

El peculiar mecanismo de degradación de la ornitina decarboxilasa fúngica

Françoise Sorais, Gustavo Niño-Vega y Gioconda San-Blas

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Microbiología y Biología Celular, Caracas, Venezuela

Resumen

La ornitina decarboxilasa (ODC) es una enzima inicial en la biosíntesis de poliaminas en muchos seres vivos, desde bacterias hasta células de mamíferos. Su control se realiza a partir de una inhibición por retroalimentación mediante los productos finales de la vía. En hongos dimorfos, la actividad de ODC y la consiguiente concentración de poliaminas están relacionadas con el proceso morfo-genético. Desde el hongo *Schizosaccharomyces pombe* hasta el hombre, las poliaminas inducen la síntesis de una antizima que a su vez inactiva a la ODC. Esta es hidrolizada por el proteasoma 26S en ausencia de ubiquitinas. El mecanismo de regulación de las poliaminas por la antizima parece estar conservado, aunque todavía no se ha podido identificar un homólogo de la antizima en algunas especies fúngicas. Haremos una revisión de los componentes que están involucrados en la regulación de los niveles de las poliaminas intracelulares y del estado actual de las investigaciones en relación a la regulación de la ODC en hongos dimorfos. La degradación de la ODC de los hongos reviste un interés particular ya que se podrían explorar nuevas alternativas para el desarrollo de drogas antifúngicas.

Palabras clave

Dimorfismo, Ornitina decarboxilasa, Antizima, Poliaminas

Mechanisms of degradation of the fungal ornithine decarboxylase

Summary

Ornithine decarboxylase (ODC) is the first enzyme in polyamine biosynthesis in numerous living organisms, from bacteria to mammalian cells. Its control is under negative feedback regulation by the end products of the pathway. In dimorphic fungi, ODC activity and therefore polyamine concentrations are related to the morphogenetic process. From the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* to human, polyamines induce antizyme synthesis which in turn inactivates ODC. This is hydrolyzed by the 26S proteasome without ubiquitination. The regulatory mechanism of antizyme on polyamines is conserved, although to date no antizyme homology has been identified in some fungal species. The components that are responsible for regulating polyamine levels in cells and the current knowledge of ODC regulation in dimorphic fungi are presented in this review. ODC degradation is of particular interest because inhibitors of this pathway may lead to the discovery of novel antifungal drugs.

Key words

Dimorphism, Ornithine decarboxylase, Antizyme, Polyamines

El proteasoma 26S y su relación con la degradación de proteínas ubiquitinadas y, excepcionalmente, con aquellas no ubiquitinadas (ornitina decarboxilasa)

La regulación de los procesos celulares puede ocurrir no sólo mediante la síntesis de proteínas específicas, sino también a través de su degradación. El papel de una proteína singular, el proteasoma 26S, en una gran cantidad de eventos -ciclo celular, transcripción, desarrollo, entre otros- sugiere que esta enzima está altamente regulada. En general, el proteasoma 26S actúa en proteínas marcadas con la cadena de poliubiquitina, que funciona como una señal de degradación [1-5]. Este sistema ubiquitina/proteasoma es el principal mecanismo de degradación selectiva de proteínas intracelulares en sistemas eucarióticos.

Dirección para correspondencia:
Dra. Gioconda San-Blas
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Centro de Microbiología y Biología Celular
Apartado 21827
Caracas 1020A, Venezuela
Tel.: +58 212 504 1496
Fax: +58 212 504 1382
E-mail: gsanblas@ivic.ve

©2003 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

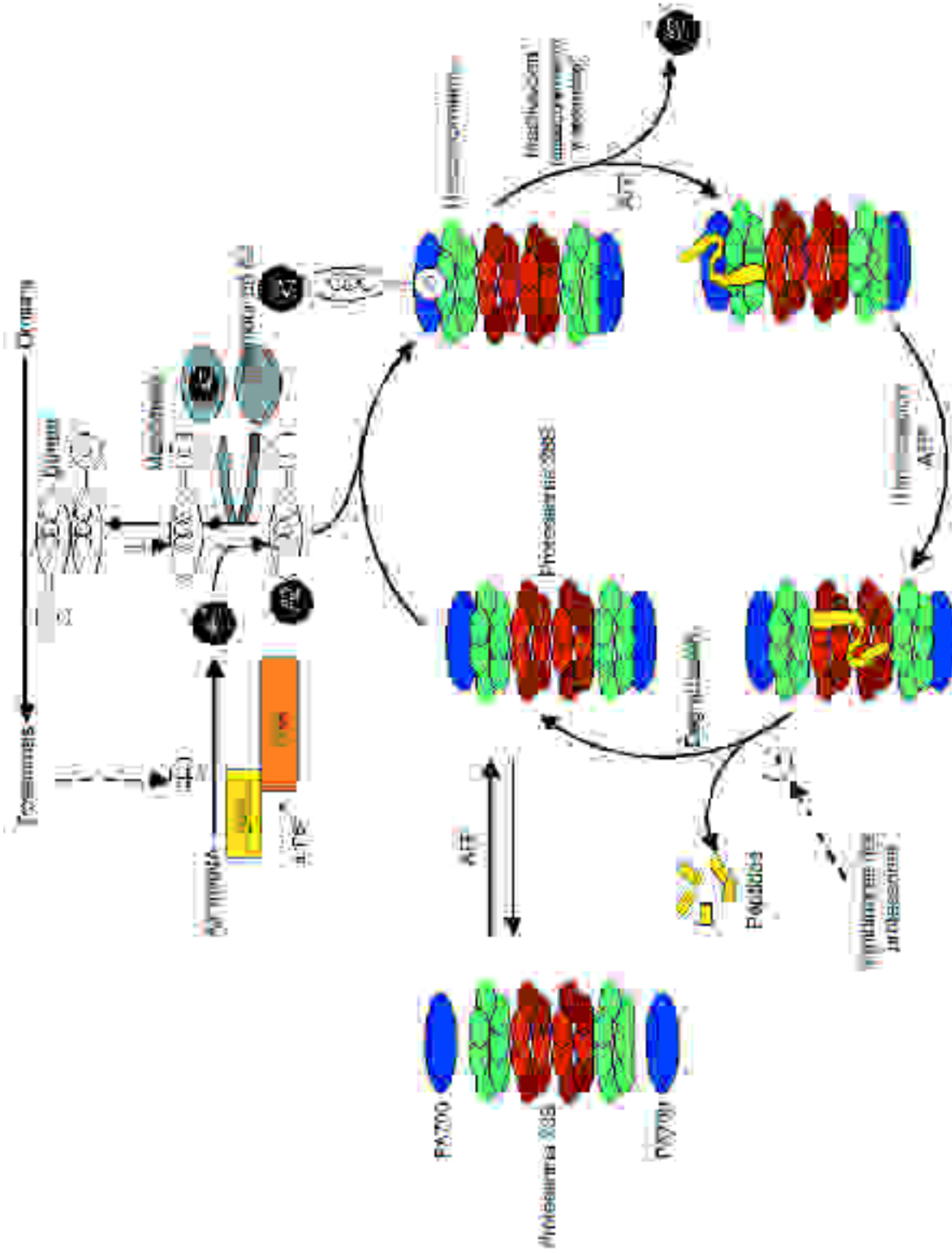


Figura. Ruta metabólica de la ornitina decarboxilasa (ODC) y la antizima (AZ). ORF: marco de lectura abierto; FS: desplazamiento (*frameshifting*). Modificado de Muramaki *et al.* [6].

La unidad básica del proteasoma 26S, el proteasoma 20S, es una proteasa de 700 kDa, en forma cilíndrica, compuesta de cuatro anillos heptaméricos (Figura). Contiene múltiples centros catalíticos dentro de la cavidad interna de los anillos, una topología que secuestra los sitios catalíticos de una acción al azar y permite una regulación apropiada de su capacidad enzimática. Las 28 subunidades de los anillos en procariotas representan dos productos génicos homólogos (y), cada uno presentes en 14 copias, siendo los dos anillos externos compuestos por siete subunidades cada uno y los dos internos, por siete subunidades cada uno [1]. En el caso de eucariotas, las siete subunidades de cada anillo se originan en siete genes distintos, aunque igualmente se agrupan en dos anillos tipo y dos tipo . Tres de las siete subunidades en el proteasoma eucariótico son presuntos sitios de catálisis, cuyas actividades se orientan principalmente a acciones similares a las de quimotripsina y tripsina, así como a una actividad hidrolítica de residuos glutamílicos [1]. En ciertos casos, las proteínas no son degradadas directamente por el proteasoma 20S sino que se requiere de una proteína adicional (PA700 o complejo 19S), también de 700 kDa de peso molecular, un complejo que se une de manera cooperativa a uno o ambos anillos terminales del proteasoma 20S, para conformar el proteasoma 26S, de $2,1 \times 10^3$ kDa, que requiere de la hidrólisis de ATP, una función inherente a PA700 (Figura) [1-5]. En levaduras, PA700 se separa en dos subcomplejos: la base que consiste de seis ATPasas y tres proteínas adicionales y una unidad que sirve de cubierta. Una de las principales funciones de este complejo es reconocer proteínas ubiquitinadas y otros sustratos del proteasoma; otra función es la de crear una compuerta en el anillo a través del cual, los sustratos pueden ser insertados en la cámara interna proteolítica, previo desdoblamiento de la cadena polipeptídica.

Excepcionalmente el proteasoma puede reconocer y degradar sustratos no conjugados al sistema de ubiquitininas. Una de tales excepciones es la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), que cataliza el primer paso de la ruta biosintética de las poliaminas [6]. Tanto su síntesis como su degradación están altamente reguladas. Cómo hace el proteasoma 26S para reconocer tal proteína no ubiquitinada como sustrato a ser degradado, es una de las preguntas que intentaremos responder en esta revisión.

La ODC es la enzima inicial en el proceso de síntesis de poliaminas, a partir de la decarboxilación de la ornitina, produciendo putrescina, espermidina y espermina, ésta última rara vez encontrada en hongos [7]. Como puede esperarse de su naturaleza policatiónica, su tamaño pequeño y su habilidad para neutralizar cargas negativas localmente, las poliaminas juegan importantes roles en procesos diversos en eucariotas, tales como funcionamiento de los canales iónicos, empaquetamiento de ácidos nucleicos, replicación del ADN, apoptosis, transcripción y traducción [7,8], razones por las cuales hay un gran interés en estudiar las poliaminas y sus mecanismos de regulación.

La ODC en el proceso de morfogénesis fúngica

El dimorfismo fúngico es un fenómeno complejo en el que participan numerosas variables. Hasta la fecha se han estudiado diversos eventos bioquímicos y moleculares que se modifican durante la transición. Entre ellos, hay datos que demuestran que en Mucorales, la actividad de ODC es poca en levaduras (L) y esporas, aumentando significativamente durante la transición hacia la fase micelial (M), con el consiguiente incremento en los nive-

les de poliaminas [7]. Resultados similares han sido reportados para *Yarrowia lipolytica*, *Ustilago maydis* y *Candida albicans* [9-12]. Por el contrario, en *Paracoccidioides brasiliensis*, hongo dimorfo causante de la micosis sistémica más frecuente en América Latina, el crecimiento de la fase L y su conversión de M a L están correlacionados con un aumento en los niveles de ODC y de poliaminas. Estos efectos sugieren que la actividad de ODC está asociada con el proceso de gemación de las levaduras [13,14]. El gen *PbrODC*, que codifica para ODC en *P. brasiliensis*, contiene un marco de lectura abierto (ORF) de 1413 bp con un único intrón (72 bp), y codifica para una proteína de 447 aminoácidos con un peso molecular estimado de 50 kDa, un punto isoelectrónico de 4,9 y una alta similitud con otras ODCs fúngicas. La funcionalidad de este gen se demostró por transformación en una mutante *odc* nula de *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión de *PbrODC* permaneció constante en todos los estadios del crecimiento del hongo y no mantuvo correlación con los incrementos observados anteriormente [13,14] al inicio del proceso de gemación de levaduras ni en el proceso de transición de micelio a levadura. De tal manera que se ha propuesto una regulación post-transcripcional para el producto del gen *PbrODC* [Niño-Vega et al., datos inéditos].

No hay información sobre la existencia y funcionamiento de un sistema de proteasoma 26S en *P. brasiliensis* similar al descrito en levaduras [1]. No obstante, un análisis preliminar de secuencias del genoma de *P. brasiliensis* [15], permitió identificar una región de 1265 pb, que presentaba 50,6 % de identidad en aminoácidos con la subunidad reguladora Rpn2p del proteasoma humano, e identidades de 50,4%, 49,9%, 47% y 42,8% con subunidades homólogas en *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus*, *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

Inhibición de la ODC por la antizima

El descubrimiento de la antizima se remonta al año 1976, cuando Canellakis et al. [16,17] identificaron una proteína de 26,5 kDa que inducida por las poliaminas, tenía la facultad de inhibir la ODC en el hígado de rata y algunas líneas de cultivos celulares [18]. A principios de los años noventa, se demostró con preparaciones de proteasomas aislados, que la antizima estimula la degradación de la ODC mediante la acción del proteasoma 26S en un proceso dependiente de ATP [19]. Las antizimas están altamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Se ha detectado la presencia de genes homólogos a las antizimas humanas desde organismos inferiores como levaduras (*S. pombe*) y moscas (*D. melanogaster*) hasta mamíferos. Hasta hoy han sido identificados por lo menos tres miembros de la familia de antizimas en humanos: las denominadas AZ1, AZ2, AZ3 [20,21].

La primera antizima descrita en un eucariota inferior fue identificada en el hongo *S. pombe* mediante una búsqueda de secuencias de ADN que codifican para secuencias proteicas homólogas a la antizima de *D. melanogaster* y a la antizima 1 de humano [22]. La funcionalidad de este gen se demostró mediante ensayos de actividad enzimática [23]. Posteriormente, Chattopadhyay et al. [24] evidenciaron que la antizima de *S. pombe* estaba involucrada en la regulación de la degradación de la ODC, al igual que en mamíferos. Se han identificado genes homólogos de la antizima en *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans* y *Pneumocystis cari-*

nii [22]. Estas antizimas presentan homología limitada a otras secuencias previamente conocidas (de 10 a 20 % de identidad en la secuencia de aminoácidos), hecho que refleja una divergencia sustancial en términos evolutivos (alrededor de mil millones de años) y una relación relativamente elevada de evolución de dicha proteína. Sin embargo, existen algunas regiones mucho más conservadas, en particular las que están comprendidas entre los aminoácidos 159-167 y 192-196 correspondientes a la antizima 1 de humano [22].

Hasta ahora no se ha podido evidenciar la existencia de un mecanismo de control de la ODC en hongos dimorfos similar al de la antizima de mamíferos [12,25, Niño-Vega *et al.*, datos inéditos]. Sin embargo, estudios recientes en *S. cerevisiae* [26] indican que la relación de degradación de ODC aumenta en presencia de espermidina y que la cicloheximida no interfiere con la captura de la poliamina. Esto sugiere el requerimiento de nueva síntesis de proteína en *S. cerevisiae* que, por lo tanto, utiliza un sistema similar al de la antizima descrita en otros sistemas biológicos para la degradación de ODC, en un proceso independiente de ubicuitina [27]. En *Coccidioides immitis* se ha sugerido que la regulación de la actividad de ODC ocurriría por otra vía ya que no se detectó la presencia de secuencias PEST (prolina, ácido glutámico, serina, treonina), característica de otras ODCs y de la mayoría de proteínas con alta tasa de recambio [28].

Un aspecto muy interesante en el control de la síntesis de antizima está relacionado con el mecanismo de desplazamiento en un nucleótido específico, por parte de los ribosomas, al procederse a la lectura del marco del ARNm correspondiente, fenómeno conocido como cambio de marco de lectura o *frameshifting*. Los eucariotas han desarrollado un mecanismo autorregulador por medio del cual la eficiencia en el cambio del marco de lectura en +1 nucleótido es usado como sensor del nivel de poliaminas. Tal desplazamiento *frameshifting* ocurre en la traducción del ARNm de la antizima de ODC [22]. Los estudios pioneros con la antizima de mamíferos indicaron que ésta está decodificada a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORFs) parcialmente sobrepuestos (Figura) [22,23]. Un ORF1 muy corto que contiene un codón de iniciación es seguido de un ORF2 más largo y carente de dicho codón. La traducción se inicia entonces en el codón de iniciación ubicado en ORF1 y luego se produce el cambio de marco de lectura en +1 en la zona sobrepuesta de ORF1 y ORF2, el cual es necesario para continuar la síntesis de la antizima funcional. El sitio de desplazamiento en los ORF1 y ORF2 es UCCUGA, donde la translocación del cuadruplete ocurre en la zona subrayada, para desplazarse al marco +1, inmediatamente antes del codón de terminación UGA del marco inicial. Para que este desplazamiento tenga una eficiencia de 20% o más, es importante que la base 3' del cuadruplete sea la primera base del codón de terminación de ORF1, característica que comparten *S. pombe* y mamíferos [23]. Las poliaminas, producto de la función de ODC, estimulan la eficiencia en la síntesis de antizima al incrementar la eficiencia del desplazamiento +1 indispensable en este proceso. De esta forma se cierra un circuito autorregulatorio en el cual la antizima regula los niveles de poliaminas al destruir la ODC, mientras que la etapa de elongación traduccional de su síntesis es un sensor que ajusta rápidamente la expresión de la antizima en respuesta a las fluctuaciones en los niveles de poliaminas. La inducción del desplazamiento +1 parece estar mediada directamente por la maquinaria traduccional [22,23].

En la secuencia polipeptídica propiamente dicha de la antizima de ratón, el extremo C-terminal (aa 106-212

del ortólogo humano) es suficiente para el enlace a ODC y esencial para la inhibición de la función transportadora de poliaminas en la antizima. Esta es la región más conservada. Una región adyacente (aa 55-105) es necesaria para la desestabilización de la ODC. Esta función está relacionada con la característica dimérica de la ODC, en su forma activa, que no es reconocida por la antizima y su desdoblamiento en dos subunidades monoméricas, cada una de las cuales tiene una alta afinidad con una molécula de antizima para crear heterodímeros antizima:ODC, que carecen de actividad enzimática y dirigen catalíticamente la degradación de la ODC hacia el proteasoma 26S (Figura). En consecuencia, el enlace de la antizima a una subunidad ODC no sólo previene la reasociación de unidades inactivas sino también causa un cambio conformacional de la subunidad que deriva en una exposición de la región C-terminal de la ODC al ataque hidrolítico del proteasoma 26S. En ese momento, la molécula de antizima es liberada y reciclada para desestabilizar otra subunidad monomérica de ODC [22].

Conclusión y perspectivas

Los avances producidos en la comprensión de la degradación de la ornitina decarboxilasa han sido espectaculares en los últimos 10 años. El control de las poliaminas celulares mediante la síntesis rápida de la antizima y la proteólisis de la ODC por el proteasoma constituye un mecanismo único de regulación enzimática de inhibición por retroalimentación. El proteasoma ha sido el blanco del desarrollo de agentes terapéuticos en el tratamiento o la prevención de varias enfermedades [29]. En este sentido, algunos inhibidores del proteasoma podrían ser drogas potenciales en la lucha contra el parásito *Trypanosoma brucei* [30]. Es posible que este mecanismo también esté involucrado en los procesos de patogenicidad fúngica, por lo que el estudio de la regulación y bloqueo selectivo de las subunidades catalíticas del proteasoma y de todo el mecanismo de control de la síntesis y regulación de ODC podría tener implicaciones terapéuticas futuras, como de hecho ya ocurre en *T. brucei*. El conocimiento de la estructura cristalina de este complejo [31] puede ser de gran ayuda en este campo.

Bibliografía

1. DeMartino GN, Slaughter CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999; 274: 22123-22126.
2. Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 2000; 182: 1-11.
3. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 2000; 22: 442-451.
4. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428.
5. Coux O. The 26S proteasome. *Prog Mol Subcell Biol* 2002; 29: 85-107.
6. Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tanaka K. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 1-6.
7. Ruiz-Herrera J. Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation. *Crit Rev Microbiol* 1994; 20: 143-150.
8. Basu HS, Marton LJ. Biological and therapeutic implications of the effects of polyamines on chromatin condensation. In: Casero RA, Jr. (Ed.) *Polyamines: regulation and molecular interaction*. RG Landes Company, Austin, 1995; pp. 101-128.
9. Guevara-Olvera L, Calvo-Méndez C, Ruiz-Herrera J. The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 485-493.
10. Jiménez-Bremont JF, Ruiz-Herrera J, Domínguez A. Disruption of gene *YODC* reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2001; 1: 195-204.
11. Guevara-Olvera L, Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Herrera J. Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology* 1997; 143: 2237-2245.
12. Herrero AB, López MC, García S, *et al.* Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. *Infect Immun* 1999; 67: 4870-4878.
13. San-Blas G, Sorais F, San-Blas F, Ruiz-Herrera J. Ornithine decarboxylase in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Microbiol* 1996; 165: 311-316.
14. San-Blas G, San-Blas F, Sorais F, Moreno B, Ruiz-Herrera J. Polyamines in growth and dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Microbiol* 1997; 166: 411-413.
15. Reinoso-Martín C. Análisis preliminar del genoma de *Paracoccidioides brasiliensis*. Utilización del gen *URA3* como marcador genético. Tesis de doctorado, Universidad de Salamanca, Departamento de Microbiología y Genética, Salamanca, España, 2001.
16. Fong WF, Heller JS, Canellakis ES. The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochim Biophys Acta* 1976; 428: 456-465.
17. Heller JS, Fong WF, Canellakis ES. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1358-1362.
18. Hayashi S, Murakami Y, Matsufuji S. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *TIBS* 1996; 21: 27-30.
19. Murakami Y, Matsufuji S, Kameiji T, *et al.* Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992; 360: 597-599.
20. Coffino P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie* 2001; 83: 319-323.
21. Chen H, MacDonald A, Coffino P. Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 2002; 277: 45957-45961.
22. Ivanov IP, Gesteland RF, Atkins JF. Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 3185-3196.
23. Ivanov IP, Matsufuji S, Murakami Y, Gesteland RF, Atkins JF. Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals. *EMBO J* 2000; 19: 1907-1917.
24. Chattopadhyay MK, Murakami Y, Matsufuji S. Antizyme regulates the degradation of ornithine decarboxylase in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 2001; 276: 21235-21241.
25. López MC, García S, Ruiz-Herrera J, Domínguez A. The ornithine decarboxylase gene from *Candida albicans*. Sequence analysis and expression during dimorphism. *Curr Genet* 1997; 32: 108-114.
26. Gupta R, Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW, Tabor H. Effect of spermidine on the *in vivo* degradation of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10620-10623.
27. Gandre S, Kahana C. Degradation of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* is ubiquitin independent. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 139-144.
28. Guevara-Olvera L, Hung CY, Yu JJ, Cole GT. Sequence, expression and functional analysis of the *Coccidioides immitis* ODC (ornithine decarboxylase) gene. *Gene* 2000; 242: 437-448.
29. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001; 8: 739-758.
30. Nkemgu-Njinkeng J, Rosenkranz V, Wink M, Steverding D. Antitrypanosomal activities of proteasome inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2038-2040.
31. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 2002; 10: 609-618.