. Rothman, J. E. y Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science.* 12:227-234.

26. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.
27. Vichi, A., Payne, D. M., Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J. y Vaughan, M. (2005). E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1). *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:1945–1950.
28. Vitale, N., Moss, J. y Vaughan M. (1996). ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1941-1944.
29. Vitale, N., Moss, J. y Vaughan, M. (1997). Characterization of a GDP dissociation inhibitory region of ADP-ribosylation factor domain protein ARD1. *J Biol Chem.* 272:25077-25082.
30. Vitale, N., Moss, J. y Vaughan M. (1998a). Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J Biol Chem.* 273:2553-2560.
31. Vitale, N., Horiba, K., Ferrans, V. J., Moss, J. y Vaughan M. (1998b). Localization of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) in lysosomes and Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8613-8618.
32. Vogel, C. y Chothia, C. (2006). Protein family expansions and biological complexity. *PLoS Comput Biol.* 2:e48.
33. Whittaker, C. A. y Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell.* 13:3369-3387.
34. Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D. y Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell.* 137:133-145.
35. Zaaroor-Regev, D., de Bie, P., Scheffner, M., Noy, T., Shemer, R., Heled, M. Stein I, Piskarsky, E. y Ciechanover A. (2010). Regulation of the polycomb protein RING1B by self-ubiquitination or by E6-AP may have implications to the pathogenesis of Angelman syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:6788–679.