



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ISG15 Y LA ISGILACIÓN DE PROTEÍNAS Y SUS IMPLICACIONES  
EN LA NEUROPROTECCIÓN**

*TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTA**

**SAMUEL ALEJANDRO ALVAREZ REYES**



**CDMX, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

**VOCAL:** MIQUEL GIMENO SECO

**SECRETARIO:** ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

**1er. SUPLENTE:** MONTSERRAT LÓPEZ CORIA

**2° SUPLENTE:** PAOLA VIRIDIANA LEÓN MIMILA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO (UACM)**

**(MODALIDAD: AULA VIRTUAL)**

## **ASESOR DEL TEMA:**

DRA. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

JOSUÉ ORLANDO RAMÍREZ JARQUÍN

## **SUSTENTANTE:**

SAMUEL ALEJANDRO ALVAREZ REYES

## **Agradecimientos académicos**

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Angeles Concepción Tecalco Cruz, en el aula virtual de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Se reconoce y agradece a la **Dra. Angeles C. Tecalco Cruz** por su asesoría en la realización de este escrito, así como al **Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín** por la orientación brindada para su conclusión.

Se reconocen las valiosas observaciones y correcciones del jurado asignado conformado por:

<b>PRESIDENTE</b>	<b>Dr. José Pedraza Chaverri</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Dr. Miquel Gimeno Seco</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Dra. Montserrat Lopez Coria</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Dra. Paola Viridiana Leon Mimila</b>

**Se reconoce el apoyo y la valiosa asesoría técnica otorgada por:**

<b>Dra. Bibiana Ortega Domínguez</b>	Facultad de Química, UNAM
<b>Dra. Marina Macías Silva</b>	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

## **Dedicatorias**

A Inés Reyes y Samuel Alvarez, por todo el apoyo y las oportunidades que me dieron para poder desarrollarme académicamente pero más importante, como ser humano.

A Jesús Álvarez, porque ha sido un cómplice en todo el camino que he recorrido.

A José Alvarez, porque me impulsa siempre a ser mejor y me muestra las diferentes perspectivas que existen en la vida.

A todos los compañeros que tuve en la Facultad de Química, porque fueron parte esencial de mi desarrollo y me brindaron memorias invaluable.

A las personas que me acompañaron durante el camino y hoy no están para disfrutar este logro conmigo.

A la Dra. Angeles Tecalco, porque me dio las herramientas y tuvo la paciencia de mostrarme el camino para poder concluir este trabajo.

# Contenido

1. Resumen.....	1
2. Lista de Abreviaturas .....	2
3. Introducción.....	4
3.1 Planteamiento del Tema .....	9
3.2 Objetivo general .....	10
3.3 Objetivos particulares .....	10
3.4 Estrategia de investigación.....	10
4. Capítulo 1 .....	11
4.1 Generalidades de ISG15 y el sistema de ISGilación .....	11
4.2 ISGilación de proteínas .....	12
4.3 Expresión de <i>ISG15</i> .....	14
4.4 Implicaciones biológicas de la ISGilación .....	17
5. Capítulo 2 .....	21
5.1 ISG15 y el sistema de ISGilación y su posible implicación en algunas enfermedades del cerebro. ....	21
5.2 Isquemia .....	22
5.3 Depresión .....	25
5.4 Ataxia-Telangiectasia .....	32
6. Capítulo 3 .....	39
6.1 Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento .....	39
6.2 ISG15 como un posible biomarcador para la esclerosis lateral amiotrófica.....	41
6.3 Mitocondria y mitofagia en enfermedades neurodegenerativas.....	42
7. Capítulo 4 .....	48
7.1 Discusión: Implicaciones de ISG15/ISGilación en el cerebro .....	48
8. Capítulo 5 .....	52
8.1 Conclusiones.....	52
8.2 Perspectivas .....	52
9. Referencias .....	54

## Índice de figuras

Figura 1. Dominios de la proteína gen estimulado por interferón 15 (ISG15)...	9
Figura 2. Mecanismo de ISGilación y des-ISGilación. ....	12
Figura 3. Ejemplos de las implicaciones biológicas de la ISGilación y la proteína estimulada por interferón 15 (ISG15) libre.....	16
Figura 3. Expresión de <i>ISG15</i> en humanos.....	14
Figura 4. Información general de la relación de la proteína gen estimulado por interferón 15 (ISG15) en enfermedades neurológicas. ....	18
Figura 5. Mecanismo de acción de la enzima célula precursora neural expresada (NEDD4) sobre las proteína asociada a RAS (RAP2A).....	27
Figura 6. Mecanismo de autofagia y proteínas esenciales para su iniciación. ....	29
Figura 7. Número de muertes, incidencia y prevalencia de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica en el mundo. ....	34
Figura 8. Comparación de mitocondria dañada y sana. ....	40
Figura 9. Altos niveles de la proteína estimulada por interferón 15 (ISG15) parecen tener un efecto dual sobre la neuroprotección .....	43

## Índice de tablas

Tabla 1. Algunas proteínas similares a la ubiquitina (UBMS) y sus funciones	6
Tabla 2. Expresión de <i>ISG15</i> en humanos.....	14
Tabla 3. Características de algunas enfermedades neurodegenerativas.....	37

## 1. Resumen

ISG15 es una proteína parecida a la ubiquitina de 15 kDa que se asocia covalentemente a sus proteínas blanco por un proceso conocido como ISGilación, el cual ocurre de manera parecida a la ubiquitinación. En los últimos años, las investigaciones sobre la ISGilación de proteínas se han incrementado, demostrando la multifuncionalidad de esta proteína, así como su desregulación y relevancia funcional en padecimientos como el cáncer. De manera interesante, han surgido estudios que sugieren que ISG15 podría ser un factor con implicaciones cruciales en los mecanismos de neuroprotección y neurodegeneración. En este trabajo se puntualiza el escenario actual de las investigaciones sobre las implicaciones observables de la proteína ISG15 y del sistema de ISGilación de proteínas en patologías del SNC tales como la ataxia-telangiectasia, la isquemia, la depresión y su posible conexión con algunas enfermedades neurodegenerativas como son el Parkinson, el Alzheimer, y la esclerosis lateral amiotrófica. El sistema de ISGilación aumenta durante estas patologías lo que provoca la alteración de distintos procesos como la autofagia, la degradación de proteínas, la mitofagia y hasta el desarrollo estructural de las neuronas. La importancia de esta proteína fue comprobada con técnicas de RNA interferente, en donde se aminoraban las alteraciones de los procesos mencionados.

En conclusión, el incremento en los niveles de la ISGilación de proteínas parece tener un efecto neuroprotector cuando existe daño agudo cerebral, como en el caso de la isquemia; mientras que tiende a disminuir la neuroprotección cuando los niveles de la ISGilación de proteínas incrementan en enfermedades crónicas, como en el caso de las enfermedades neurodegenerativas.

## 2. Lista de Abreviaturas

4EHP: proteína homóloga 4E	MRTF-A: Factores de transcripción relacionados con la miocardina A
ADN: Ácido desoxirribonucleico	NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
ARG: Arginina	NEDD4: Célula precursora neural expresada regulada negativamente en el desarrollo 4
A-T: Ataxia telangiectasia	NEDD8: Célula precursora neural expresada regulada negativamente en el desarrollo 8
ATM: gen ataxia telangiectasia mutado	NK: células natural killer
ATP: Adenosín trifosfato	O <sub>2</sub> : Oxígeno molecular
CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona	p53: proteína tumoral p53
CXCL9: ligando de quimiocina 9	PARKIN: proteína de ubiquitina E3 ligasa parkin RBR
EA: Enfermedad de Alzheimer	PE: Fosfoatidiletanolamina
EFP: Proteína dedo responsiva al estrógeno	PINK1: Proteína cinasa putativa inducida 1
EIF4E : Factor de iniciación de traslación eucariótico 4E	Poly I:C: polinosónico: ácido policitidílico
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica	RA: Ácido transretinoico
EP: Enfermedad de Parkinson	RAC1: sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras
GATA1: Proteína de unión a GATA 1	Rap2A: proteína relacionada a RAS
GLY: Glicina	RNA: Ácido Ribonucleico
HERC5: Enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3	RNAseq: RNA sequencing
HHARI: Homóloga humano de Drosophila ariadne	ROS: especies reactivas de oxígeno
IF: Inmunofluorescencia	siRNA: Pequeño RNA interferente
IFN: Interferón	SNC: Sistema nervioso central
IFNA6: Interferón $\alpha$ 6	SRF: Factor de respuesta sérico
IFNAR1: Receptor de interferón 1	SUMO: Pequeño modificador similar a la ubiquitina
IL1- $\beta$ : Interleucina 1- $\beta$	SUMO2/3: Mezcla de SUMO 2 y SUMO3
IL-6: Interleucina 6	TBI: lesión cerebral traumática
ISG15-/-: Expresión silenciada de ISG15	TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral $\alpha$
ISG15: gen estimulado por interferón 15	TNFRSF11B: Receptor 11B de la familia del factor de necrosis tumoral
JNK: c-JUN-N terminal cinasa	UBCH8: enzima H8 conjugadora de ubiquitina
KLF9: factor similar a Kruppel 9	UBE1L-/-: Expresión silenciada de UBE1L
KO: Knockout	UbE1L: Proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina
LC3: Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3),	UBM: Moléculas similares a la ubiquitina
LEU: Leucina	UPS: Sistema ubiquitina-proteosoma
LFA-1: antígeno asociado funcionalmente a linfocitos 1	USP18: Peptidasa específica de ubiquitina 18
LPS: Lipopolisacáridos	WB: Western blotting
MCAO: Oclusión de arteria media cerebral	TBI: lesión cerebral traumática
MDD: Trastorno depresivo mayor	
MEKK1: MAPK/ERK cinasa cinasa 1	
MIA: Activación inmune materna	
miRNA: micro RNA	
MKK4: proteína cinasa cinasa 4 activada por mitógenos	



### 3. Introducción

El sistema nervioso central (SNC) está conformado por 7 partes principales: médula espinal, bulbo raquídeo, tronco encefálico, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo y cerebro. La comunicación del SNC implica conexiones distintas entre estas partes y se ha identificado en general que cada una de ellas tiene funciones específicas (Kandel et al., 2013). La médula espinal recibe y procesa información sensorial del cuerpo y controla el movimiento de las extremidades y el tronco debido a las motoneuronas que residen en esta estructura. El bulbo raquídeo controla varias funciones autónomas como la digestión, respiración y latidos del corazón. El tronco encefálico conecta la información de movimiento desde los hemisferios del cerebro al cerebelo; el cerebelo modula la fuerza y rango de movimiento y está involucrado en el aprendizaje de las habilidades motoras. Mientras que el mesencéfalo, controla varias funciones motoras y sensoriales, incluyendo el movimiento de los ojos y la coordinación de reflejos auditivos y visuales. El diencéfalo procesa la mayoría de la información que llega a la corteza cerebral del resto del SNC y también regula funciones autónomas, endocrinas y viscerales (Kandel et al., 2013).

El cerebro tiene de 2 hemisferios, cada uno consiste en una capa externa estriada conocida como corteza cerebral y tres estructuras debajo: el hipocampo, la amígdala y los ganglios basales. La corteza cerebral es responsable de la ejecución y planeación de las acciones de la vida diaria. Los ganglios basales participan en regular la acción motora, el hipocampo está relacionado con la memoria y la amígdala coordina las respuestas autónomas y endocrinas durante los estados emocionales (Kandel et al., 2013).

Estas partes del SNC están compuestas por diferentes tipos de células, de las cuáles las más importantes son las neuronas y las células gliales. Las neuronas son las encargadas de coordinar todos los mecanismos cognitivos, autónomos y funcionales del ser humano; son células excitables, es decir, tienen la capacidad de comunicarse con alta precisión y velocidad con otras células distantes. Su estructura es una de las razones por la que se les permite desarrollar esta comunicación ya que las neuronas tienen dendritas que reciben señales de un axón. A este proceso

de comunicación neuronal se le conoce como sinapsis y se compone de las terminales del axón presináptico y el sitio de unión postsináptico (Kandel et al., 2013). Dependiendo del tipo de contacto que realicen las neuronas, las sinapsis se dividen en 2 grupos: eléctricas y químicas. En las sinapsis eléctricas, la terminal presináptica y la célula postsináptica están en una posición muy cercana en regiones conocidas como uniones comunicantes, el potencial de acción que se genera en la neurona presináptica entra directamente a las células postsinápticas a través de puentes especiales conocidos como conexinas o canales de unión comunicante que físicamente conectan los citoplasmas de ambas células (Kandel et al., 2013). Las sinapsis químicas están separadas por una hendidura y no se comunican a través de puentes como las eléctricas, en este caso el potencial de acción en la célula presináptica provoca la liberación de transmisores químicos que se difunden a través de la hendidura sináptica y se unen a moléculas receptoras en la membrana postsináptica, esto regula el abrir y cerrar de canales iónicos de la célula postsináptica, modificando su potencial de membrana lo que puede excitar o inhibir a la célula postsináptica. (Kandel et al., 2013).

Por otra parte, las células gliales se dividen en: astrogía, oligodendrogía y microglía (Allen & Lyons, 2018). La astrogía (o astrocitos), tiene una morfología similar a una estrella con varias ramificaciones que terminan en miles de finos procesos que interactúan con las sinapsis, vasos sanguíneos y otras células. Son responsables de la formación, eliminación y función de las sinapsis; recubren la vasculatura del SNC, contribuyen al soporte metabólico y su función homeostática, también tienen una interacción recíproca con las neuronas regulando su función (Allen & Lyons, 2018). La oligodendrogía (u oligodendrocitos), producen capas de lípidos ricos en mielina que envuelven a los axones, que a su vez regulan la velocidad de conducción de los potenciales de acción. Facilitan la conducción iónica que es necesaria para el funcionamiento normal del potencial de acción de las neuronas (Allen & Lyons, 2018). La microglía, se refiere a las células inmunológicas del cerebro, su implicación además de vigilar la respuesta inmunológica es interactuar con distintas células del SNC para regular procesos como la eliminación de sinapsis defectuosas, fagocitar el exceso de neuronas que están en proceso

apoptótico e interactuar con otros tipos de células del SNC para regular diferentes funciones, por ejemplo, la migración tangencial (Allen & Lyons, 2018).

Cuando las células del SNC tienen mecanismos moleculares afectados se pueden desarrollar neuropatologías. Las neuropatologías son enfermedades del SNC y periférico; que son causadas muchas veces por bacterias, virus, hongos, parásitos o incluso por eventos autoinmunes (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2020; World Health Organization, 2016). Algunos ejemplos de estas patologías son:

- Enfermedades neurogenéticas (Huntington)
- Trastornos de desarrollo (Parálisis cerebral)
- Enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson, entre otras)
- Enfermedades metabólicas (Gaucher)
- Enfermedades cerebrovasculares (Ataque isquémico transitorio)
- Traumas
- Trastornos convulsivos
- Tumores cerebrales

Las neuropatologías implican alteraciones de diversas vías de señalización en las diferentes redes neuronales que son en parte mediadas por modificaciones postraduccionales de proteínas, las cuales son un elemento clave en la comunicación celular (Zamudio et al., 2012). La ubiquitinación es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas por su presencia en distintos tipos celulares y su relación directa con el equilibrio celular (Rubinsztein, 2007).

La ubiquitinación se caracterizó como una marca para la subsecuente degradación de las proteínas por el proteosoma 26s, descrito por el grupo del Dr. Ciechanover (Hershko et al., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que tiene un amplio rango de funciones, por ejemplo, en vías de señalización, en la apoptosis, la autofagia, el ciclo celular, la regulación transcripcional y la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Zamudio et al., 2012). La ubiquitinación de proteínas es una reacción dependiente de adenosín trifosfato (ATP), a través del motivo LEU-ARG-GLY-GLY, lo que genera un enlace isopeptídico entre la ubiquitina y un residuo

de lisina de las proteínas blanco (Zamudio et al., 2012). La ubiquitinación puede ocurrir como monoubiquitinación, donde una molécula de ubiquitina se une covalentemente mediante un enlace isopeptídico a una proteína objetivo; multimonoubiquitinación, sucede cuando una molécula de ubiquitina se une a un sustrato, en varios sitios de éste; y poliubiquitinación, cuando se forman cadenas de ubiquitina al enlazarse varias entre ellas (Zamudio et al., 2012). Para que este proceso se lleve a cabo son necesarias 3 enzimas, que son conocidas como enzima de activación E1, enzima de conjugación E2 y enzima de ligación E3. Existe un gran número de enzimas E3 ligasas de ubiquitina, responsables de la especificidad del sustrato a ubiquitinarse (Zamudio et al., 2012). En general, las proteínas ubiquitinadas son degradadas en el proteosoma, a este proceso se le denomina degradación de proteínas vía el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS por sus siglas en inglés *Ubiquitin/proteasome system*). Es importante mencionar que se ha descrito que este proceso de degradación, vía el UPS, se afecta en varias neuropatologías (Lehman, 2009).

Existen otras proteínas similares a la ubiquitina (UBMs por sus siglas en inglés *Ubiquitin Like Modifiers*), que también son responsables de cambios postraduccionales. Al igual que la ubiquitinación, la conjugación de las UBM's afecta las propiedades de los sustratos al modificar su superficie topológica, actividad enzimática, localización subcelular y su interacción con proteínas (Herrmann et al., 2007). Se conocen diversas UBM's, las cuales se presentan en la Tabla 1, dentro de las cuales ISG15 (por su nombre en inglés Interferon Stimulated Gene 15) es una de las UBM's reportadas en algunas neuropatologías.

Tabla 1. **Algunas proteínas similares a la ubiquitina (UBMs) y sus funciones.**

Modificado de: (Cajee et al., 2012; Cappadocia & Lima, 2018)

UBMs en humano	Funciones asociadas
ISG15	Actividad antiviral y antiinflamatoria. Propiedades antagonistas a la ubiquitina.
SUMO	Transporte nuclear, replicación y reparación DNA, mitosis, neuroprotección y transducción de señales.
NEDD8	Control del ciclo celular y embriogénesis. Involucrado en la formación de agregosomas.
ATG8	Incrementa la expresión del receptor kappa opioide en la superficie de la célula, transporte intracelular de receptores GABA (A), formación de autofagosomas.
ATG12	Formación de vacuola autofágica. Regulación negativa de la producción de interferón tipo I.
FAT10	Degradación de proteínas. Inestabilidad cromosómica en cáncer.

A pesar de que ISG15 es una UBM, sólo se limita la expresión del gen de *ISG15* a organismos vertebrados a diferencia de la *ubiquitina* que se expresa en todos los organismos eucariontes (Zhang & Zhang, 2011). Esta proteína se encuentra en la naturaleza de dos maneras, como proteína libre, conocida también como ISG15 libre y conjugada a otras proteínas, es decir modificando postraduccionalmente a otras proteínas, modificación que se conoce como ISGilación.

La proteína ISG15 es un importante factor en la respuesta inmune, y su expresión es inducida en infecciones virales y bacterianas (Zhang & Zhang, 2011). Además, en diferentes tipos de cáncer se ha observado que ISG15 presenta funciones ambiguas, debido a que en células de cáncer de mama puede actuar como un agente pro-tumor, mientras que en células de cáncer cervical, sanguíneo y de ovarios actúa como anti-tumor (Tecalco-Cruz, 2020).

Del mismo modo que en un contexto de cáncer, ISG15 parece tener funciones contrarias en el SNC, ya que parece tener diferentes implicaciones en la neuroprotección. Por ejemplo, en la isquemia ISG15 incrementa sus niveles, y de esta manera incrementa la protección neuronal (Rossi et al., 2015); mientras que en una condición de ataxia-telangiectasia (enfermedad neurodegenerativa) ISG15 disminuye la protección cerebral (Desai et al., 2013; Juncker et al., 2021; Wood et al., 2011). Por lo que esta proteína parece ser un elemento clave en el desarrollo y progresión de algunas neuropatologías.

### **3.1 Planteamiento del Tema**

La ISG15 es una proteína parecida a la ubiquitina que se asocia covalentemente a sus proteínas blanco por un proceso conocido como ISGilación, el cual es catalizado por tres diferentes enzimas (enzima E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación a proteínas blanco) (Zhang & Zhang, 2011). En los últimos años, el número de investigaciones sobre la ISGilación de proteínas se ha incrementado, demostrando la multifuncionalidad de esta modificación postraducciona, así como su relevancia funcional y desregulación en diferentes padecimientos, como el cáncer. Por otra parte, estudios recientes sugieren que ISG15 podría ser un factor con implicaciones cruciales en los mecanismos de neuroprotección y neurodegeneración. Este trabajo monográfico pretende puntualizar el escenario actual sobre los mecanismos moleculares de acción y de regulación de la proteína ISG15 y del sistema de ISGilación de proteínas en el cerebro. Además, se ha descrito la relevancia de esta modificación en patologías del SNC, como la ataxia-telangiectasia, la isquemia, la depresión y la esclerosis lateral amiotrófica. Este trabajo de investigación permitirá conocer lo que hasta ahora se ha encontrado sobre ISG15/ISGilación en el SNC, lo que contribuirá a la generación de perspectivas para el desarrollo de nuevos proyectos que busquen entender la importancia de ISG15 y la ISGilación de proteínas en diferentes contextos fisiopatológicos del cerebro.

### **3.2 Objetivo general**

Discutir los mecanismos moleculares de la proteína ISG15 y el sistema de ISGilación dentro del SNC y sus implicaciones funcionales en algunas neuropatologías.

### **3.3 Objetivos particulares**

1. Investigar las características bioquímicas de ISG15 y el sistema de ISGilación.
2. Describir los mecanismos moleculares de la proteína ISG15 y del sistema de ISGilación.
3. Revisar y analizar las posibles relaciones funcionales entre ISG15/ISGilación y algunas neuropatologías reportadas en la literatura.
4. Discutir la importancia de ISG15/ISGilación en la neuroprotección y neurodegeneración, y su proyección dentro del estudio de algunas neuropatologías.

### **3.4 Estrategia de investigación**

Con apoyo de bibliografía actualizada, obtenida a partir de PubMed se investigaron las implicaciones de ISG15 y la ISGilación en la neuroprotección para proponer nuevas áreas de estudio para el posible desarrollo de nuevos blancos farmacológicos y/o terapias a enfermedades neurológicas.

## 4. Capítulo 1

### 4.1 Generalidades de ISG15 y el sistema de ISGilación

El gen estimulado por interferón 15 (ISG15) es una proteína de 156 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 15 kDa, organizada en dos dominios similares a la ubiquitina conocidos como dominio amino y dominio carboxilo (Figura 1) (Tecalco-Cruz, 2020).

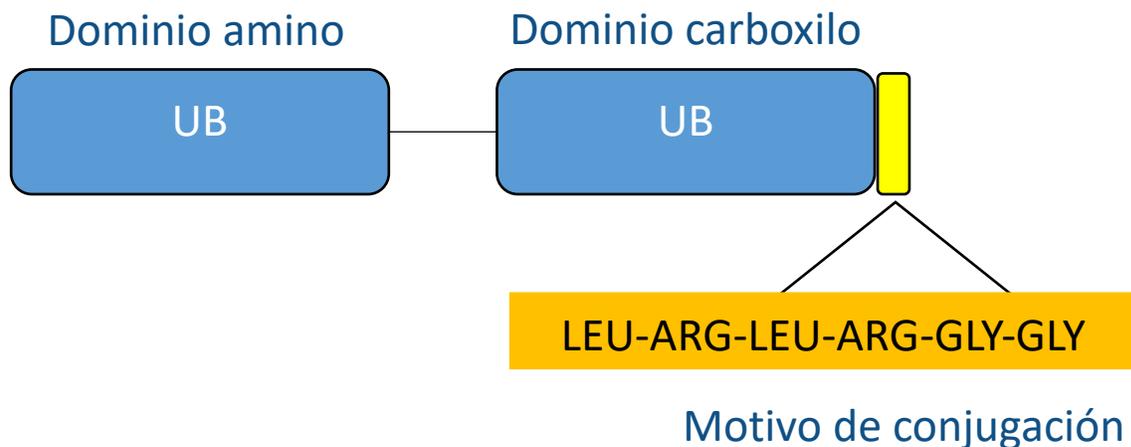


Figura 1. **Dominios de la proteína gen estimulado por interferón 15 (ISG15).** ISG15 tiene dos dominios similares a la ubiquitina, en su dominio carboxilo terminal, se encuentra el motivo de conjugación que le permite unirse covalentemente con otras proteínas.

La ISG15 no conjugada a proteínas blanco es conocida como ISG15 libre, y puede localizarse en el compartimento intracelular y extracelular. En el compartimento intracelular, ISG15 puede regular las interacciones entre proteínas, el desacoplamiento de complejos proteicos, la actividad de interruptores moleculares y procesos de autofagia (Jeon et al., 2009; Okumura et al., 2007; Spinnenhirn et al., 2017; Villarroya-Beltri et al., 2016). Esto indica que ISG15 libre podría tener versatilidad de interacciones con otras proteínas lo que le daría la capacidad de intervenir de distintas maneras dentro de la célula.

De manera extracelular, se ha encontrado que los linfocitos y monocitos secretan ISG15 para estimular la producción de interferón  $\gamma$  e *IL-10* en las células natural killer (NK) y CD3+T a través del receptor antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1 *por sus siglas en inglés Lymphocyte Function-Associated Antigen 1*). Lo anterior sugiere que ISG15 libre tiene propiedades semejantes a las citocinas (Tecalco-Cruz, 2020). Las citocinas son proteínas importantes en la señalización celular ya que funcionan como agentes inmunomoduladores. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las quimiocinas, interleucinas, linfoquinas, factores de necrosis tumoral e interferones (Zabetakis et al., 2019).

Además de su posible función como citocina, se ha descrito que ISG15 puede ser un marcador de tumores crítico, ya que es un factor secretado en el microambiente tumoral (Tecalco-Cruz, 2020). En estudios de adenocarcinoma ductal pancreático, la ISG15 es secretado por macrófagos asociados a tumores, provocando el aumento del fenotipo de las células cancerígenas (Tecalco-Cruz, 2020). Igualmente, en células de melanoma, ISG15 libre es identificado normalmente en el medio extracelular al igual que en carcinoma de células escamosas del esófago, donde su nivel aumenta en el plasma de los pacientes (Kim et al., 2016; Radoshevich et al., 2015). En cáncer de mama, ISG15 libre estimula la infiltración de células NK, provocando una disminución en el crecimiento de la tumoración (Durfee et al., 2010). Estos ejemplos permiten visualizar la complejidad que tiene ISG15 libre, ya que dependiendo del tipo de cáncer tiene implicaciones diferentes.

## **4.2 ISGilación de proteínas**

Aunque la ISG15 se encuentra de manera libre, también podemos encontrarla asociada covalentemente a proteínas blanco, mediante una modificación postraducciona conocida como ISGilación. Al igual que la ubiquitina, ISG15 tiene en su dominio carboxilo terminal un motivo con la secuencia LEU-ARG-LEU-ARG-GLY-GLY, que le permite interactuar covalentemente con los residuos de lisina de sus proteínas blanco (Narasimhan et al., 2005), como se observa en la Figura 1. Esta unión es posible a través de un sistema de 3 enzimas que sucede de una

manera similar a la UB de proteínas (Malakhov et al., 2003). La enzima E1 es la encargada de la activación, la enzima E2 hace la conjugación de ISG15 para que la enzima E3 ligue a ISG15 con otras proteínas. La activación es un proceso dependiente de energía, lo que significa que requiere ATP; E1 utiliza el ATP para catalizar la formación de un enlace tioéster entre ISG15 y esta enzima a través de un residuo de glicina de ISG15. Después, se transfiere ISG15 a la enzima E2 por medio de una transesterificación y finalmente E3 cataliza la unión covalente con las proteínas objetivo formando un enlace isopeptídico (Malakhov et al., 2003). Hasta el momento se conocen pocas enzimas involucradas durante el proceso de ISGilación, en comparación con la ubiquitina. Por ejemplo, para la E1 se conoce solo la enzima proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UBE1L por sus siglas en inglés *Ubiquitin-activating enzyme E1-like protein*), para la E2 se ha documentado a la enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UBCH8 por sus siglas en inglés *Ubiquitin-Conjugating enzyme H8*) y para la E3 se conocen 3 enzimas: la enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 5 (HERC5 por sus siglas en inglés *HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5*), la enzima homóloga humana de drosophila Ariadne (HHARI por sus siglas en inglés *Human Homolog of drosophila Ariadne*) y la enzima proteína dedo sensible al estrógeno (EFP por sus siglas en inglés *Estrogen-responsive Finger Protein*) (Tecalco-Cruz, 2020). Dentro de éstas, se ha demostrado que EFP es la única enzima E3 ligasa tanto para la ISG15 como por la ubiquitina (Zhang & Zhang, 2011). En la Figura 2. se muestran la secuencia y los enlaces que se forman durante el proceso de ISGilación.

La ISGilación de proteínas es una modificación reversible. La enzima peptidasa específica de ubiquitina 18 (USP18 por sus siglas en inglés *Ubiquitin-Specific Petpidase 18*) es responsable de la separación de ISG15 de las proteínas blanco (desISGilación) (Zhang & Zhang, 2011).

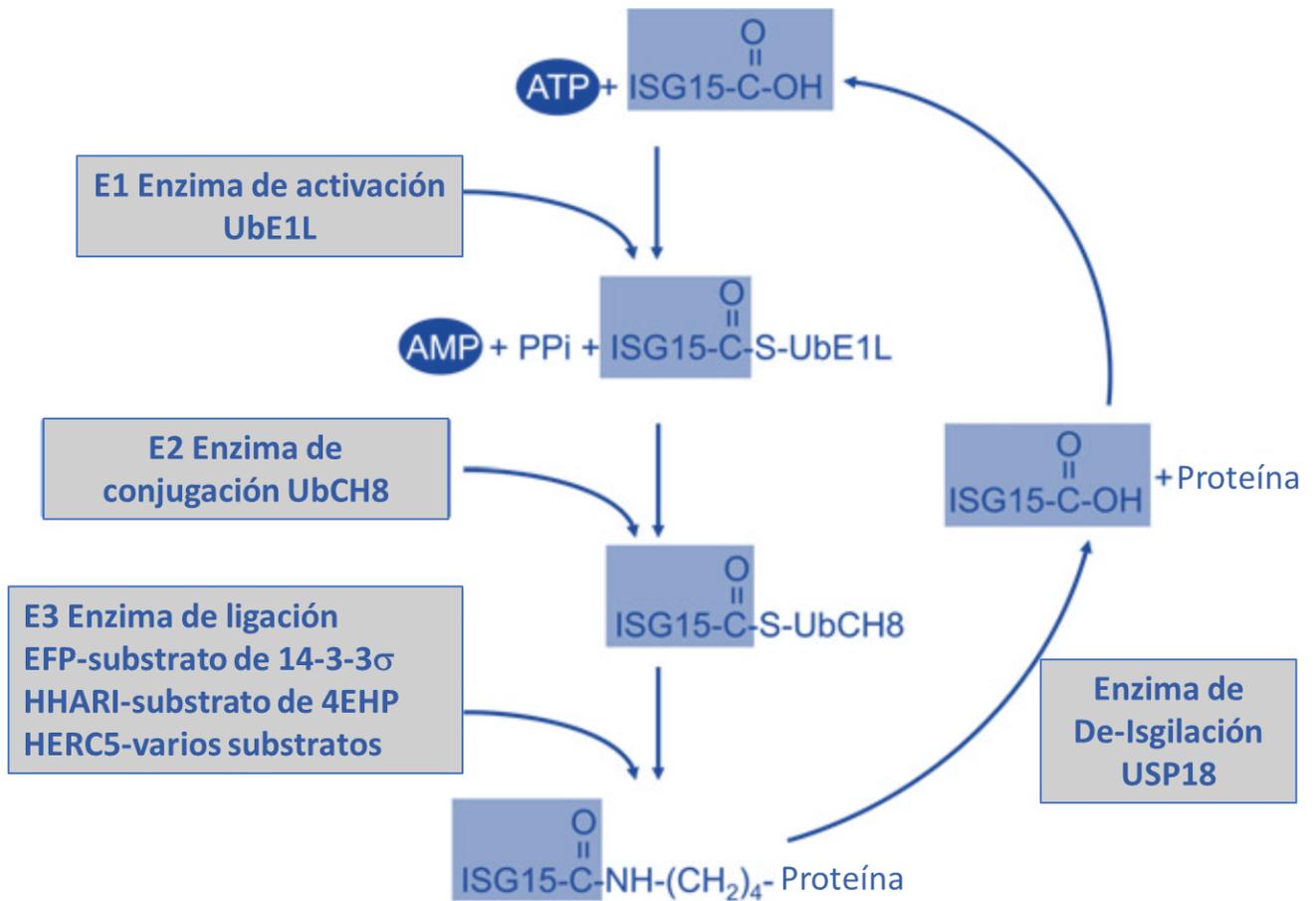


Figura 2. **Mecanismo de ISGilación y desISGilación.** Tomado y modificado de (Zhang & Zhang, 2011). Proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UbE1L) cataliza la adenilación y luego forma un enlace tioéster con el dominio C-terminal de ISG15. La ISG15 activada se transfiere a la enzima de conjugación de ISG15, enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UbCH8). ISG15 y UbCH8 se unen también mediante un enlace tioéster. Con la ayuda de la enzima de ligación de ISG15, E3, el dominio C-terminal de ISG15 se conjuga al grupo amino de la lisina del sustrato. La proteasa específica de ubiquitina 18 (USP18) retira a ISG15 del sustrato.

### 4.3 Expresión de *ISG15*

La expresión de *ISG15* es inducida por varias vías de señalización, pero la más reconocida es la de las citocinas, específicamente, los interferones (IFN). Los interferones se dividen en 3 grupos: tipo I, tipo II y tipo III. De estos, los interferones tipo I (IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ ) tienen una relación directa en la producción de ISG15 en diferentes tipos celulares (Tecalco-Cruz, 2020), mientras que los interferones tipo II (IFN  $\gamma$ ),

parecen inducir la expresión de *ISG15* en dependencia al tipo de célula (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017). Cabe destacar que los IFN  $\alpha$  y  $\beta$ , no sólo son promotores de la expresión de *ISG15*, sino también de la ISGilación al aumentar la expresión de los genes que codifican a las enzimas involucradas en el sistema de ISGilación, ya que estos genes tienen promotores con receptores sensibles a estas moléculas (Bogunovic et al., 2012; Dastur et al., 2006; Okumura et al., 2007; Wong et al., 2006; Zhao et al., 2004; Zhou et al., 2017; Zou & Zhang, 2006).

A pesar de que los interferones fueron de las primeras proteínas que se identificaron que provocan el aumento en la expresión de *ISG15*, hay otros agentes que inducen su expresión como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  en inglés *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), lipopolisacáridos (LPS), interleucina1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ), el factor de transcripción relacionado con la miocardina A (MRTF-A- (en inglés *Myocardin-Related Transcription Factor-A*) y Factor de respuesta sérico (SRF en inglés *Serum Response Factor*), y el ácido transretinoico en contextos celulares específicos (Ashley et al., 2010; Chairatvit et al., 2012; Guo et al., 2010; Hermann et al., 2016; Lertsooksawat et al., 2019; Malakhova et al., 2002). Sin embargo, también se han descrito vías moleculares que inhiben su expresión, como es el caso de los andrógenos en células de próstata y el factor similar a Kruppel 9 (KLF9 por sus siglas en inglés *Kruppel-Like Factor 9*) en cáncer colorrectal (Tecalco-Cruz, 2020).

La *ISG15* también incrementa su expresión con el estímulo de la luz UV y la hipoxia (Park et al., 2014), lo que sugiere un papel para esta proteína durante el daño genético. Además durante daño en el ADN, el *gen de la proteína tumoral p53 (p53)*, necesario durante el ciclo celular, la reparación celular o la apoptosis (Mendoza-Rodríguez & Cerbón, 2001), induce la expresión de *ISG15* (Park et al., 2016).

Otro de los escenarios en los que *ISG15* aumenta su expresión se da durante infecciones virales, como el ébola y en infecciones bacterianas, como es el caso de la infección con *Listeria monocitogenes*, esto se ha observado en diferentes organismos como ratones y humanos (Kim et al., 2016; Radoshevich et al., 2015). Lo que en conjunto sugiere que *ISG15* se expresa como respuesta inmune a infecciones.

Por otra parte, también se ha informado que la expresión de *ISG15* es regulada por microRNAs, pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (RNA en inglés *Ribonucleic Acid*) no codificante que regulan la expresión de una gran cantidad de genes en procesos celulares complejos (Bartel, 2004). Los miRNAs: miR-138, miR-370 y miR-2909, se han relacionado con la expresión de *ISG15* en células cancerígenas, se ha encontrado que los primeros dos disminuyen sus niveles mientras que los últimos, la aumentan de manera indirecta al inhibir la expresión de otra proteína que regula la expresión de *ISG15* (Ayub & Kaul, 2017; Tecalco-Cruz, 2020; Zhang et al., 2017). Lo que podría significar que *ISG15* está involucrada en varios procesos complejos que son modulados por estos miRNAs.

En la Tabla 2 se presenta los escenarios patológicos en donde se ha encontrado que *ISG15* aumenta su expresión y en cuáles se ve disminuida, en donde resalta que el enfoque de estudio de esta proteína ha sido el cáncer.

**Tabla 2. Expresión de la proteína gen estimulado por interferón 15 (*ISG15*) en humanos.**

Expresión de <i>ISG15</i>	Contexto celular	Moléculas involucradas	Referencia
Activada	Varios	IFN $\alpha, \beta$	Tecalco-Cruz 2020.
Activada	Cáncer de mama	IFN $\gamma$	Tecalco Cruz & Mejía-Barreto, 2017
Inhibida	Carcinoma escamoso y pulmonar	TNF- $\alpha$	Chairatvit et al., 2012
Activada	Fibroblastos uterinos humanos, explantes deciduales murinos	IL1- $\beta$	Ashley et al., 2010
Activada	Cáncer de mama	MRTF-A / SRF	Hermann et al., 2016
Activada	Células con Leucemia	RA	Guo et al., 2010
Inhibida	Cáncer colorrectal	KLF9	Tecalco-Cruz, 2020
Activada	Daño en ADN		Park et al., 2014,2016
Activada	Infecciones virales	No aplica	Kim et al., 2016

Expresión de ISG15	Contexto celular	Moléculas involucradas	Referencia
Activada	Infecciones bacterianas	No aplica	Radoshevich et al., 2015
Inhibida	Células de cáncer de próstata	Andrógenos	Tecalco-Cruz, 2020

#### 4.4 Implicaciones biológicas de la ISGilación

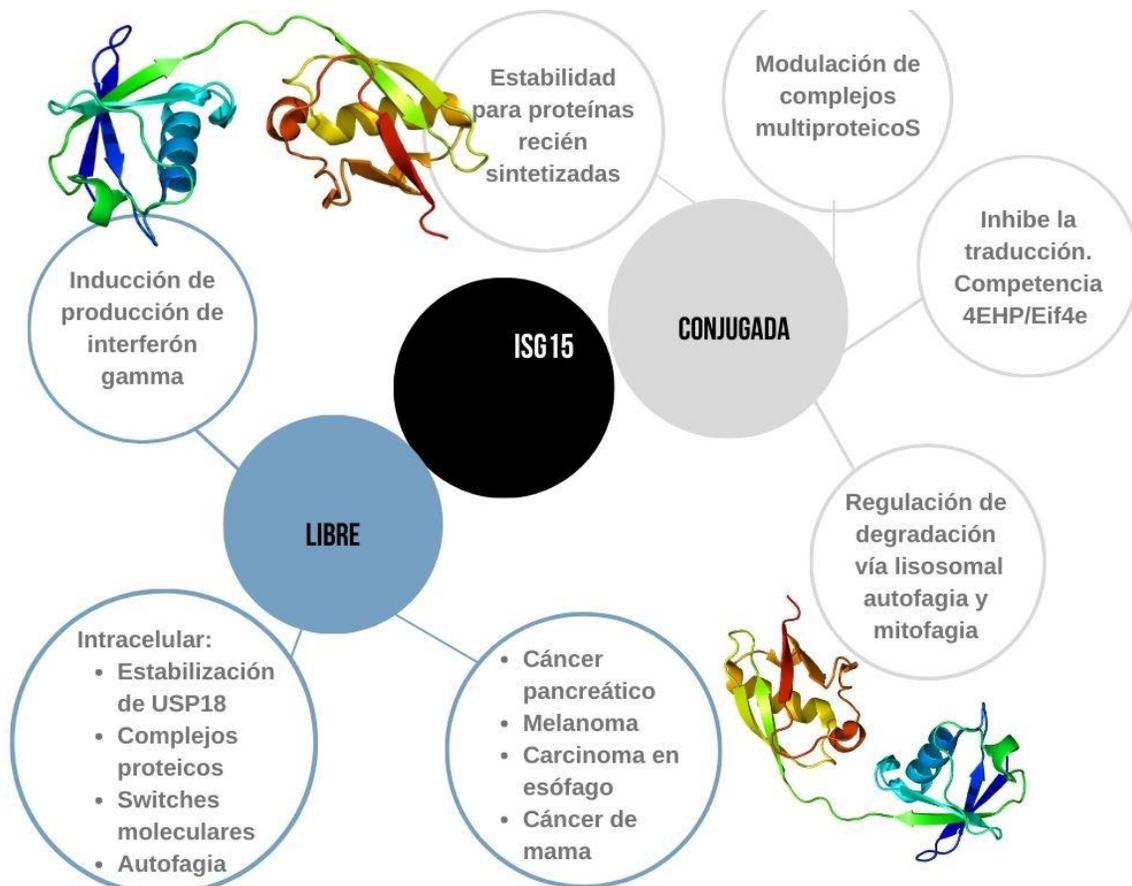
La modificación postraducciona ISGilación, afecta las propiedades de las proteínas a las que se conjuga ISG15. A continuación vamos a puntualizar cuáles son las implicaciones que se han identificado en ciertos blancos de ISGilación.

Se ha sugerido que la ISGilación de proteínas recién sintetizadas es relevante para la respuesta inmune contra los patógenos (Durfee et al., 2010). Por ejemplo, proteínas que están conjugadas a la puomicina, proteína que induce la terminación prematura de la traducción, son blanco de ISG15 para ser modificadas, vía ISGilación y permitir la traducción, lo que previene la formación de partículas virales (Spinnenhirn et al., 2017).

En cuanto a interacciones entre proteínas, se ha propuesto que la ISGilación modula los complejos multiproteicos, como en el caso de Filamin B, proteína que conecta los filamentos de actina a la membrana celular, permite la señalización de la cinasa c-Jun N-terminal (*JNK en inglés June N-terminal Kinase*), cinasa que está asociada a la inducción de la apoptosis. La ISGilación de Filamin B interrumpe su interacción con las proteínas sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras (RAC1 en inglés *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), MAPK/ERK cinasa cinasa 1 (MEKK1 *MAPK/ERK Kinase Kinase 1*) y proteína cinasa cinasa 4 activada por mitógenos (MKK4 *Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4*), inhibiendo la señalización de JNK lo que previene la apoptosis por esta vía (Jeon et al., 2009). Además, la ISGilación de la proteína homóloga de EIF4E (4EHP), a través de la enzima de ligación de ISG15, HHARI, promueve la unión de esta proteína a la estructura 5'cap del mRNA. La estructura 5'cap es importante para el mRNA ya que bloquea su degradación y asiste al ribosoma para iniciar la traducción. 4EHP compete con el factor de iniciación de traslación eucarótico 4E (EIF4E ),

promoviendo así la inhibición de la traducción de los mRNA a los que se une 4EHP (Okumura et al., 2007). Esta capacidad puede estar asociada a la propiedad que tiene ISG15 durante infecciones virales para detener la replicación de los virus (Okumura et al., 2007).

También se ha descrito que la ISGilación modifica la degradación vía lisosomal. La ISGilación aumenta la degradación de los cuerpos proteicos multivesiculares (Villarroya-Beltri et al., 2016) o la inhibe como el ejemplo del oncogén *Kirsten-Ras* en células de cáncer de mama, en este caso la proteína que codifica el gen es ISGilada lo que va a impedir su degradación vía lisosomal (Burks et al., 2014). También parece tener importantes efectos para inhibir la secreción exosomal (Villarroya-Beltri et al., 2016) y regular la función y degradación de la mitocondria, como es el caso de los macrófagos, cuando no tienen el gen *ISG15* presentan una disminución mitofágica (Baldanta et al., 2017). Con respecto a la autofagia, se ha encontrado un aumento de esta misma cuando ISG15 se conjuga con proteínas esenciales para este proceso, como lo son p62 y HDAC6, este proceso sucede de manera dependiente a la señalización de los interferones en condiciones de estrés (Nakashima et al., 2015). Sin embargo, hay otros estudios que demuestran lo contrario, esto es que la ISG15 disminuye este mecanismo, como se da el caso en las células de cáncer de esófago. Además, se ha encontrado que ISG15 compite con la ubiquitina en los mismos substratos de LYS de BECN1, proteína primordial para la iniciación de la autofagia, deteniendo el proceso autofágico (Falvey et al., 2017; Xu et al., 2015). No se tiene aún definido qué es lo que provoca estas diferencias en los distintos escenarios. En forma de recapitulación, en la Figura 3 se describen las implicaciones que se han observado para ISG15/ISGilación.



**Figura 3. Ejemplos de las implicaciones biológicas de la ISG15 libre y la proteína estimulada por interferón 15 (ISG15) libre.** La ISG15 libre se propone como un mecanismo antagónico a la ubiquitinación, sin embargo, también puede inducir la degradación de proteínas mal plegadas, modular procesos de autofagia y mitofagia, inhibir la traducción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) mediante la modulación de la competencia de factores de traducción proteína homóloga de EIF4E (4EHP) y factor de iniciación de traslación eucariótico 4e (EIF4E). Modificar las interacciones proteína-proteína de algunos componentes del citoesqueleto como la filamina B. La proteína ISG15 libre puede localizarse en el espacio extracelular e intracelular. ISG15 libre intracelular interactúa con proteasa específica de ubiquitina (USP18) para evitar su degradación, pero también puede promover la degradación vía autofagia de algunas proteínas. De manera extracelular, ISG15 actúa como una citocina que estimula la producción de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en las células natural killer (NK), promoviendo la filtración de NK al tumor. En contraste, ISG15 libre extracelular también parece estimular la migración de células de carcinoma oral, e incrementar el fenotipo de células madre de cáncer en el adenocarcinoma ductal pancreático. Todas las acciones asociadas a ISG15 libre y la ISG15 conjugada parecen depender del contexto celular.

Las implicaciones de ISG15 en diferentes funciones celulares, revela la importancia que tiene esta proteína en diferentes procesos. Al recorrer los distintos escenarios en donde se expresa *ISG15* y las implicaciones comentadas anteriormente durante distintas patologías, se abre la posibilidad de indagar en otro tipo de patologías como las enfermedades neurológicas. Dentro de este tipo de enfermedades existe una relación directa con la disfunción en la mitofagia, la autofagia e inflamación (Martinez-Vicente, 2017; Ruz et al., 2020). Debido a la posible implicación de la ISG15 en estos procesos, en este trabajo abordamos los estudios y observaciones que se han descrito acerca de esta proteína y su relación con el SNC.

## 5. Capítulo 2

### 5.1 ISG15 y el sistema de ISGilación y su posible implicación en algunas enfermedades del cerebro.

Las enfermedades neurológicas en 2016 fueron la causa principal de años de vida ajustados por discapacidad (DALYS por sus siglas en inglés Disability-Adjusted Life Years) y la segunda causa de muerte al ser responsables del 16.5 % del total global (Feigin et al., 2019). A continuación, se describen algunas enfermedades neurológicas tales como: la ataxia-telangiectasia, isquemia, depresión y esclerosis lateral amiotrófica que se han relacionado con mecanismos moleculares asociados a ISG15 y la ISGilación de proteínas y la implicación que se ha observado cuando ISG15 está presente durante estas enfermedades neurológicas (Figura 4).

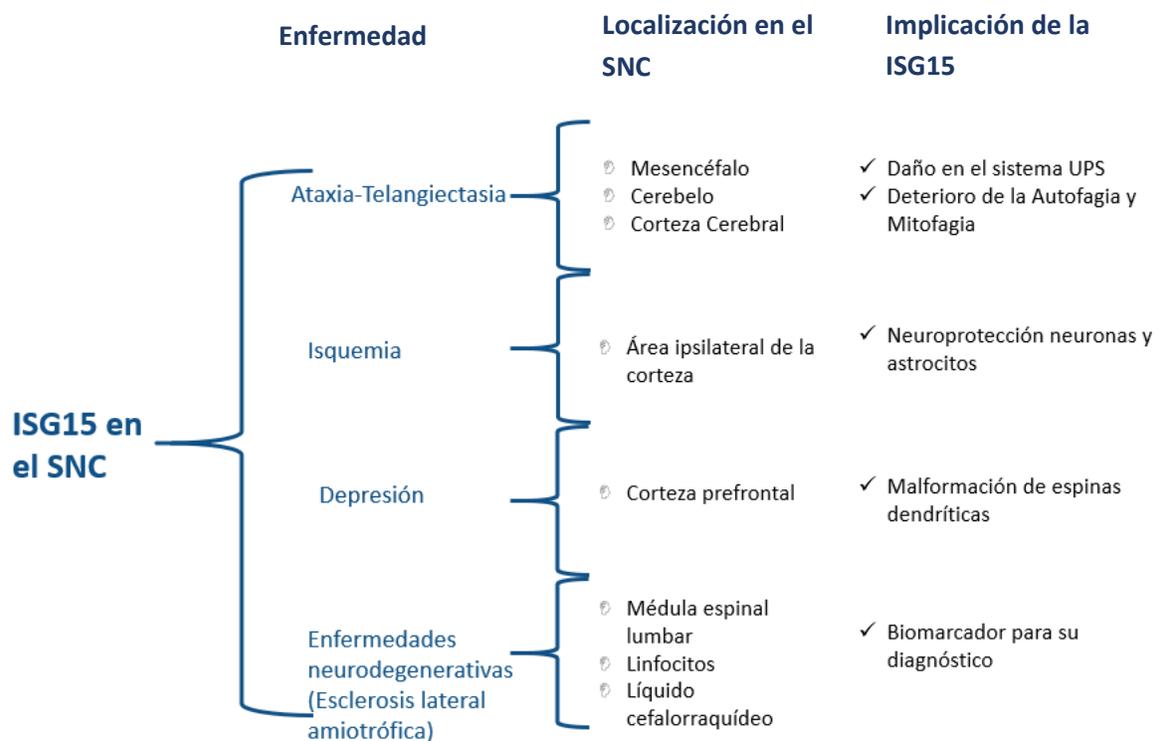


Figura 4. Información general de la relación de la proteína gen estimulado por interferón 15 (ISG15) en enfermedades neurológicas. Las 4 enfermedades neurológicas que se han relacionado con ISG15: Ataxia telangiectasia, depresión, isquemia y esclerosis lateral amiotrófica. En la localización en el sistema nervioso central (SNC) se representa el lugar en donde los niveles de ISG15 aumentaron y también se encuentran las implicaciones que se le atribuyen a este incremento.

## 5.2 Isquemia

La isquemia es la deficiencia de sangre en un tejido causado por la constricción u obstrucción de los vasos sanguíneos y resulta en una falta de oxígeno en el tejido (Kandel et al., 2013). El cerebro es particularmente vulnerable a la isquemia debido a su alta demanda de oxígeno y sus bajas reservas de energía. Normalmente esta deficiencia de oxígeno provoca un daño en las funciones neurológicas, cuando es lo suficientemente severo y prolongado resulta en un infarto (W. Yang et al., 2016). Durante la isquemia se genera una cascada de señalizaciones que siguen bajo estudio. Uno de los modelos que se utilizan para extrapolar lo que sucede durante la isquemia es comparar los estados de hibernación o letargo de algunos animales, como las ardillas, para poder identificar qué procesos se activan durante este estado. En el letargo, la temperatura del cuerpo disminuye y existe un bajo flujo sanguíneo al cerebro, condición similar a lo que sucede durante la isquemia, sin embargo, no existe muerte neuronal como en la isquemia (W. Yang et al., 2016). En ardillas hibernando se encontró un incremento considerable de la modificación postraducciona SUMOilación, que es parecida a la ubiquitinación e ISGilación (Lee et al., 2007). La SUMOilación es la unión de una proteína conocida como pequeña modificadora similar a la ubiquitina (SUMO por sus siglas en inglés *Small Ubiquitin Like Modifier*), proteína con estructura similar a la ubiquitina, a otras proteínas de manera covalente (W. Yang et al., 2016). No sólo se identificó esta proteína durante el letargo, sino que también al aplicar temperaturas hipotérmicas a ardillas, se produjo una acumulación de conjugados proteicos de SUMO2 y SUMO3 en sus cerebros (Wang et al., 2012a; Yang et al., 2009) lo que indica que no es necesario llegar a un estado de letargo para que se exprese esta proteína en el cerebro. Lo anterior sugiere que las células *in vivo* tienen la capacidad de activar rápidamente el mecanismo por la que los SUMOs se expresan y así aumentar la neuroprotección durante estados hipotérmicos (Wang et al., 2012a).

También se ha identificado la SUMOilación de proteínas en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. SHSY5Y es una sublínea celular clonada de la línea parental SK-N-SH que derivó de una biopsia de tumor óseo metastásico (Kovalevich & Langford, 2013), la cuál es utilizada para estudio de las funciones

neuronales *in vitro*. Cuando existe una privación de oxígeno/glucosa en condiciones de hipotermia, se produce un incremento general de la SUMOilación (W. Yang et al., 2016), lo que significa que en células humanas también se encuentra desarrollada esta respuesta a la falta de oxígeno.

Se han hecho pruebas con ratones induciendo una isquemia cerebral transitoria focalizada aplicando una oclusión de la arteria media cerebral (MCAO por sus siglas en inglés *Middle Cerebral Artery Occlusion*), se encontró un aumento de conjugación de proteínas con las SUMO2 y SUMO3 en las neuronas que se encuentran en el borde del tejido que suministra la arteria media cerebral (Cimarosti et al., 2012; Datwyler et al., 2011). La respuesta de SUMOilación se ha propuesto como un mecanismo protector en las neuronas, no sólo por la elevada SUMOilación en condiciones isquémicas, sino porque también, al inducir una MCAO, se inhibe la expresión de *SUMO2* y *SUMO3* a través de RNA interferente y se incrementó la muerte celular (Cimarosti et al., 2012; Datwyler et al., 2011; Lee et al., 2009; Lee et al., 2007; Lee et al., 2011). En ratones transgénicos de *Ubc9*, enzima de conjugación de las SUMOs, se observó un aumento de la SUMOilación de proteínas y presentaron menor daño neuronal en el cerebro después de la MCAO (Lee et al., 2011), lo que suma a la propuesta de la SUMOilación como un mecanismo protector.

Los estudios mencionados anteriormente aumentaron la atención en diferentes proteínas similares a la ubiquitina, como es la proteína ISG15. La SUMOilación e ISGilación son activadas como respuesta a los interferones durante la presencia de patógenos virales, además SUMO3 activa la ISGilación dependiente de interferón en esta misma condición (El-Asmi, et al., 2020). El estudio de la ISG15 en este contexto no es tan amplio como en el caso de las SUMOs, sin embargo, se han encontrado altos niveles de ISGilación en ratones con una una MCAO, igual que la SUMOilación, por lo que la evaluación de sus implicaciones durante la isquemia ya se ha iniciado (Nakka et al., 2011). El grupo de investigación de Nakka (2011) utilizó ratones a los que se les realizó una MCAO, sus resultados registraron un aumento de ISGilación en el área de la corteza del cerebro donde se aplicó la oclusión (ipsilateral). Contrario a esto, no se detectó un aumento de ISGilación en el área

contralateral (Nakka et al., 2011). Es importante mencionar que no se encontraron cambios significativos en los niveles de ISG15 libre entre el área ipsilateral y contralateral. Esto indica que la ISGilación sólo aumenta en las áreas donde hay daño y los niveles que aumentan de síntesis de esta proteína terminan uniéndose covalentemente con otras, por eso aumenta la ISGilación pero no aumenta el nivel de ISG15 libre.

En ese mismo estudio los autores determinaron por inmunohistoquímica, que la localización de ISG15 es la misma que NeuN y GFAP, que son marcadores de neuronas y astrocitos respectivamente, lo que sugiere que la ISGilación se puede llevar a cabo en ambos tipos de células (Nakka et al., 2011).

Por otra parte, en un estudio *in vivo*, se encontró que cuando se induce una MCAO hay un infarto exacerbado en ratones knockout (KO) para ISG15 e ISGilación en comparación a los ratones wild type (Nakka et al., 2011). Esto sugiere que en las neuronas es necesaria la producción de ISG15 para protegerse durante un episodio isquémico y al no contar con ISG15, se obtiene un daño celular elevado. Para evaluar de manera funcional las implicaciones de la falta de ISG15 e ISGilación, se aplicaron pruebas neurológicas a los ratones como la prueba de remover el adhesivo, el rotarod y la viga de equilibrio. La prueba de remover el adhesivo evalúa las deficiencias sensoriales y motoras al cuantificar el tiempo en que el ratón tarda en remover adhesivos (1cmx1cm) colocados en cada una de sus patas. El rotarod es una prueba donde se evalúa la coordinación y el aprendizaje motor. La prueba consiste en colocar al ratón en un rodillo para que el animal se sujete en este, el rodillo se mueve a una cierta velocidad y se mide el tiempo que se mantiene el ratón en el rodillo. La viga de equilibrio evalúa la coordinación motora fina midiendo la capacidad de los ratones en sostenerse y desplazarse en esta viga (Nakka et al., 2011).

Para cuantificar y comparar el daño neurológico presente en los ratones, se utilizó una escala modificada de severidad neurológica, con una puntuación del 0 al 4. En donde 0 es sin daño neurológico aparente y 4 es daño neurológico grave. Las evaluaciones en los ratones dieron como resultado: déficit neurológico muy severo

( $3.12 \pm 0.53$ ) para ratones ISG15<sup>-/-</sup> (ratones que no expresan el gen de *ISG15*) no se pudieron realizar las pruebas debido al grave daño neurológico en ratones UBE1L<sup>-/-</sup> (ratones que no expresan el gen *UBE1L*), enzima de activación del sistema de ISGilación necesaria para la iniciación de este sistema (Nakka et al., 2011). Por su parte, el grupo de los ratones wild type obtuvo una calificación de déficit neurológico leve ( $1.67 \pm 0.36$ ), por lo que los resultados de los ratones transgénicos fueron muy inferiores en comparación con los ratones wild type. Esto indica que la ISGilación de proteínas podría ser un mecanismo endógeno neuroprotector (Nakka et al., 2011) similar a la SUMOilación y que además tiene una enorme importancia en la realización de diversas tareas.

### 5.3 Depresión

Otra de las enfermedades neurológicas que se ha empezado a relacionar con ISG15 es la depresión. Algunos estudios han propuesto que hay una relación entre este trastorno y la neuroinflamación, al encontrar en zonas periféricas al cerebro (plasma y líquido cefalorraquídeo) niveles elevados de citocinas y quimiocinas en sujetos con trastornos depresivos (Barnes et al., 2017; Köhler et al., 2018; Mechawar & Savitz, 2016; Wohleb et al., 2016). El trastorno depresivo mayor (MDD, por sus siglas en inglés) es un trastorno de comportamiento que puede llegar a afectar a la persona de manera psicológica, biológica, genética y social (Chiriță et al., 2015).

A nivel molecular algunos estudios han identificado en pacientes con MDD algunos genes que regulan las respuestas inflamatorias, los cuales se expresan en una manera variable en diferentes zonas del cerebro. Por ejemplo, en la corteza prefrontal dorsolateral, se encontró el aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas con carácter inflamatorio como el gen del *receptor de la familia del factor de necrosis tumoral 11B* (*TNFRSF11B* por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor Family Receptor 11B*), *interferón  $\alpha 6$*  (*IFNA6*), *receptor de interferón  $\alpha 1$*  (*IFNAR1*) y *Proteína de unión a GATA 1* (*GATA1*), siendo esta última un factor de transcripción represor que se une al promotor de la interleucina-6 (IL-6), una citocina inflamatoria (Hyo et al., 2007; Kang et al., 2012). Mientras que en la

parte ventrolateral de la corteza prefrontal disminuyen los niveles de citocinas tales como interferón  $\gamma$  y  $TNF-\alpha$ , elementos esenciales en las respuestas inflamatorias (Clark et al., 2016). Además, en esta región en particular se encontró un decremento del nivel de metabolitos de la ruta de quinurenina. La quinurenina es el punto de partida para la síntesis de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), molécula esencial para la fosforilación oxidativa y producción de ATP durante el metabolismo en mamíferos. La disminución en la producción de NAD lidera a la activación del sistema inmune y a la potencial acumulación de compuestos neurotóxicos ya que es necesario para regular las reacciones redox que suceden en la mitocondria (Davis & Liu, 2015). Por lo que se observan diferentes perfiles de expresión de genes dependiendo la zona en la que se esté evaluando el cerebro con MDD pero ambas respuestas tienen relación con la inflamación.

Pandey et al (2012,2014) encontraron que los cambios que se observan en el cerebro con MDD no sólo dependen de las zonas evaluadas, sino que también de los genes que se activan, por ejemplo, en la corteza prefrontal de adolescentes víctimas de suicidio. La expresión de proteínas y mRNA de citocinas interleucinas *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *TNF- $\alpha$*  se incrementó significativamente en comparación con otros sujetos control. Así mismo, los niveles de mRNA y proteínas de los receptores tipo *Toll* (*TLR3* Y *TLR4*) esenciales para la producción de cinasas que incrementan la expresión de citocinas, quimiocinas e interferones, también aumentaron. Los resultados anteriores sugieren una activación de la respuesta inmune por daño neuronal en los casos estudiados de víctimas de suicidio (Pandey et al., 2012, 2014). Esto puede implicar que a medida que se desarrolla el MDD las células sufren cambios en la expresión de genes.

Para poder desarrollar un entendimiento más acertado y encontrar los mecanismos implicados en la expresión de los diversos genes, Mahajan (2018) utilizó una secuenciación de RNA, RNAseq (por sus siglas en inglés *RNA Sequencing*) del giro dentado del hipocampo en pacientes con MDD. Esta región es vital para la neurogénesis y la conectividad funcional con el sistema límbico (Mahajan et al., 2018). A este sistema se le atribuye el relacionar la información que recibe el cerebro con las emociones, consolidar la memoria, formar motivaciones de comportamiento,

además de regular las funciones autónomas y endocrinas (Stephani, 2014). De los 600,000 transcritos que se obtuvieron de los diferentes pacientes (23 con MDD y 23 sujetos control) sólo 30 fueron lo suficientemente diferenciales en el MDD. Se encontraron genes con funciones de citocinas como el *CCL2/MCP1*. Poder encontrar mecanismos que expliquen la expresión de citocinas es esencial para la elaboración de nuevos tratamientos, ya que los existentes que se centran en la inhibición de los sistemas de captura de serotonina o norepinefrina logran una total remisión en los pacientes menor al 50% (Mahajan et al., 2018).

También encontraron genes que reducen su expresión que codifican a proteínas involucradas en funciones inflamatorias como es el caso de *IFI44L*, *IFI6*, *NR4A1/Nur-77*, así como *ISG15* (Mahajan et al., 2018). Identificar la función conjunta de estos genes es complejo, ya que cada uno tiene distintos mecanismos que puedan al final sobreponerse o no, por lo que el apoyo de una herramienta de análisis funcional de genes fue necesario. Específicamente se utilizó la herramienta *Ingenuity Pathway Analysis* (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>). Esta herramienta permite el análisis de la expresión de genes e identifica cuáles son los procesos biológicos, redes moleculares, vías de señalización y metabólicas que se activan o desactivan. Los autores utilizaron esta herramienta para reducir el sesgo provocado por la información recopilada anteriormente y verificar cuáles son las moléculas y mecanismos que se modifican durante la depresión (Mahajan et al., 2018). Con esta herramienta se identificó un aumento en las rutas de señalización relacionadas con la inflamación y expresión de interferones. Se observó un incremento en la señalización para la expresión de citocinas y de la ruta de las cinasas ERK/MAPK; estas cinasas son primordiales para procesos celulares básicos como lo son la proliferación celular y diferenciación celular, cuando este mecanismo está activado de manera aberrante se ha encontrado que puede causar inflamación, cáncer, trastornos del desarrollo y neurológicos (Guo et al., 2020). Se confirmó así la relevancia que tiene la neuroinflamación durante el MDD.

*ISG15* está relacionado con la respuesta inflamatoria y se identificó dentro de los genes que se modifican durante el MDD, sin embargo, uno de los limitantes de este

estudio es que no se reconocieron las células que están siendo afectadas, ya que se utilizó el tejido completo del giro dentado del hipocampo. Identificar cómo es que está afectando la expresión de *ISG15* al desarrollo en el giro dentado del hipocampo, podría ser indispensable ya que permitiría proponer nuevas técnicas terapéuticas para las personas que sufren esta enfermedad debido a las características que parece tener *ISG15* en procesos intracelulares.

Además de la inflamación, también el daño a dendritas se ha considerado una de las características de la depresión ya que muchos de los pacientes diagnosticados con MDD presentan una pérdida de dendritas (Kaufmann & Moser, 2000; Kulkarni & Firestein, 2012; Ott et al., 2012). Un estudio en ratas, utilizando un modelo de depresión inducida por la activación inmune materna (MIA por sus siglas en inglés *Maternal Immune Activation*), encontró una correlación del desarrollo dendrítico de las neuronas en el cerebro con la expresión de *ISG15* (Hu et al., 2019). Para entender el modelo utilizado con la MIA, es necesario considerar que diversos estudios epidemiológicos indican que infecciones bacterianas o virales maternas durante el embarazo incrementan el riesgo de desarrollar varios trastornos psiquiátricos en la descendencia como la depresión, la esquizofrenia y el autismo (Atladóttir et al., 2010; Brown, 2012) por lo que la MIA ha sido sugerida como una conexión crítica entre la infección prenatal y el déficit del comportamiento postnatal. La MIA induce una numerosa cantidad de citocinas pro y anti inflamatorias, como es el caso de IL-1 $\beta$ , IL-6, la quimiocina con motivo C-X-C de ligando 9 (CXCL9 por sus siglas en inglés Chemokine C-X-C motif ligand 9), TNF- $\alpha$  e IL-10, que pueden vincularse a la contribución de las anomalías inducidas por esta activación inmune en la descendencia (Gilmore et al., 2004).

Para identificar los efectos de cómo la MIA afecta a las ratas se les inyectó polinosínico: ácido policitídílico (poly I:C), un inmunoestimulante que estructuralmente es parecido al RNA con doble cadena y tiene como característica el mimetizar la respuesta generada por la MIA en ratas gestantes (Meyer & Feldon, 2012). Los resultados obtenidos mostraron que las crías de las ratas infectadas con poly (I:C) tienen un decrecimiento en la longitud y densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal (Hu et al., 2019). Las espinas dendríticas son

unidades integrativas del SNC, son protuberancias neuronales que reciben señales de una sinapsis; contienen receptores para neurotransmisores, organelos y sistemas de señalización esencial para la función sináptica y plasticidad neuronal (Kandel et al., 2013); se relacionan con cambios en la eficacia sináptica, el aprendizaje y la memoria entre otros procesos cognitivos (Hu et al., 2019). Por lo tanto, la modificación en el número y organización de las espinas dendríticas durante este estudio confirma la relación que tienen las dendritas con el comportamiento depresivo de las ratas, como se observó en las pruebas psicológicas de las ratas descendientes de aquellas madres a las que se les inyectó poly (I:C).

El cambio que sufrieron las dendritas plantea un escenario en el cual su regulación está siendo mermada en alguna parte de su desarrollo, lo que ocasiona un comportamiento depresivo en las ratas. Uno de los genes relacionados es el gen *de la proteína relacionada con RAS Rap-2a (Rap2A)* que interfiere negativamente con el crecimiento y arborización de las neuritas, que son proyecciones de las neuronas (Kawabe et al., 2010). De los mecanismos conocidos para contrarrestar el efecto negativo del *Rap2A* sobre las dendritas es la ubiquitinación de la proteína que codifica mediante la E3 ligasa conocida como célula precursora neural expresada proteína regulada negativamente en el desarrollo 4 (NEDD4 en inglés *Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4*) (Drinjakovic et al., 2010; Kawabe et al., 2010) y en un escenario de decaimiento de dendritas, la ISGilación podría ser una antagonista a esta ubiquitinación. En las ratas descendientes de las madres con poly (I:C) los niveles de ISG15 aumentaron en varios órganos como el cerebro, pulmones, riñón, hígado, bazo y corazón (Hu et al., 2019). Sin embargo, en el cerebro los niveles fueron significativamente altos, específicamente en la corteza y tronco encefálico, mientras que en el hipocampo no se observó gran cantidad de ISG15 (Hu et al., 2019). Dentro de la corteza y tronco encefálico, las células que presentaron los niveles elevados de ISG15 e ISGilación fueron las neuronas, específicamente en el cuerpo de la neurona y las dendritas (Hu et al., 2019). Lo que significa que ISG15 podría estar involucrada directamente en esta deficiencia en el desarrollo neuronal.

Las ratas gestantes infectadas con poly (I:C) también presentaron un incremento significativo de ISG15 en el suero de la matriz después de 28-32 semanas de gestación en comparación con las ratas control (Hu et al., 2019). De igual manera, las ratas recién nacidas de madres tratadas con poly (I:C) tuvieron un incremento de proteína ISG15 y su correspondiente mRNA 24 horas después del nacimiento, en contraste con las crías de las madres control. Después de 1 mes, se analizaron los cerebros de estas ratas para observar el desarrollo que tuvo el cerebro utilizando análisis de Golgi. Este análisis se utiliza para estudiar la morfología de las neuronas mediante tinción y está basada en una reacción que forma agregados metálicos en las neuronas (Sivaguru et al., 2019). Se encontró una reducción de la longitud basal de las dendritas basales y apicales y de la densidad de las espinas dendríticas en las ratas descendientes de las madres con poly (I:C). Durante las pruebas psicológicas hechas para evaluar el comportamiento de las ratas, como la preferencia a la sacarosa, nado forzado y la prueba de campo abierto, obtuvieron promedios inferiores a las ratas control, por lo que se confirmó que el poly (I:C) a través de un incremento en los niveles de ISG15, provoca comportamientos postnatales similares a la depresión en ratas (Hu et al., 2019).

Con estos datos como referencia, se compararon los cambios que sufrían las ratas cuando se sobre expresaba o disminuía la expresión de *ISG15*, buscando qué implicaciones podría tener en el desarrollo del cerebro (Hu et al., 2019). Una importante reducción en el número de ramificaciones secundarias en las dendritas y menor longitud fueron los efectos encontrados cuando se sobre expresó la *ISG15*. También estas ratas mostraron un comportamiento depresivo en las pruebas psicológicas, lo que sugiere que los altos niveles de esta proteína mimetizan las características que induce la MIA en los descendientes. Cuando se silenció *ISG15* en las ratas inyectados con poly(I:C) se observó la aminoración de los efectos de decrecimiento en las dendritas y los resultados de las pruebas neurológicas fueron más cercanos a los del grupo control después de un mes de nacimiento. La morfología de las dendritas es primordial en la neuroplasticidad del cerebro, ya que son parte indispensable en la comunicación entre neuronas (Hu et al., 2019). *ISG15* parece alterar la neuroplasticidad al afectar la estructura de las dendritas y conducir

a problemas como la depresión asociada a la MIA. Dentro de las neuronas no se encontró gran modificación en los axones a comparación de las observaciones ya mencionadas en las dendritas (Hu et al., 2019).

El desarrollo de las neuritas está relacionado directamente con la ubiquitinación y su correspondiente enzima de ligación E3, NEDD4 (Kawabe et al., 2010). Al medir la cantidad de NEDD4, se encontró una reducción de sus niveles de mRNA y proteína en las células de las ratas con sobre expresión de *ISG15*. Esto sugiere que existe una relación entre los niveles de *ISG15* y la disminución de la expresión de *NEDD4*. Al utilizar la técnica de coimmunoprecipitación, se detectó la interacción entre NEDD4 con *ISG15*, lo que podría conducir a la disminución de interacción de NEDD4 con Rap2A, inhibiendo su ubiquitinación. Lo anterior explica porque las dendritas tienen un menor crecimiento en las ratas a los que se les sobre expresó *ISG15* ya que inhibe la interacción de la ubiquitina con Rap2A al competir con la ubiquitina por la enzima de ligación NEDD4, como se observa en la Figura 5, lo que permite que Rap2A active diferentes cascadas de señalización, inhibiendo así el desarrollo dendrítico. Al infectar a las células a las que se les sobre expresó *ISG15* con NEDD4 para aumentar los niveles de esta enzima, se observó una recuperación en la formación de las dendritas, por lo que se puede combatir la competencia que tiene *ISG15* con la ubiquitina (Hu et al., 2019).

*ISG15* está presente durante el MDD, principalmente parece inducir la inflamación que se observa durante este trastorno. Sin embargo, no sólo se encuentra implicado en esta función inmune, sino que se puede observar que sus niveles están afectando el desarrollo en el cerebro de ratas. Se vuelve una proteína de interés, debido a estas dos características que son marcas del MDD. Por lo que el entendimiento de los mecanismos por los que *ISG15* se está liberando e interactuando con otras proteínas pudiesen vincular a *ISG15* como un blanco

terapéutico o como herramienta para la identificación de otros blancos que estén involucrados en los procesos que se desarrollan durante el MDD.

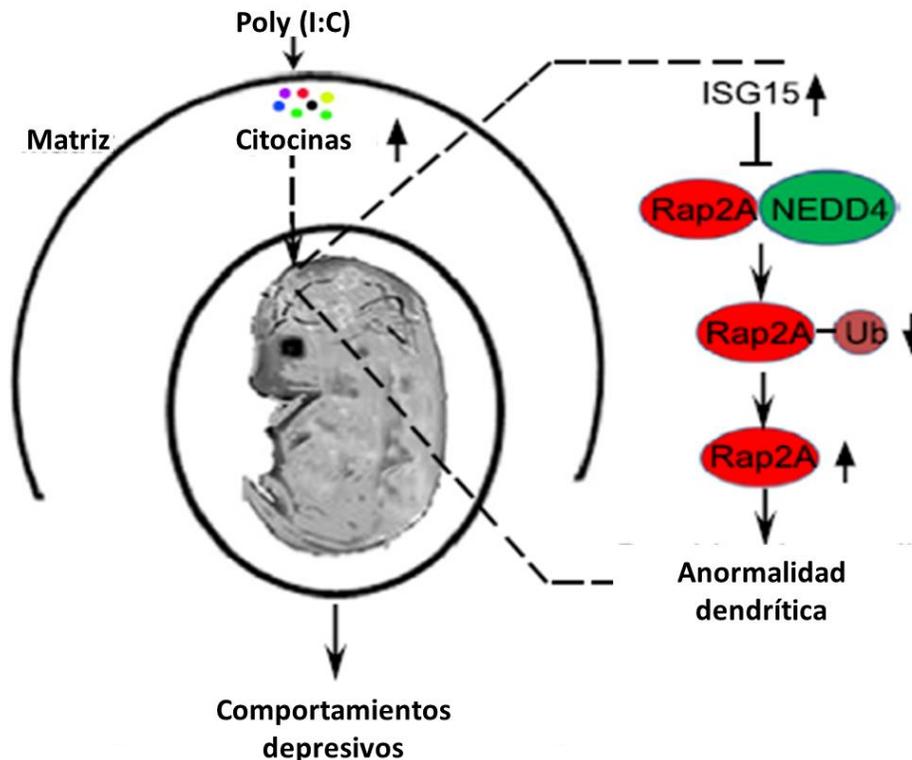


Figura 5. **Mecanismo de acción de la enzima célula precursora neural expresada (NEDD4) sobre la proteína asociada a RAS (RAP2A).** Modificado de (Hu et al., 2019). Durante la activación inmune materna (MIA), las citocinas elevadas en la matriz estimulan la expresión de *ISG15* en el cerebro fetal, que a su vez interrumpe la asociación de NEDD4 y Rap2A que conduce a la ubiquitinación de Rap2A. La elevación de Rap2A por el bloqueo de su ubiquitinación impide el desarrollo de dendritas e induce comportamientos depresivos en las crías.

#### 5.4 Ataxia-Telangiectasia

La Ataxia Telangiectasia (A-T) es una rara enfermedad hereditaria que afecta principalmente al sistema nervioso y al sistema inmunológico, guarda algunas características similares con otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y la Esclerosis lateral amiotrófica, como la acumulación de proteínas y defectos en procesos mitocondriales (Juncker et al., 2021). Las causas de esta enfermedad se atribuyen a mutaciones del gen Ataxia telangiectasia mutado

(*ATM*). El gen *ATM* codifica a una proteína cinasa conocida por activarse cuando hay daño en el ADN, fosforila proteínas clave para el control del ciclo celular y la reparación del ADN (Matsuoka et al., 2007).

Los síntomas de esta enfermedad son venas faciales pronunciadas, infecciones sinopulmonares recurrentes y movimientos descoordinados provocados por la disfunción neuronal progresiva. Además, los pacientes con A-T tienen un mayor riesgo de contraer cáncer y tienen una sensibilidad aumentada a la radiación (Desai et al., 2013), una característica atribuida a la desactivación del gen *ATM* (Lavin et al., 2004).

Un estudio encontró en las células con A-T una acumulación de proteínas ubiquitinadas (Desai et al., 2013). Esto es de interés, ya que al haber tantas proteínas ubiquitinadas, se asocia con una disparidad en el proceso de degradación proteica por el sistema UPS, el mayor mecanismo proteolítico celular que se conoce para la degradación de proteínas de vida corta o anormales en células mamíferas (Ciechanover, 2005). Otra vía importante para la degradación de proteínas ubiquitinadas es la autofagia; consiste en una degradación de componentes citoplasmáticos como son proteínas viejas, complejos macromoleculares y organelos defectuosos (Klionsky & Emr, 2000) a través de los lisosomas. Este proceso se lleva a cabo formando una vacuola autofágica que envuelve el material a degradar y lo transporta hacia la periferia del núcleo, donde se concentran los lisosomas, para que las hidrolasas rompan los enlaces peptídicos de las proteínas al interior de la vacuola y la célula pueda utilizar los aminoácidos obtenidos de esta hidrólisis (Klionsky & Emr, 2000). La autofagia es un paso esencial para distintos procesos como lo son: respuesta a la inanición e hipoxia, gluconeogénesis, producción de energía, síntesis de nuevas proteínas y movilización de nutrientes durante el desarrollo (Mizushima, 2007).

Estos dos mecanismos de degradación se complementan cuando existen condiciones donde el proteosoma es disfuncional, lo que resulta en que la autofagia degrada los agregados proteicos que contienen ubiquitina (Pandey et al., 2007; Rubinsztein, 2007). Con base en lo anterior, Shyamal Desai y su equipo (2013)

encontraron relación entre el aumento de la autofagia en las células de A-T y el mecanismo de ISGilación de proteínas. Como sujeto de estudio utilizaron células de fibroblastos llamados FT169A (A-T), que son derivados de pacientes con A-T con el gen *ATM* depletado, y FT169A (ATM+) en donde el gen *ATM* fue reconstituido en las células FT169A (A-T) al hacer una transfección del cDNA *ATM*. Para identificar el estado en qué se encontraba la autofagia, utilizaron la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (LC3 en inglés microtubule-associated protein light chain 3), que es una de las proteínas esenciales para la formación de las membranas en las vacuolas autofágicas, como se puede observar en la Figura 6. Debido a esta característica, se reconoce como un marcador para detectar la inducción de la autofagia en células (Kabeya et al., 2000; Klionsky et al., 2008; Tanida et al., 2004). Mediante ensayos de inmunofluorescencia se evaluó la presencia de la proteína LC3 en las células de A-T y ATM+; se observó que las células A-T presentaban un mayor nivel de LC3, así como un aumento de autofagosomas y autofagolisosomas comparado con las células ATM+, sugiriendo un incremento del proceso de autofagia en las células A-T. Además, se depletó la expresión de *ISG15* en las células A-T, lo que condujo a una reducción en la producción de autofagosomas, lisosomas y autofagolisosomas (Desai et al., 2013).

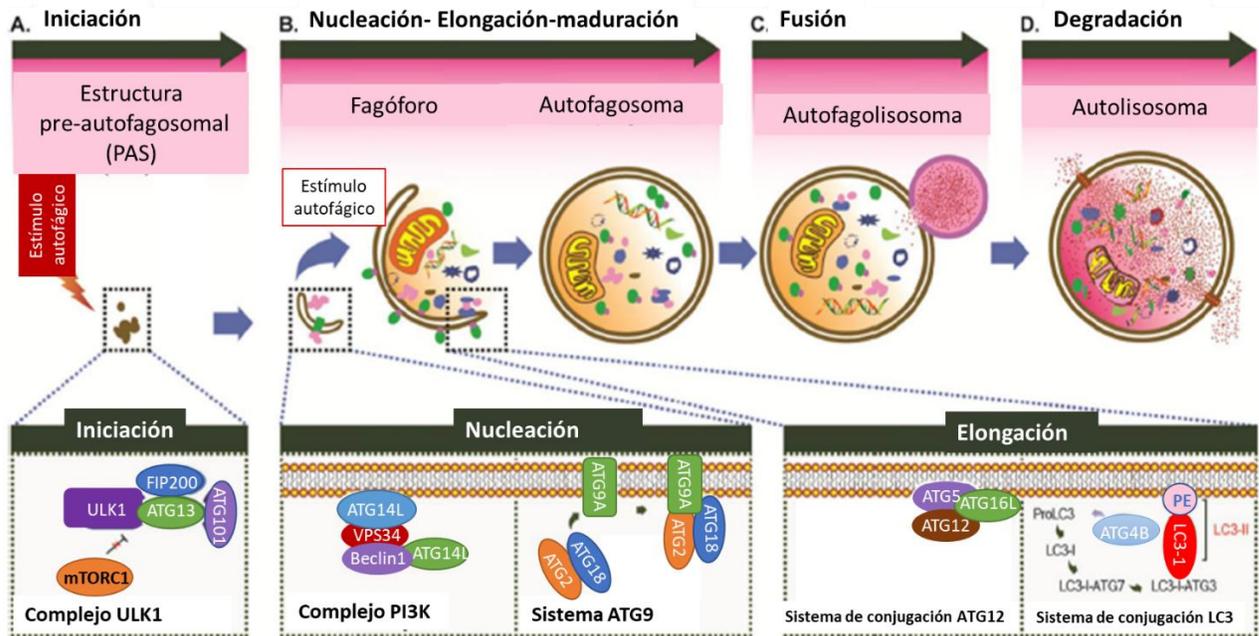


Figura 6. **Mecanismo de autofagia y proteínas esenciales para su iniciación.** Modificado de (Li et al., 2020). Una parte del citoplasma, incluidos los orgánulos, está encerrada por un fagóforo o membrana de aislamiento para formar un autofagosoma. La proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (LC3) se une con el fosfatidiletanolamina (PE por sus siglas en inglés Phosphatidylethanolamine) durante el proceso de elongación, formando el complejo LC3-II. Posteriormente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el endosoma y luego con el lisosoma, y el material interno se degrada. En la levadura, los autofagosomas se generan a partir de la estructura pre-autofagosomal (PAS), que aún no se ha identificado en células de mamíferos. Se indica la nomenclatura para diversas estructuras autofágicas.

En el equipo de Wood en el 2011 encontraron que cuando se inhibe a *ISG15*, se restaura la degradación de proteínas en las células A-T (Wood et al., 2011). Monitorearon el grado de degradación de las proteínas poliubiquitinadas en las líneas celulares FT169A (A-T) y FT169A (ATM+) con el tratamiento del inhibidor de síntesis de proteínas, la ciclohexamida. Encontraron que después de 6 horas de la aplicación de la ciclohexamida, las células ATM+ presentaron una degradación evidente de las proteínas poliubiquitinadas, mientras que las células A-T no mostraron un cambio en la cantidad de proteínas poliubiquitinadas en el análisis Western Blot (WB), indicando una deficiencia en la degradación vía el UPS, y

sugiriendo que en las células A-T los sistemas de degradación de proteínas marcadas por cadenas de ubiquitina son defectuosos.

Una de las características de la ubiquitina y sus 7 residuos de lisina, en las posiciones (6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63), es que permiten formar cadenas de ubiquitina que inicien en cualquiera de estas posiciones (Ikeda & Dikic, 2008). El sistema UPS tiene como blanco aquellas proteínas que forman sus cadenas de ubiquitina a través de la LYS 48 (Ikeda & Dikic, 2008) mientras que la ubiquitinación de LYS 63 se relaciona con el proceso autofágico (Ikeda & Dikic, 2008). Las proteínas poliubiquitinadas con base en la LYS 48 de la ubiquitina se degradaron en las células ATM, pero no en las A-T, sin una degradación significativa en aquellas proteínas marcadas por cadenas formadas a través de la LYS 63 de la ubiquitina, lo que permite inferir que la ruta por la que se están degradando las proteínas es la UPS y no por la vía autofágica en células ATM. En contraste, en las células A-T, el UPS es el mecanismo deficiente que permite la acumulación de proteínas (Wood et al., 2011). La abundancia de ISG15 y la ISGilación es más elevada en las células A-T comparada con las células ATM+. La implicación que tiene el nivel de ISG15 en las células A-T se estudió con pequeño RNA interferentes (siRNAs) de *ISG15* y *UbcH8*, para disminuir la expresión de *ISG15* y de la enzima de conjugación E2 de la ISGilación. Las células A-T con siRNA *ISG15* y *UbcH8* mostraron un mayor nivel de proteínas poliubiquitinadas y una mayor degradación que en las células control. Por lo tanto, la disminución de la expresión de *ISG15* y la reducción de los niveles de ISGilación contribuyen a la restauración de la vía de degradación UPS en las células A-T. (Wood et al., 2011)

Además, en muestras del cerebro de ratones KO *ATM*, se registró un aumento de ISG15 libre y conjugado en el cerebelo y la corteza cerebral, en comparación con ratones silvestres (Wood et al., 2011). La localización general de ISG15 y sus conjugados fue en los astrocitos de los ratones KO *ATM*. Con respecto a seres humanos, se identificó en el mesencéfalo de 4 personas con A-T *post-mortem* una mayor presencia de la proteína ISG15 comparado con otras muestras de personas sin A-T. (Wood et al., 2011). ISG15 se encontró en la misma localización que proteínas poliubiquitinadas sobre su LYS 63, por lo que, en seres humanos, ISG15

podría tener más implicaciones aún desconocidas provocadas por la formación de una estructura compleja con la ubiquitina y los sustratos de la ubiquitina. En otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y el Huntington se ha encontrado la unión covalente de la ubiquitina a través de LYS 63 (Paine et al., 2009), son importantes todos estos resultados ya que podría estar comportándose de una manera similar la ISG15 en otras enfermedades neurodegenerativas.

Otro de los mecanismos deficientes durante las enfermedades neurodegenerativas y en la A-T es la mitofagia (Martinez-Vicente, 2017) y se ha encontrado una nueva función de ISG15 y la ISG15 durante este proceso (Juncker et al., 2021). La mitofagia es un tipo de autofagia que se refiere a la degradación de la mitocondria y se ha demostrado que se lleva en conjunto con el mecanismo de ubiquitinación (Chan et al., 2011b; Chan & Chan, 2011a; Dupuis, 2014; Durcan & Fon, 2015; Glauser et al., 2011; Nguyen et al., 2016). La mitocondria es el organelo primordial para la generación de energía en la célula. Utiliza la energía de la reducción molecular del  $O_2$  a agua para crear ATP, que es la molécula energética por excelencia. Sin embargo, la reducción del oxígeno molecular no es un mecanismo perfecto, por lo que se pueden generar subproductos como el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo o aniones superóxido ( $O_2^-$ ). Estos subproductos se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sabharwal & Schumacker, 2014). Bajos niveles de ROS significan estabilidad en las funciones fisiológicas (Sena & Chandel, 2012). Sin embargo, si hay un incremento en los niveles de estos subproductos, existe un daño oxidativo en las proteínas celulares y el ADN, perjudicando las funciones celulares lo que resulta en apoptosis (Baldanta et al., 2017; Gao et al., 2008).

En las células con A-T, se ha encontrado una acumulación de mitocondria en la zona perinuclear, que es el lugar donde se encuentran los lisosomas y ahí se debería estar degradando la mitocondria (Valentin-Vega et al., 2012), por lo que al incrementarse la cantidad de mitocondrias en esta zona se entiende que existe una deficiencia mitofágica. En las células A-T con *ISG15* depletado se observó una

reducción en la cantidad de mitocondria acumulada, sugiriendo una restauración del proceso mitofágico.

La mitocondria necesita posicionarse en la periferia del núcleo para empezar el proceso mitofágico y una de las modificaciones involucradas es la SUMOilación de proteínas membranales de la mitocondria como son las mitofusinas (Mfns) 1 y 2 (Juncker et al., 2021). La mitocondria es conducida al área perinuclear, en donde se necesitan ubiquitinar las mitofusinas para dar paso a la formación de un complejo entre LC3-Ubiquitina-Sumo2 que desarrolla estructuras compactas similares a agresomas (Juncker et al., 2021). El tratamiento con el agente químico carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) activa la mitofagia de las células FT169A (A-T) con un incremento en los niveles de ISGilación y en los niveles de las Mfns, ubiquitina y SUMO2/3 (Juncker et al., 2021). En contraste con las células A-T, las células A-T con la expresión de *ISG15* silenciada, tuvieron una disminución en los niveles de las Mfns, ubiquitina y SUMOs. El incremento de *ISG15* impide la degradación de la mitocondria, provocando el aumento de las especies reactivas de oxígeno en la célula. Cuando *ISG15* no está presente se observa la reducción de la mitocondria acumulada en la zona perinuclear (Juncker et al., 2021). *ISG15* se asocia al complejo LC3-ubiquitina-Sumo2, bloqueando su actividad e inhibiendo la mitofagia (Juncker et al., 2021).

En resumen, en la A-T existe una acumulación de proteínas en el cerebro, que parece ser promovida por la alta expresión de *ISG15* y la ISGilación de proteínas, esta última actuando de manera antagónica al sistema UPS. Sin embargo, bajo la condición de A-T, se detecta una autofagia activa relacionada a *ISG15*/ISGilación. También durante esta enfermedad, *ISG15* inhibe la mitofagia.

## 6. Capítulo 3

### 6.1 Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento

Las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades que dañan la integridad de las neuronas y producen una degeneración progresiva de las mismas. La predisposición característica a sus efectos es la edad, siendo las personas mayores de 60 años las más expuestas a padecerlas. Dentro de esta categoría se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Feigin et al., 2019). En la Figura 7 se observa el incremento de la incidencia, prevalencia y muertes de estas enfermedades, siendo para el 2019 un total de 2 millones de defunciones por esta causa, un 3.45% del total global (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2021a). La prevalencia nos indica el total de personas que sufren la enfermedad mientras que la incidencia son los nuevos casos que se presentan. De los 50 millones de personas padeciendo demencia, el 70% está constituido por la EA, que se estima tiene un costo social del 1.1% del PIB mundial (World Health Organization, 2020). En México durante el 2019, estas enfermedades representaron aproximadamente el 8% de las causas de muerte en personas mayores de 70 años (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2021b). La EA, es el responsable del 60%-70% del total de demencias, lo que la convierte en la enfermedad neurodegenerativa más abundante en el mundo (World Health Organization, 2020). En segundo lugar, se encuentra la EP con una población estimada en el 2016 de 6.1 millones de afectados (Dorsey et al., 2018). Enseguida está la ELA que es la enfermedad neuro-motora más común en la edad adulta (Sánchez-Torres et al., 2020).

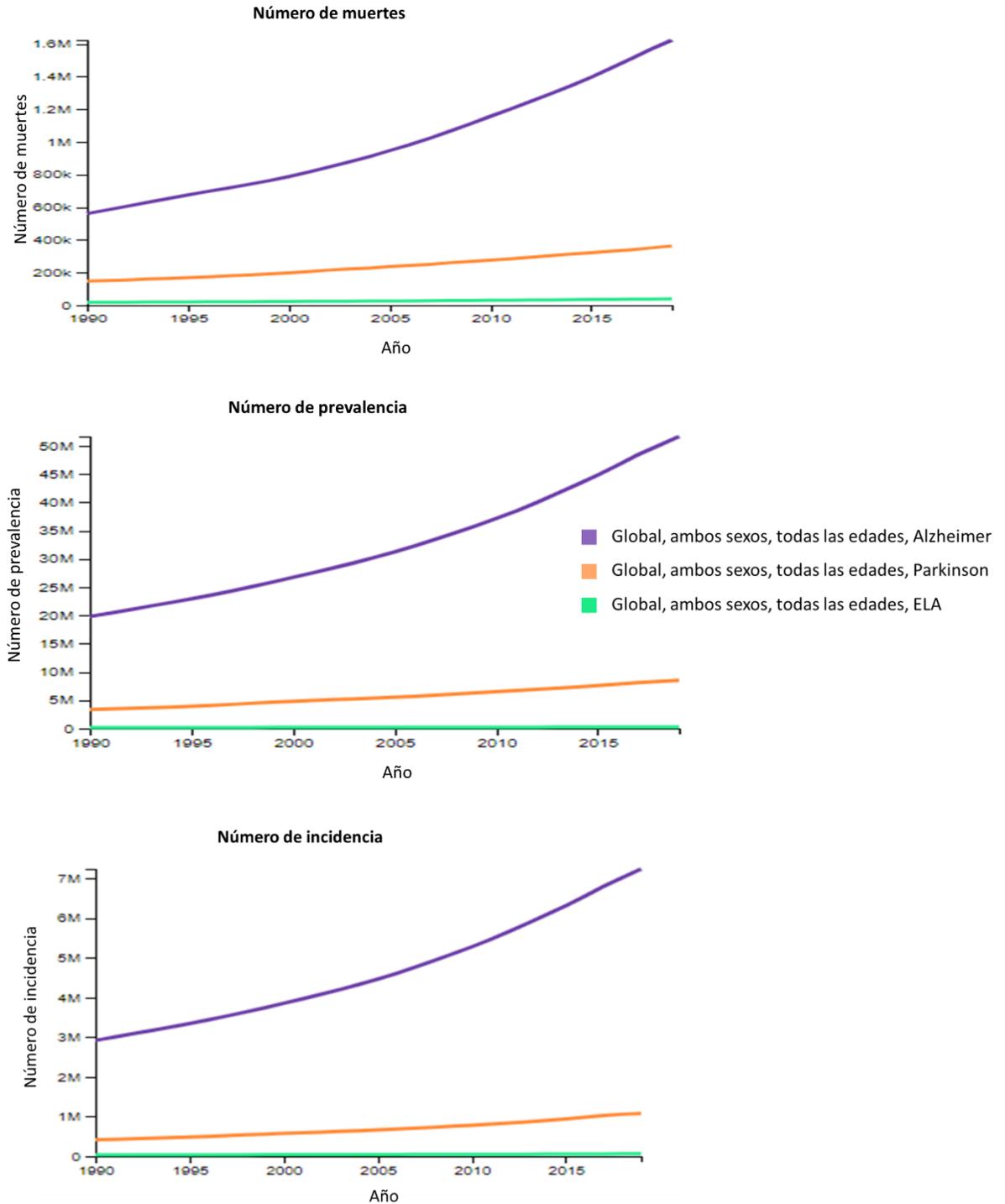


Figura 7. **Número de muertes, incidencia y prevalencia de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica en el mundo.** Modificado de (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2021a). Se

presenta el número de personas afectadas por las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el mundo.

Tomando en cuenta que no existe cura o tratamiento que evite el progreso de las enfermedades neurodegenerativas, es indispensable la investigación y desarrollo de nuevas técnicas para afrontarlas y disminuir la carga que implican a la sociedad.

De todas las enfermedades neurodegenerativas, la ELA, se ha relacionado molecularmente con ISG15, como se describe a continuación.

## **6.2 ISG15 como un posible biomarcador para la esclerosis lateral amiotrófica**

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa esporádica y genética, que afecta a las motoneuronas que se encuentran principalmente en la médula espinal, lo que provoca una pérdida en el control de los músculos y de los movimientos voluntarios (Schwartzenburg et al., 2019). Sin embargo, el 90% de los casos recaen en la clase esporádica, presentándose en promedio a la edad de los 55 años (Schwartzenburg et al., 2019). Actualmente, se han encontrado altos niveles de ISG15 en esta enfermedad en muestras de la médula espinal de pacientes con ELA (Schwartzenburg et al., 2019; Wang et al., 2012b).

Un importante grupo de estudio para entender la ELA son los veteranos militares ya que se tiene registro que el 60% de ellos tienen mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad (Weisskopf et al., 2005), además, los veteranos que sufrieron una lesión cerebral traumática (TBI) durante su vida, tienen un aumento en el riesgo de padecer esta neuropatología (Weisskopf et al., 2005), sin embargo, no existe aún una explicación a este fenómeno.

El equipo de Schwartzenburg (2019) evaluó los niveles de ISG15 y la ISGilación en la médula espinal lumbar de veteranos que presentaron un historial de TBI/ELA y ELA. Al medir la cantidad de ISG15 presente en estas células, mediante WB, encontraron una mayor cantidad de esta proteína conjugada en los individuos con TBI/ELA que en los controles. De manera similar, se encontró un incremento de la ISGilación de aquellos con ELA en relación con los individuos control

(Schwartzenburg et al., 2019). Estos datos sugieren que la ISG15 conecta al TBI y la ELA, pero hasta el momento sólo se encuentra la distinción que en veteranos con TBI/ELA resulta común encontrar perfiles de ISGilación elevados (Schwartzenburg et al., 2019).

También, se encontró en los linfocitos de pacientes con ELA provocada por la mutación del gen *C9orf72*, un incremento en la ISGilación de proteínas. Las mutaciones en este gen son la causa genética más común conocida para la ELA; Sin embargo, los mecanismos por los que actúa ISG15 no son conocidos (Schwartzenburg et al., 2019).

La propuesta de este grupo es que ISG15 podría servir como un biomarcador de la ELA porque se pueden observar niveles elevados de proteínas ISGiladas de manera recurrente en los pacientes. Además, se ha observado que la acumulación de ISG15 está acompañada por un aumento de la ubiquitinación de proteínas en el líquido cefalorraquídeo aproximadamente 4 veces mayor en los individuos con TBI/ELA en comparación con aquellos que no tenían historial de TBI (Schwartzenburg et al., 2019). Lo que podría significar que ISG15 está interfiriendo también en la ELA con el proceso de degradación de proteínas. ISG15 podría ser un posible biomarcador para la ELA, siempre y cuando estén en consideración los fenotipos físicos e historial médico de los pacientes, para el correcto diagnóstico de la enfermedad ya que *ISG15* también es expresado durante el cáncer y algunas células infectadas por patógenos (Schwartzenburg et al., 2019).

### **6.3 Mitocondria y mitofagia en enfermedades neurodegenerativas**

Con base en los datos revisados de ISG15 y su asociación con la A-T y ELA, es posible sugerir una interesante relación con otras enfermedades neurodegenerativas. A pesar de que cada una de estas enfermedades tienen implicaciones clínicas distintas, guardan ciertas características en común, como la pérdida de proteostasis, aglomerados de proteínas en áreas específicas del SNC, daño mitocondrial y desregulación en el mecanismo de degradación de proteínas, cómo podemos observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de algunas enfermedades neurodegenerativas. Modificado de (Ruz et al., 2020).

Enfermedad neurodegenerativa	Proteínas acumuladas	Estructura IDR Proteica	Localización	Toxicidad
Esclerosis lateral amiotrófica	TPD-43	Dominio C-terminal	Agregado citoplasmático	Proteínas relacionadas con la separación de mRNA y metabolismo de RNA afectadas
				Inhibición global de síntesis de proteínas
				Daño mitocondrial
				Mecanismo defectuoso de autofagia lisosomal
				Daño en el mecanismo de endocitosis
				iones metálicos desregulados
	FUS	Dominio N-Terminal		Afectación en el metabolismo mRNA y reparación del DNA
				Defectos en el sistema de Control de Calidad Proteico
	SOD-1	Región 22-30, 55-95 Región 121-143		Excitotoxicidad relacionada al transportador de glutamato EAAT2
				Exceso de afluencia de calcio
				Disfunción mitocondrial
				Transporte axonal comprometido
				Citotoxicidad por ROS
	ATAXIN-2	Tracto PolyQ		Especies de RNA dañadas
				Disfunción a la respuesta al estrés
	TBK-1	TBK-1		Metabolismo de RNA afectado
		Disfunción en la autofagia		

Enfermedad neurodegenerativa	Proteínas acumuladas	Estructura IDR Proteica	Localización	Toxicidad
Enfermedad de Parkinson	Synuclein- $\alpha$	Dominio C-terminal	Cuerpos de Lewy intracelulares, extracelulares y membranales	Ruptura de la integridad de la membrana plasmática Alteración sináptica Perturbación en la homeostasis de calcio Alteración en las dinámicas del citoesqueleto Sistemas de degradación de proteínas dañados Impacto lisosomal Disfunción mitocondrial e inducción de ROS Estrés en retículo endoplasmático Afectación en la transmisión de Golgi Prodecimiento modificados en la acetilación de las histonas Apoptosis
Enfermedad de Alzheimer	$\beta$ -amiloide	$\beta$ -amiloide	Placas extracelulares	Alteración en la membrana plasmática Perturbación en funciones y estructuras sinápticas Perturbación de células gliales vía el receptor mGluR5 Alteración en la homeostasis del calcio Inhibición de LTP en la región CA1 del hipocampo Disfunción del estrés oxidativo
	Tau	Dominio N-terminal	Marañas neurofibrilares intracelulares	Disfunción de telomerasa Daño mitocondrial y ROS Peroxidación lipídica Fagocitosis neuronal por microglia activada Apoptosis

Como se puede observar en estas enfermedades se han descrito defectos en el sistema UPS, en la autofagia y en la mitofagia (Bogunovic et al., 2012; Dupuis, 2014; Huang & Figueiredo-Pereira, 2010; Johri & Beal, 2012; Lin & Beal, 2006; Ross & Poirier, 2004). La ubiquitina tiene relación con estos dos procesos, porque es un marcaje para la posterior degradación por el proteosoma y se ha propuesto que es un paso esencial para la iniciación de la mitofagia (Chan et al., 2011b; Chan & Chan, 2011a; Ross et al., 2015; Rüb et al., 2017; Whitworth & Pallanck, 2009). Se vuelve intrigante buscar si ISG15 tiene alguna relación con estas fallas en los sistemas donde la ubiquitina parece no estar funcionando correctamente en las enfermedades neurodegenerativas, más aún después de los nuevos descubrimientos de la implicación de la ISG15 durante la A-T (Juncker et al., 2021).

Durante la mitofagia participan la proteína cinasa putativa inducida 1 (PINK1) y una enzima ligasa E3 de la ubiquitina, conocida como proteína de ubiquitina E3 ligasa parkin RBR (PARKIN) (Durcan & Fon, 2015; Jin & Youle, 2012; Tanaka, 2010). Cuando la mitocondria está en buen estado, PINK1 se mantiene en niveles bajos y se degrada por el proteosoma (Greene et al., 2012; Jin et al., 2010). Cuando hay un daño en la mitocondria, PINK1 es reclutado a la membrana externa de la mitocondria, fosforila a la ubiquitina provocando que la E3 ligasa PARKIN se active (Kazlauskaitė et al., 2015). PARKIN ubiquitina a diferentes proteínas mitocondriales; promoviendo la formación de cadenas fosfopoliubiquitinadas (Kane et al., 2014; Okatsu et al., 2015; Shiba-Fukushima et al., 2014), lo que activa los factores autofágicos y la degradación por el mecanismo de autofagia (Lazarou et al., 2015), como se muestra en la Figura 8.

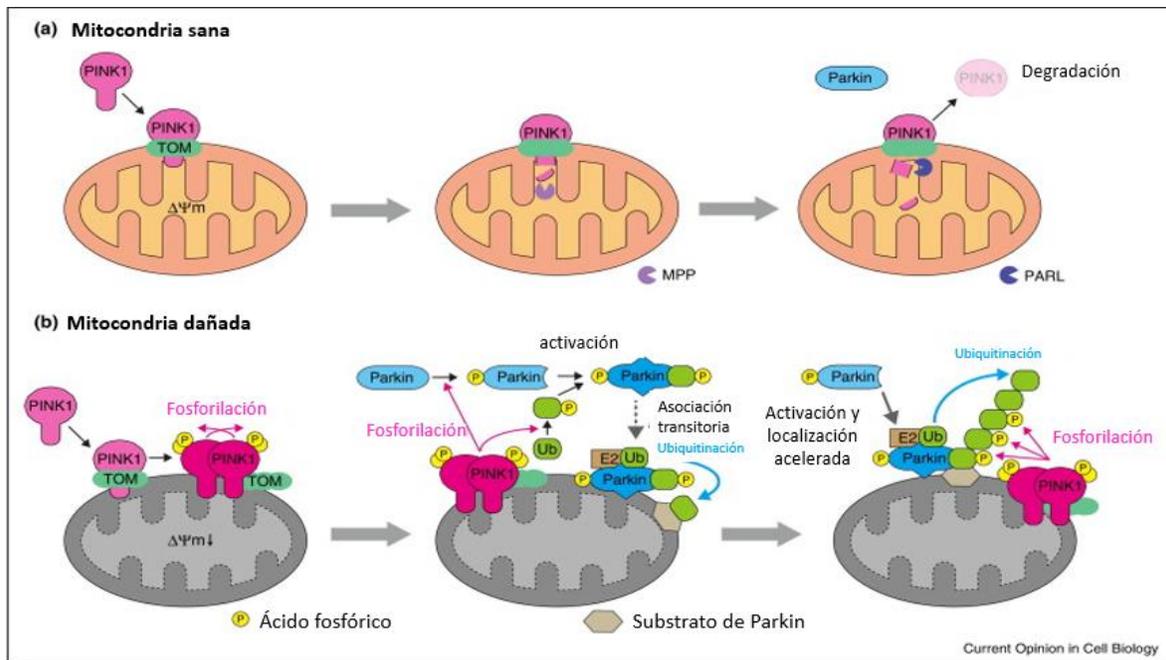


Figura 8. **Comparación de mitocondria dañada y sana.** Modificado de (Eiyama & Okamoto, 2015). Proteína cinasa putativa inducida 1 (PINK1) se degrada de manera rápida cuando la mitocondria se encuentra sana. Cuando hay daño mitocondrial, la proteína se acumula en la membrana fosforilándose, provocando la fosforilación de la ubiquitina. Esta promueve la activación de la enzima de ubiquitina E3 ligasa parkin RBR (PARKIN), formando así cadenas de ubiquitina fosforilada que son esenciales para la iniciación de la mitofagia.

La importancia de estos mecanismos y las proteínas involucradas es tan fuerte que mutaciones en los genes *PINK1* y *Parkin* se han encontrado como protagonistas en los casos de la EP hereditario; (Deas et al., 2011; Ryan et al., 2015) en donde existe acumulación en las especies reactivas de oxígeno, ya que las mitocondrias depolarizadas no se están degradando de manera correcta (Barodia et al., 2017). En la enfermedad neurodegenerativa de Huntington, hay defectos en el mecanismo de autofagia, ocasionando una acumulación de mitocondrias dañadas en el citoplasma (Martinez-Vicente et al., 2010). La acumulación de mitocondrias disfuncionales también se ha detectado en las neuronas de pacientes con la EA (Desai et al., 2018). Por otra parte, en pacientes con ELA, el daño mitocondrial se nota en rupturas de las crestas, dilución de la matriz e incremento en el número y masa de mitocondrial (Natale et al., 2015; Ruffoli et al., 2015). El proceso mitofágico,

al igual que el autofágico, es modulado por mecanismos vinculados al sistema de ubiquitinación por lo que la ISG15 podría participar en su regulación a la alta o a la baja (Desai et al., 2018). Aunque a fecha no se ha estudiado la relación de ISG15 con muchas de estas enfermedades neurodegenerativas, las funciones centrales de la degradación vía autofagia y UPS, sugieren que la ISG15 podría ser también un mecanismo molecular implicado. Cobra interés este proceso con la proteína de estudio ya que se ha identificado que PARKIN es una proteína blanco de ISG15. Se ha demostrado que PARKIN es modificada postraduccionalmente por ISG15, conduciendo a una mayor actividad de esta enzima E3-ubiquitina ligasa (Desai et al., 2018), lo que promovería aún más el mecanismo mitofágico, sin embargo, más estudios son requeridos para realmente comprender sus implicaciones durante la neurodegeneración pero sin duda se abre la puerta a la investigación de la relación que puede existir entre la ubiquitina e ISG15 durante la neurodegeneración.

## 7. Capítulo 4

### 7.1 Discusión: Implicaciones de ISG15/ISGilación en el cerebro

Aunque ISG15/ISGilación han sido mayoritariamente estudiados en infecciones y en cáncer, los estudios revisados sugieren su participación en mecanismos moleculares de neuroprotección y neurodegeneración. El enlace más marcado que se puede visualizar en estos mecanismos es la relación al parecer antagonista que presenta la ISG15 con la ubiquitina.

En las neuropatologías en donde existe la acumulación de proteínas, como el caso de EA, A-T, ELA y EP encontramos una característica fundamental, la degradación de proteínas mediada por la ubiquitina está desregulada (Ruz et al., 2020). Por ejemplo, los cerebros de pacientes con ELA y A-T, presentan una deficiencia marcada en la degradación de proteínas, sin embargo, esta acumulación parece estar acompañada de una elevación en los niveles de ISGilación, que suceda en ambas enfermedades revela la relación que pudiera existir entre las ISGilación y la ubiquitina durante la neurodegeneración al no permitir los procesos de degradación. Se añade a esto la observación de que al silenciar la expresión de *ISG15* en las células A-T se restauran las vías de degradación vía el UPS (Desai et al., 2013; Schwartzenburg et al., 2019). En las mismas células A-T, se encuentra que ISG15 bloquea también un mecanismo fundamental para la célula, la eliminación de mitocondria, promoviendo la acumulación de mitocondria dañada que es una característica que se ha observado en otras enfermedades neurodegenerativas (Johri & Beal, 2012), por lo que es posible que esta proteína esté afectándolas de manera semejante.

El comportamiento antagónico de la ISGilación por la ubiquitinación también se observa en la depresión, provocando un impacto directo en el desarrollo cerebral de las ratas, induciendo así los comportamientos depresivos (Hu et al., 2019). En este caso la ISGilación no sólo puede competir por el substrato de la ubiquitina, sino que las mismas enzimas de ubiquitinación pueden ser secuestradas por la ISG15, inhibiendo así los procesos esenciales de la ubiquitinación de proteínas.

Los datos anteriores, podrían ser evidencia de que ISG15 y la ISGilación son marcadores de problemas en el SNC, sin embargo, en la isquemia, ISG15 surge como una de las proteínas involucradas en resguardar la integridad de las neuronas y astrocitos (Nakka et al., 2011). Esto extiende el espectro de la *ISG15*, ya que no se le puede encasillar en una sola función, sino que tiene distintas implicaciones dependiendo la situación o patología en donde se exprese. Sin duda es parte esencial como una proteína inmunológica, que está presente durante condiciones de estrés celular, pero identificar cuál es su función en cada una de las enfermedades puede ser una de las llaves para descifrar los mecanismos con los que operan las patologías en el cerebro que en muchos casos, como en las neuropatologías, varios mecanismos están siendo afectados lo que provoca la muerte celular y complica su tratamiento (Ruz et al., 2020).

Una posibilidad es que, durante un daño agudo, como un golpe o infección, la inducción inmediata de la expresión de *ISG15* pueda ser benéfica como parte de un proceso inmune normal. Sin embargo, la expresión de *ISG15* podría ser perjudicial para una enfermedad cerebral crónica por lo tanto podría considerarse como un marcador de riesgo para este tipo de enfermedades cerebrales (Figura 9). Bajo este panorama ISG15/ISGilación podría afectar diversos procesos celulares entre ellos la autofagia y el sistema UPS.



Figura 9. **Altos niveles de la proteína estimulada por interferón 15 (ISG15) parecen tener un efecto dual sobre la neuroprotección.** Cuando se presentan alteraciones agudas (isquemia), el incremento de ISG15 se asocia con una mayor neuroprotección (lado izquierdo). En contraste, altos niveles de ISG15 se relacionan con una menor neuroprotección en eventos crónicos (como las enfermedades neurodegenerativas) (lado derecho).

Es importante hacer notar, que se conocen pocas proteínas blanco de ISGilación en las diversas alteraciones neuronales, en las que su expresión y actividad se ven desreguladas. Además, la contribución de ISG15 libre y la ISGilación de proteínas en las neuropatologías aun no es clara. Todos los artículos revisados, describen una correlación entre algunas funciones y los niveles de ISG15, particularmente de la ISGilación de proteínas, pero es necesario desarrollar más estudios para comprender cuál es el motivo de la correlación entre los niveles de ISGilación y su implicación en las funciones celulares. Tampoco se puede pasar por alto posible participación de ISG15 libre en las neuropatologías, ya que, como se revisó, cuando es secretada tiene funciones de citocina en el medio extracelular, lo que ampliaría las características de la expresión de esta proteína.

Por otro lado, a la fecha, no existen resultados concluyentes que asocien enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP con ISG15/ISGilación de proteínas. No obstante, estas enfermedades tienen alteraciones no sólo en la acumulación de aglomerados de proteínas, sino también en los sistemas de neuroinflamación, UPS, autofagia y mitofagia los cuales se empiezan a asociar con

ISG15/ISGilación (Ruz et al., 2020). También existe la posibilidad de que proteínas esenciales involucradas con patologías neurodegenerativas estén siendo modificadas por ISGilación provocando deficiencias, como se observa en la proteína Parkin, que sus mutaciones conducen a los casos de EP familiar (Martinez-Vicente, 2017) y se conoce que Parkin es una proteína que puede ser ISGilada, pero no se conoce si la ISGilación de esta proteína podría tener un efecto en la progresión del EP esporádico. Lo anterior vuelve a esta modificación postraduccional un foco de estudio importante ya que también se ha reportado que el acortamiento de los telómeros, un proceso asociado al envejecimiento, induce la expresión de *ISG15* (Tecalco-Cruz, 2020), lo cual podría tener una influencia en el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad avanzada.

Con toda esta información, ISG15 y la ISGilación podrían convertirse en una proteína objetivo para el desarrollo de tratamientos contra patologías del SNC, ya que su expresión revela implicaciones negativas durante estos casos y los primeros estudios indican que su silenciamiento puede restaurar aquellos mecanismos que están desregulados, como se observa en el crecimiento de las dendritas en el modelo de depresión y lo que se observa en las células A-T al recuperar la degradación de proteínas y restaurar el sistema mitofágico. Además, ISG15 podría ser un biomarcador para enfermedades neurodegenerativas, como se propone en la ELA, ya que se encuentran niveles elevados en el líquido cefalorraquídeo, lo que permitiría identificar de manera temprana este tipo de enfermedades, que normalmente se diagnostican ya cuando los síntomas están desarrollados (Schwartzburg et al., 2019).

Entonces ISG15 es una proteína que tiene una proyección enorme también en el SNC al igual que en el cáncer, por lo que su estudio podría brindar la posibilidad de mejorar tratamientos ya sea directamente, indirectamente o apoyando en la identificación de enfermedades e iniciar la terapia en etapas tempranas y mejorar los resultados obtenidos.

## **8. Capítulo 5**

### **8.1 Conclusiones**

La proteína ISG15 está involucrada en la neuroprotección del cerebro. En casos agudos como la isquemia el aumento de ISG15 tiene un efecto neuroprotector. Contrario a esto, en enfermedades neurodegenerativas, altos niveles de ISG15/ISGilación parecen reducir la neuroprotección.

La ISGilación de proteínas está relacionada con los cuadros de depresión, vía un mecanismo que involucra la disminución del número de contactos sinápticos (dendritas y espinas).

La ISGilación de proteínas altera el balance de las vías de degradación de proteínas favoreciendo la progresión de la A-T.

ISG15 y la ISGilación son potenciales biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas.

### **8.2 Perspectivas**

En este trabajo de actualización, se investigaron las funciones de ISG15 y la ISGilación de proteínas y su implicación en enfermedades neurológicas en donde la ISGilación de proteínas está presente y al modificar sus niveles ocurre un cambio funcional significativo en los mecanismos asociados a la neuroprotección, incrementándola o disminuyéndola.

A pesar de que ya se han iniciado los trabajos para identificar ISG15/ISGilación es necesario complementar estos estudios con nuevos objetivos para poder trazar correctamente la implicación que pudiera tener esta proteína en las enfermedades neurológicas. Uno de los puntos importantes para desarrollar debe ser la búsqueda de blancos de ISGilación en cada una de las patologías mencionadas. Esto podría ayudarnos a entender, cómo es que la ISGilación está modificando los procesos celulares y así entender porque se observan los cambios funcionales en estas enfermedades, de ser posible, extender la búsqueda a otras enfermedades neurológicas, para que de esta manera se encuentren similitudes que puedan

facilitar la identificación de los mecanismos por los que opera la ISGilación en el cerebro.

Otro de los puntos que se debe definir es si la ISG15 libre también tiene alguna implicación en los escenarios patológicos cerebrales, ya que los estudios que revisamos sólo muestran como campo de estudio la modificación postraducciona, ISGilación. Hay que recordar que ISG15 libre se comporta como una citocina y durante enfermedades neurológicas es común observar inflamación, lo que podría relacionar a la ISG15 libre como una de las señales que provocan la inflamación en el SNC, sin embargo, hasta el momento no se tiene ninguna observación de qué sucede con esta proteína de manera no conjugada.

Finalmente, evaluar a esta proteína como posible biomarcador o blanco terapéutico es una de las propuestas que más valor puede llegar a tener, considerando que, para varias enfermedades neurológicas, los tratamientos actuales no son de gran efectividad, encontrar diferentes caminos para la terapia de estas enfermedades es uno de los temas de mayor interés, debido a la cantidad de personas que se ven afectadas.

## 9. Referencias

- Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, 362(6411).  
<https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Ashley, R. L., Henkes, L. E., Bouma, G. J., Pru, J. K., & Hansen, T. R. (2010). Deletion of the *Isg15* gene results in up-regulation of decidual cell survival genes and down-regulation of adhesion genes: Implication for regulation by IL-1. *Endocrinology*, 151(9). <https://doi.org/10.1210/en.2010-0166>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40(12). <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>
- Ayub, S. G., & Kaul, D. (2017). miR-2909 regulates ISGylation system via STAT1 signalling through negative regulation of SOCS3 in prostate cancer. *Andrology*, 5(4). <https://doi.org/10.1111/andr.12374>
- Baldanta, S., Fernández-Escobar, M., Acín-Perez, R., Albert, M., Camafeita, E., Jorge, I., Vázquez, J., Enríquez, J. A., & Guerra, S. (2017). ISG15 governs mitochondrial function in macrophages following vaccinia virus infection. *PLoS Pathogens*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006651>
- Barnes, J., Mondelli, V., & Pariante, C. M. (2017). Genetic Contributions of Inflammation to Depression. *Neuropsychopharmacology*, 42(1). <https://doi.org/10.1038/npp.2016.169>
- Barodia, S. K., Creed, R. B., & Goldberg, M. S. (2017). Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.004>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bogunovic, D., Byun, M., Durfee, L. A., Abhyankar, A., Sanal, O., Mansouri, D., Salem, S., Radovanovic, I., Grant, A. V., Adimi, P., Mansouri, N., Okada, S., Bryant, V. L., Kong, X. F., Kreins, A., Velez, M. M., Boisson, B., Khalilzadeh, S., Ozcelik, U., ... Casanova, J. L. (2012). Mycobacterial disease and impaired IFN- $\gamma$  immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*, 337(6102). <https://doi.org/10.1126/science.1224026>
- Brown, A. S. (2012). Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Developmental Neurobiology*, 72(10). <https://doi.org/10.1002/dneu.22024>
- Burks, J., Reed, R., & Desai, S. (2014). ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*, 33(6). <https://doi.org/10.1038/onc.2012.633>

- Cajee, U. F., Hull, R., & Ntwasa, M. (2012). Modification by ubiquitin-like proteins: Significance in apoptosis and autophagy pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms130911804>
- Cappadocia, L., & Lima, C. D. (2018). Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism. *Chemical Reviews*, *118*(3). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00737>
- Chairatvit, K., Wongnoppavich, A., & Choonate, S. (2012). Up-regulation of interferon-stimulated gene15 and its conjugates by tumor necrosis factor- $\alpha$  via type i interferon-dependent and -independent pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *368*(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1360-5>
- Chan, N. C., & Chan, D. C. (2011a). Parkin uses the UPS to ship off dysfunctional mitochondria. *Autophagy*, *7*(7). <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15453>
- Chan, N. C., Salazar, A. M., Pham, A. H., Sweredoski, M. J., Kolawa, N. J., Graham, R. L. J., Hess, S., & Chan, D. C. (2011b). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics*, *20*(9). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr048>
- Chiriță, A. L., Gheorman, V., Bondari, D., & Rogoveanu, I. (2015). Current understanding of the neurobiology of major depressive disorder. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, *56*(2), 651–658. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/873278>
- Ciechanover, A. (2005). Early work on the ubiquitin proteasome system, an interview with Aaron Ciechanover. *Cell Death and Differentiation*, *12*(9). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401691>
- Cimarosti, H., Ashikaga, E., Jaafari, N., Dearden, L., Rubin, P., Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2012). Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *32*(1). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.146>
- Clark, S. M., Pocivavsek, A., Nicholson, J. D., Notarangelo, F. M., Langenberg, P., McMahon, R. P., Kleinman, J. E., Hyde, T. M., Stiller, J., Postolache, T. T., Schwarcz, R., & Tonelli, L. H. (2016). Reduced kynurenine pathway metabolism and cytokine expression in the prefrontal cortex of depressed individuals. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *41*(6). <https://doi.org/10.1503/jpn.150226>
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M., & Huibregtse, J. M. (2006). Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7). <https://doi.org/10.1074/jbc.M512830200>
- Datwyler, A. L., Lättig-Tünnemann, G., Yang, W., Paschen, W., Lee, S. L. L., Dirnagl, U., Endres, M., & Harms, C. (2011). SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *31*(11). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.112>
- Davis, I., & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it

- important to neurotherapeutics? *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(7).  
<https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1049999>
- Deas, E., Wood, N. W., & Plun-Favreau, H. (2011). Mitophagy and Parkinson's disease: The PINK1-parkin link. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.08.007>
- Desai, S. D., Reed, R. E., Babu, S., & Lorio, E. A. (2013). ISG15 deregulates autophagy in genotoxin-treated ataxia telangiectasia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403832>
- Desai, S., Juncker, M., & Kim, C. (2018). Regulation of mitophagy by the ubiquitin pathway in neurodegenerative diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 243(6). <https://doi.org/10.1177/1535370217752351>
- Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J. Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S. M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, D. S., Strohlic, L., Dwivedy, A., & Holt, C. E. (2010). E3 Ligase Nedd4 Promotes Axon Branching by Downregulating PTEN. *Neuron*, 65(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.017>
- Dupuis, L. (2014). Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 100(Mitochondria: An organelle for life), 177–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.033>
- Durcan, T. M., & Fon, E. A. (2015). The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes and Development*, 29(10).  
<https://doi.org/10.1101/gad.262758.115>
- Durfee, L. A., Lyon, N., Seo, K., & Huibregtse, J. M. (2010). The ISG15 Conjugation System Broadly Targets Newly Synthesized Proteins: Implications for the Antiviral Function of ISG15. *Molecular Cell*, 38(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>
- Eiyama, A., & Okamoto, K. (2015). PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. In *Current Opinion in Cell Biology*, 33.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.002>
- El-Asmi, F., McManus, F., Brantis-de-Carvalho, C., Valle-Casuso, J.C., Thibault, P., Chelbi-Alix, M. K. (2020) Cross-talk between SUMOylation and ISGylation in response to interferon. *Cytokine*, 129.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155025>
- Falvey, C. M., O'Donovan, T. R., El-Mashed, S., Nyhan, M. J., O'Reilly, S., & McKenna, S. L. (2017). UBE2L6/UBCH8 and ISG15 attenuate autophagy in esophageal cancer cells. *Oncotarget*, 8(14).  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15182>

- Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W. J., Dorsey, E. R., Elbaz, A., Ellenbogen, R. G., Fisher, J. L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S. L., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Logroscino, G., Marin, B., ... Vos, T. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(5), 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Gao, L., Laude, K., & Cai, H. (2008). Mitochondrial Pathophysiology, Reactive Oxygen Species, and Cardiovascular Diseases. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *38*(1). <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.004>
- Gilmore, J. H., Jarskog, L. F., Vadlamudi, S., & Lauder, J. M. (2004). Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology*, *29*(7). <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300446>
- Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., & Moore, D. J. (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *Journal of Neurochemistry*, *118*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07318.x>
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguilera, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., McBride, H. M., Park, D. S., & Fon, E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Reports*, *13*(4). <https://doi.org/10.1038/embor.2012.14>
- Guo, Yongli, Dolinko, A. V., Chinyengetere, F., Stanton, B., Bomberger, J. M., Demidenko, E., Zhou, D. C., Gallagher, R., Ma, T., Galimberti, F., Liu, X., Sekula, D., Freemantle, S., & Dmitrovsky, E. (2010). Blockade of the ubiquitin protease UBP43 destabilizes transcription factor PML/RAR $\alpha$  and inhibits the growth of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Research*, *70*(23). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1100>
- Guo, Yan-Jun, Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hermann, M. R., Jakobson, M., Colo, G. P., Rognoni, E., Jakobson, M., Kupatt, C., Posern, G., & Fässler, R. (2016). Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion. *Journal of Cell Science*, *129*(7). <https://doi.org/10.1242/jcs.177592>
- Herrmann, J., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation Research*, *100*(9). <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000264500.11888.f0>
- Hershko, A., Ciechanover, A., & Varshavsky, A. (2000). Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nature Medicine*, *6*(10). <https://doi.org/10.1038/80384>

- Hu, Y., Hong, X. Y., Yang, X. F., Ma, R. H., Wang, X., Zhang, J. F., Feng, Q., Li, X. G., Sun, D. S., Li, X., Wan, H. L., Li, T., Wang, Q., Ke, D., Wang, J. Z., & Liu, G. P. (2019). Inflammation-dependent ISG15 upregulation mediates MIA-induced dendrite damages and depression by disrupting NEDD4/Rap2A signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.020>
- Huang, Q., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2010). Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: Therapeutic implications. *Apoptosis*, 15(11). <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0466-z>
- Hyo, J. K., Adams, D. H., Simen, A., Simen, B. B., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., Jurjus, G. J., Konick, L. C., Newton, S. S., & Duman, R. S. (2007). Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. *Journal of Neuroscience*, 27(48). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4083-07.2007>
- Ikeda, F., & Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: New molecular signals. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series. *EMBO Reports*, 9(6). <https://doi.org/10.1038/embor.2008.93>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2021a). *Global Health Data Exchange*. Institute for Health Metrics and Evaluation. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2021b). *Viz Hub*. Institute for Health Metrics and Evaluation. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
- Jeon, Y. J., Choi, J. S., Lee, J. Y., Yu, K. R., Kim, S. M., Ka, S. H., Oh, K. H., Kim, K. II, Zhang, D. E., Bang, O. S., & Chung, C. H. (2009). ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway. *EMBO Reports*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/embor.2009.23>
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology*, 191(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.201008084>
- Jin, S. M., & Youle, R. J. (2012). PINK1-and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.093849>
- Johri, A., & Beal, M. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(3). <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192138>
- Juncker, M., Kim, C., Reed, R., Haas, A., Schwartzenburg, J., & Desai, S. (2021). ISG15 attenuates post-translational modifications of mitofusins and congression of damaged mitochondria in Ataxia Telangiectasia cells. *Molecular Basis of Disease*, 1867(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166102>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian

- homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, 19(21). <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Steven, S., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (5th ed.). McGraw-Hill.
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., Banerjee, S., & Youle, R. J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Cell Biology*, 205(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.201402104>
- Kang, H. J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Licznanski, P., Lepack, A., Majik, M. S., Jeong, L. S., Banasr, M., Son, H., & Duman, R. S. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine*, 18(9). <https://doi.org/10.1038/nm.2886>
- Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex* 10(10). <https://doi.org/10.1093/cercor/10.10.981>
- Kawabe, H., Neeb, A., Dimova, K., Young, S. M., Takeda, M., Katsurabayashi, S., Mitkovski, M., Malakhova, O. A., Zhang, D. E., Umikawa, M., Kariya, K. ichi, Goebbels, S., Nave, K. A., Rosenmund, C., Jahn, O., Rhee, J. S., & Brose, N. (2010). Regulation of Rap2A by the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Controls Neurite Development. *Neuron*, 65(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.007>
- Kazlauskaitė, A., Martínez-Torres, R. J., Wilkie, S., Kumar, A., Peltier, J., Gonzalez, A., Johnson, C., Zhang, J., Hope, A. G., Pegg, M., Trost, M., Aalten, D. M., Alessi, D. R., Prescott, A. R., Knebel, A., Walden, H., & Muqit, M. M. (2015). Binding to serine 65-phosphorylated ubiquitin primes Parkin for optimal PINK 1-dependent phosphorylation and activation. *EMBO Reports*, 16(8). <https://doi.org/10.15252/embr.201540352>
- Kim, Y. J., Kim, E. T., Kim, Y. E., Lee, M. K., Kwon, K. M., Kim, K. II, Stamminger, T., & Ahn, J. H. (2016). Consecutive Inhibition of ISG15 Expression and ISGylation by Cytomegalovirus Regulators. *PLoS Pathogens*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005850>
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497). <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., ... Deter, R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2). <https://doi.org/10.4161/auto.5338>
- Köhler, C. A., Freitas, T. H., Stubbs, B., Maes, M., Solmi, M., Veronese, N., de Andrade, N. Q., Morris, G., Fernandes, B. S., Brunoni, A. R., Herrmann, N.,

- Raison, C. L., Miller, B. J., Lanctôt, K. L., & Carvalho, A. F. (2018). Peripheral Alterations in Cytokine and Chemokine Levels After Antidepressant Drug Treatment for Major Depressive Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular Neurobiology*, *55*(5). <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0632-1>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, *1078*. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2)
- Kulkarni, V. A., & Firestein, B. L. (2012). The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *50*(1). <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.005>
- Lavin, M. F., Scott, S., Gueven, N., Kozlov, S., Peng, C., & Chen, P. (2004). Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair*, *3*(8–9). <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.011>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, *524*(7565). <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- Lee, Y. J., Miyake, S. I., Wakita, H., McMullen, D. C., Azuma, Y., Auh, S., & Hallenbeck, J. M. (2007). Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(5). <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600395>
- Lee, Y. J., Mou, Y., Maric, D., Klimanis, D., Auh, S., & Hallenbeck, J. M. (2011). Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025852>
- Lehman, N. L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathologica*, *118*(3). <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0560-x>
- Lertsooksawat, W., Wongnoppavich, A., & Chairatvit, K. (2019). Up-regulation of interferon-stimulated gene 15 and its conjugation machinery, Ube1L and UbcH8 expression by tumor necrosis factor- $\alpha$  through p38 MAPK and JNK signaling pathways in human lung carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *462*(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03609-5>
- Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113). <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Mahajan, G. J., Vallender, E. J., Garrett, M. R., Challagundla, L., Overholser, J. C., Jurjus, G., Dieter, L., Syed, M., Romero, D. G., Benghuzzi, H., & Stockmeier, C. A. (2018). Altered neuro-inflammatory gene expression in hippocampus in

- major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.017>
- Malakhov, M. P., Kim, K. II, Malakhova, O. A., Jacobs, B. S., Borden, E. C., & Zhang, D. E. (2003). High-throughput immunoblotting: Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19). <https://doi.org/10.1074/jbc.M208435200>
- Malakhova, O., Malakhov, M., Hetherington, C., & Zhang, D. E. (2002). Lipopolysaccharide activates the expression of ISG15-specific protease UBP43 via interferon regulatory factor 3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111527200>
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., De Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience*, 13(5). <https://doi.org/10.1038/nn.2528>
- Martinez-Vicente, M. (2017). Neuronal mitophagy in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00064>
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., & Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316(5828). <https://doi.org/10.1126/science.1140321>
- Mechawar, N., & Savitz, J. (2016). Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation? *Translational psychiatry*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.212>
- Mendoza-Rodríguez, C. A., & Cerbón, M. A. (2001). The tumor suppressor p53: Mechanism of action in proliferation and cell death. *Revista de Investigación Clínica*, 53(3).
- Meyer, U., & Feldon, J. (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology*, 62(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.009>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: Process and function. *Genes and Development*, 21(22), 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Nakashima, H., Nguyen, T., Goins, W. F., & Chiocca, E. A. (2015). Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) and ISG15-linked proteins can associate with members of the selective autophagic process, histone deacetylase 6 (HDAC6) and SQSTM1/p62. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593871>
- Nakka, V. P., Lang, B. T., Lenschow, D. J., Zhang, D. E., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2011). Increased cerebral protein ISGylation after focal ischemia is neuroprotective. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*,

31(12). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.103>

- Narasimhan, J., Wang, M., Fu, Z., Klein, J. M., Haas, A. L., & Kim, J. J. P. (2005). Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.M502814200>
- Natale, G., Lenzi, P., Lazzeri, G., Falleni, A., Biagioni, F., Ryskalin, L., & Fornai, F. (2015). Compartment-dependent mitochondrial alterations in experimental ALS, the effects of mitophagy and mitochondriogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00434>
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2020). *Brain Basics: Know Your Brain*. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Know-Your-Brain>
- Nguyen, T. N., Padman, B. S., & Lazarou, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(10). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2015). Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *Journal of Cell Biology*, 209(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.201410050>
- Okumura, F., Zou, W., & Zhang, D. E. (2007). ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes and Development*, 21(3). <https://doi.org/10.1101/gad.1521607>
- Ott, D., Wuchert, F., Murgott, J., Rummel, C., Gerstberger, R., & Roth, J. (2012). The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier. *Neuroscience Letters*, 530(1). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.038>
- Paine, S., Bedford, L., Thorpe, J. R., Mayer, R. J., Cavey, J. R., Bajaj, N., Sheppard, P. W., Lowe, J., & Layfield, R. (2009). Immunoreactivity to Lys63-linked polyubiquitin is a feature of neurodegeneration. *Neuroscience Letters*, 460(3). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.074>
- Pandey, G. N., Rizavi, H. S., Ren, X., Fareed, J., Hoppensteadt, D. A., Roberts, R. C., Conley, R. R., & Dwivedi, Y. (2012). Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *Journal of Psychiatric Research*, 46(1). <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.08.006>
- Pandey, G. N., Rizavi, H. S., Ren, X., Bhaumik, R., & Dwivedi, Y. (2014). Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. *Journal of Psychiatric Research*, 53(1). <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.01.021>
- Pandey, U. B., Batlevi, Y., Baehrecke, E. H., & Taylor, J. P. (2007). HDAC6 at the intersection of autophagy, the ubiquitin-proteasome system and neurodegeneration (Autophagy). *Autophagy*, 3(6). <https://doi.org/10.4161/auto.5050>

- Park, J. H., Yang, S. W., Park, J. M., Ka, S. H., Kim, J. H., Kong, Y. Y., Jeon, Y. J., Seol, J. H., & Chung, C. H. (2016). Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>
- Park, J. M., Yang, S. W., Yu, K. R., Ka, S. H., Lee, S. W., Seol, J. H., Jeon, Y. J., & Chung, C. H. (2014). Modification of PCNA by ISG15 Plays a Crucial Role in Termination of Error-Prone Translesion DNA Synthesis. *Molecular Cell*, 54(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.031>
- Radoshevich, L., Impens, F., Ribet, D., Quereda, J. J., Tham, T. N., Nahori, M. A., Bierne, H., Dussurget, O., Pizarro-Cerdá, J., Knobeloch, K. P., & Cossart, P. (2015). ISG15 counteracts *Listeria monocytogenes* infection. *ELife*, 4(AUGUST2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.06848>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7). <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Ross, J. M., Olson, L., & Coppotelli, G. (2015). Mitochondrial and ubiquitin proteasome system dysfunction in ageing and disease: Two sides of the same coin? *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8). <https://doi.org/10.3390/ijms160819458>
- Rossi, J. L., Todd, T., Daniels, Z., Bazan, N. G., & Belayev, L. (2015). Interferon-Stimulated Gene 15 Upregulation Precedes the Development of Blood-Brain Barrier Disruption and Cerebral Edema after Traumatic Brain Injury in Young Mice. *Journal of Neurotrauma*, 32(14). <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3611>
- Rüb, C., Wilkening, A., & Voos, W. (2017). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell and Tissue Research*, 367(1). <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2485-8>
- Rubinsztein, D. C. (2007). Autophagy Induction Rescues Toxicity Mediated by Proteasome Inhibition. *Neuron*, 54(6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.005>
- Ruffoli, R., Bartalucci, A., Frati, A., & Fornai, F. (2015). Ultrastructural studies of ALS mitochondria connect altered function and permeability with defects of mitophagy and mitochondriogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00341>
- Ruz, C., Alcantud, J. L., Montero, F. V., Duran, R., & Bandres-Ciga, S. (2020). Proteotoxicity and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165646>
- Ryan, B. J., Hoek, S., Fon, E. A., & Wade-Martins, R. (2015). Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: From familial to sporadic disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(4). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.02.003>
- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11). <https://doi.org/10.1038/nrc3803>

- Sánchez-Torres, J. L., Yescas-Gómez, P., Torres-Romero, J., Espinosa, O. R., Canovas, L. L., Tecalco-Cruz, Á. C., Ponce-Regalado, M. D., & Alvarez-Sánchez, M. E. (2020). Matrix metalloproteinases deregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *419*, 117-175. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117175>
- Schwartzenburg, J., Juncker, M., Reed, R., & Desai, S. (2019). Increased ISGylation in cases of TBI-exposed ALS veterans. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *78*(3). <https://doi.org/10.1093/jnen/nly129>
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, *48*(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K. Y., Nukina, N., Hattori, N., & Imai, Y. (2014). Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genetics*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004861>
- Sivaguru, M., Khaw, Y. M., & Inoue, M. (2019). A Confocal Reflection Super-Resolution Technique to Image Golgi-Cox Stained Neurons. *Journal of Microscopy*, *275*(2). <https://doi.org/10.1111/jmi.12821>
- Spinnenhirn, V., Bitzer, A., Aichem, A., & Groettrup, M. (2017). Newly translated proteins are substrates for ubiquitin, ISG15, and FAT10. *FEBS Letters*, *591*(1). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12512>
- Stephani, C. (2014). *Limbic System*. Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012385157401157X>
- Tanaka, A. (2010). Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Letters*, *584*(7). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.060>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *36*(12). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- Tecalco Cruz, A. C., & Mejía-Barreto, K. (2017). Cell type-dependent regulation of free ISG15 levels and ISGylation. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *11*(2). <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0385-7>
- Tecalco-Cruz, A. C. (2020). Molecular pathways of interferon-Stimulated Gene 15: Implications in cancer. *Current Protein and Peptide Science*, *22*(1), 19-28.
- Valentin-Vega, Y. A., MacLean, K. H., Tait-Mulder, J., Milasta, S., Steeves, M., Dorsey, F. C., Cleveland, J. L., Green, D. R., & Kastan, M. B. (2012). Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood*, *119*(6). <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373639>
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernández-Delgado, I., Torralba,

- D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C., Guerra, S., & Sánchez-Madrid, F. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13588>
- Wang, L., Ma, Q., Yang, W., MacKensen, G. B., & Paschen, W. (2012a). Moderate hypothermia induces marked increase in levels and nuclear accumulation of SUMO2/3-conjugated proteins in neurons. *Journal of Neurochemistry*, *123*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07916.x>
- Wang, R. G., Kaul, M., & Zhang, D. X. (2012b). Interferon-stimulated gene 15 as a general marker for acute and chronic neuronal injuries. *Sheng Li Xue Bao*, *64*(5), 577-583. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3587786/>
- Weisskopf, M. G., O'Reilly, E. J., McCullough, M. L., Calle, E. E., Thun, M. J., Cudkovicz, M., & Ascherio, A. (2005). Prospective study of military service and mortality from ALS. *Neurology*, *64*(1). <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000148649.17706.D9>
- Whitworth, A. J., & Pallanck, L. J. (2009). The PINK1/Parkin pathway: A mitochondrial quality control system? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *41*(6). <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9253-3>
- Wohleb, E. S., Franklin, T., Iwata, M., & Duman, R. S. (2016). Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(8). <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.69>
- Wong, J. J. Y., Pung, Y. F., Sze, N. S. K., & Chin, K. C. (2006). HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.0600397103>
- Wood, L. M., Sankar, S., Reed, R. E., Haas, A. L., Liu, L. F., McKinnon, P., & Desai, S. D. (2011). A novel role for ATM in regulating proteasome-mediated protein degradation through suppression of the ISG15 conjugation pathway. *PLoS ONE*, *6*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016422>
- World Health Organization. (2016). *Mental Health: neurological disorders*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/mental-health-neurological-disorders>
- World Health Organization. (2020). *Dementia*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia#:~:text=Worldwide%2C around 50 million people,60-70%25 of cases.>
- Xu, D., Zhang, T., Xiao, J., Zhu, K., Wei, R., Wu, Z., Meng, H., Li, Y., & Yuan, J. (2015). Modification of BECN1 by ISG15 plays a crucial role in autophagy regulation by type I IFN/ interferon. *Autophagy*, *11*(4). <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1023982>
- Yang, J. L., Castri, P., Bembry, J., Maric, D., Auh, S., & Hallenbeck, J. M. (2009).

- SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. *Journal of Neurochemistry*, 109(1). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05957.x>
- Yang, W., Ma, Q., MacKensen, G. B., & Paschen, W. (2009). Deep hypothermia markedly activates the small ubiquitin-like modifier conjugation pathway; Implications for the fate of cells exposed to transient deep hypothermic cardiopulmonary bypass. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(5). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.16>
- Yang, W., Sheng, H., & Wang, H. (2016). Targeting the SUMO pathway for neuroprotection in brain ischaemia. *Stroke and Vascular Neurology*, 1(3). <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000031>
- Zabetakis, I., Lordan, R., & Tsoupras, A. (2019). *The impact of nutrition and statins on cardiovascular diseases*. The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00506-2>
- Zamudio, J., Peña, M., & Riesgo, J. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 133–141. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2012.2.64>
- Zhang, D., & Zhang, D. E. (2011). Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 31(1), 119–130. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0110>
- Zhang, Q., He, Y., Nie, M., & Cai, W. (2017). Roles of miR-138 and ISG15 in oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3). <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4720>
- Zhao, C., Beaudenon, S. L., Kelley, M. L., Waddell, M. B., Yuan, W., Schulman, B. A., Huibregtse, J. M., & Krug, R. M. (2004). The Ubch8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN- $\alpha/\beta$ -induced ubiquitin-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.0402528101>
- Zhou, M. J., Chen, F. Z., Chen, H. C., Wan, X. X., Zhou, X., Fang, Q., & Zhang, D. Z. (2017). ISG15 inhibits cancer cell growth and promotes apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(2). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2845>
- Zou, W., & Zhang, D. E. (2006). The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7). <https://doi.org/10.1074/jbc.M510787200>