ISSN 0187/294X

BEB 93

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOL. 12 No. 3 SEPTIEMBRE 1993

EDITORIAL

EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO

El caso del genoma humano es un tema muy debatido en la comunidad científica internacional. Existen grupos a favor y en contra del proyecto, que de todos modos se está llevando a cabo.

Los opositores dicen que el proyecto tuvo su origen en el Departamento de Energía de los EE.UU., por Charles De Lisi del Laboratorio de los Alamos, Nuevo México. Inmediatamente después, el influyente senador del estado de Nuevo México, Domenici, consiguió fondos para el proyecto. Así, el programa debe su existencia a este poderoso senador quien sigue siendo el abogado político principal del mismo y no a la opinión de los científicos del área.

Entre los argumentos de los que apoyan al proyecto, se dice que los progresos de la genética y de la biología molecular hicieron posible y hasta inevitable dicho proyecto. Algunos creen -supongo que de buena fé- que la dilucidación de la secuencia de nucleótidos del genoma, conducirá inevitablemente a la solución de las enfermedades hereditarias, del cáncer y de muchos otros problemas médicos y biológicos.

Esto es una flagrante exageración. Comparativamente, el conocimiento que tenemos actualmente de la estructura de las proteínas, se basa en los notables desarrollos de la química de los polipéptidos, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear.

Sin embargo dice Martín C. Rechsteiner yo dudaría en argumentar que estos avances en la bioquímica física, justifican el gastar tres mil millones de dólares para resolver la estructura de proteínas humanas seleccionadas al azar.

Aún científicos tan distinguidos como el Premio Nobel Walter Gilbert defensor y participante en el proyecto, secuenciando el genoma de *Mycoplasma capricolum*, utiliza técnicos de laboratorio y no estudiantes de grado o postdoctorales, porque percibe que la salud a largo plazo de la investigación biomédica depende de programas de adiestramiento vigoroso y no del tedioso trabajo de secuenciar al DNA que los jóvenes brillantes de ciencias no querrán desempeñar.

Pasa a la pág. 59

COMITE EDITORIAL

ALFONSO CARABEZ TREJO
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

CARLOS LARRALDE RANGEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA
Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JESUS MANUEL LEON CAZARES
Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

BEB 93 Vol. 12 Núm. 3 Septiembre de1993

EDITORIAL

EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO
Guillermo Carvajal Sandoval.....57

ARTICULOS

PAPEL DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS DIRECTAS EN LA REPLICACION PLASMIDICA
Everardo Curiel Quesada.....59

LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III DE PROCARIOTOS
José Luis Muñoz Sánchez.....66

LAS PROTEINASAS DE CISTEINA DE *Entamoeba histolytica*
Ruy Pérez Montfort.....72

OTRAS COMUNICACIONES

EL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA
Alberto Huberman.....78

AVISOS

VI REUNION NACIONAL DE BIOQUIMICA VEGETAL.....79

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA.....80

Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.

Facultad de Medicina, UNAM

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510 México, D. F. Tiraje 1,300 ejemplares.

Viene de la pág. 57

EL PROYECTO DEL...

Pero veamos por qué es difícil el proyecto del genoma: Hay 3,000 millones de nucleótidos en un hilo sencillo del DNA distribuido entre los 23 cromosomas, que llevan por lo menos 30,000 genes (quizá tres veces más) con alrededor de 1,000 nucleótidos en promedio para cada uno. Determinar la secuencia de las partes aparentemente no funcionales del genoma es numéricamente un problema todavía más grande -de 30 a 100 veces más grande- pero también es un problema que no podría resolverse mientras los esfuerzos de investigación estén guiados como debe ser por metas tangibles.

La automatización que se ha desarrollado en los últimos años para la secuenciación, presenta al proyecto del genoma como un reto formidable. El profesor Isao Endo, quien con sus colaboradores ha desarrollado una máquina capaz de secuenciar 100,000 nucleótidos por día (más de un nucleótido por segundo), calcula que solo podría conseguirse la secuenciación de 1% del genoma humano en un año o la secuencia completa en un siglo. En el futuro cercano, cuando se consigan máquinas capaces de secuenciar una megabase (un millón de nucleótidos) por día, se podrían desarrollar proyectos realizables durante la duración de la vida de un ser humano.

El proyecto del genoma humano representa un conjunto de decisiones malas. Se inició por razones políticas, no científicas; ofrece poca oportunidad de adiestramiento para la próxima generación de científicos; falla en marcar a las principales enfermedades humanas; ha generado una profunda división dentro de la comunidad científica, representa ciencia mediocre. Los proyectos sobre el genoma deberían limitarse mucho, o todavía mejor, abandonarse. Los fondos de investigación así liberados, podrían utilizarse mucho más sensatamente. Ojalá que en países como el nuestro, no se desperdicie dinero en este debatido proyecto y se emplee para apoyar las abundantes ideas de investigación original que caracterizan al talente latinoamericano.

Dr. Guillermo Carvajal Sandoval
ENCB-IPN INER-SSA

PAPEL DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS DIRECTAS EN LA REPLICACION PLASMIDICA

Everardo Curiel Quesada. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.

RESUMEN

La mayoría de los plásmidos controlan su replicación por medio de interacciones entre proteínas replicadoras codificadas por ellos mismos y secuencias repetidas directas situadas cerca del origen de replicación. Estas interacciones pueden ser de tipo activador o inhibidor y ocurrir tanto en *cis* como en *trans*. En este artículo se discuten los modelos de control del inicio de la replicación plasmídica a través de estas interacciones, y su relación con el fenómeno de incompatibilidad.

PALABRAS CLAVE: replicación plasmídica, iterones, repeticiones directas, proteína iniciadora, incompatibilidad.

Los plásmidos son elementos de DNA extracromosómico no esenciales que se replican en armonía con la célula huésped, de tal manera que cada molécula plasmídica da lugar a una copia adicional de sí misma durante un ciclo celular,

asegurando que cada una de las células producto de la división contenga un número de copias del plásmido igual al de la célula progenitora (1). El número de copias es una característica fija de cada plásmido y es controlado por un sistema plasmídico que determina la frecuencia de inicio de replicación.

Con excepción de ColE1 y plásmidos relacionados, la replicación autónoma de los plásmidos requiere de un origen de replicación en *cis* (ori) y de uno o más productos proteicos codificados por el plásmido que interaccionan con el origen para propiciar el inicio de la síntesis del DNA. Estos dos elementos constituyen lo que se conoce como un replicón mínimo, es decir, la mínima cantidad de información necesaria para que una molécula sea capaz de autorreplicarse en una célula huésped adecuada. Por lo general el origen y el gen que codifica para la proteína replicadora (*rep*) se encuentran agrupados en una porción del plásmido de unas cuantas kilobases. Una molécula portadora de *ori* es capaz de replicarse también, siempre que el gen *rep* le sea provisto en *trans*.

Una propiedad relacionada con el mecanismo de control de la replicación es la incompatibilidad, debido a la cual dos plásmidos son incapaces de coexistir en una célula en ausencia de selección. Esta propiedad ha permitido clasificar a los plásmidos. Todas aquellas moléculas incapaces de coexistir en la misma célula constituyen un grupo de incompatibilidad (Inc). Los miembros de un grupo Inc están por lo general más relacionados entre sí que con plásmidos de otros grupos. Las determinantes de incompatibilidad están generalmente muy ligadas a las secuencias involucradas en el inicio de la replicación y control del número de copias (1).

Existen dos tipos de estrategias básicas de control de la replicación plasmídica; las estrategias inhibidor-blanco y las de unión a iterones.

En las estrategias inhibidor-blanco el plásmido codifica un inhibidor difusible de la replicación que se une a una región específica del replicón inhibiendo directamente la replicación, o la síntesis de un producto necesario para la misma.

En los sistemas de unión a iterones o DRs (secuencias de unos cuantos pares de bases repetidas

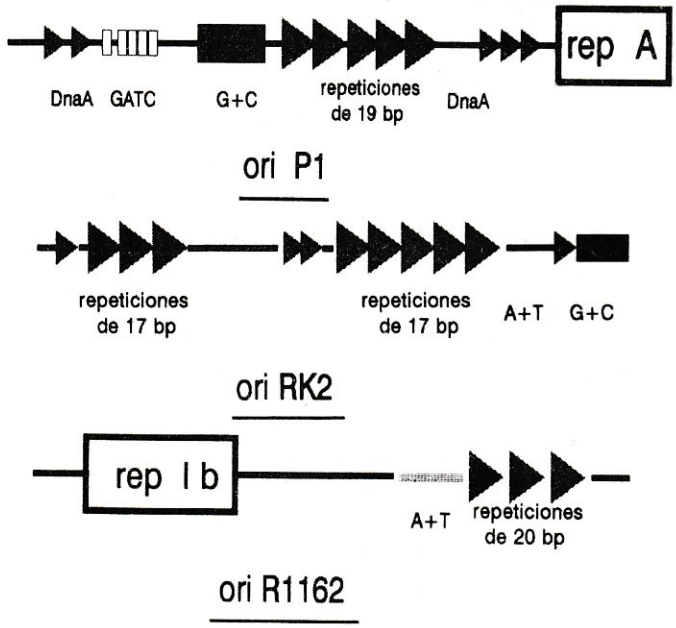

Figura 1. Organización de los orígenes de los plásmidos P1, RK2 y R1162. Los triángulos grandes representan repeticiones directas (iterones). Los triángulos pequeños corresponden a sitios de unión de la proteína de DnaA. Las cajas vacías son secuencias conservadas GATC (2, 9 y 13).

directamente y colocadas en serie), el plásmido codifica para una proteína iniciadora difusible (Rep) que interacciona con estas repeticiones, ubicadas por lo general cerca del origen.

En este artículo discutiremos las características de los iterones y la forma en que éstos modulan la replicación en algunos de los plásmidos mejor estudiados.

R1162 y RSF1010 son plásmidos muy parecidos de aproximadamente 9 kb. Estos plásmidos están presentes en un alto número de copias y son de tipo promiscuo, es decir, son capaces de mantenerse en forma estable en un gran número de huéspedes (2). Su replicón básico (Fig. 1) contiene 3 DRs de 20 bp y media secuencia adicional.

Para estudiar el papel de las repeticiones directas se clonó un fragmento de 370 pb conteniendo las DRs en un vector de multicopia y se introdujo a una célula conteniendo a R1162. La introducción del fragmento clonado eliminó al plásmido progenitor. La clonación del mismo fragmento en R1162 provocó una reducción en el número de copias. En vista de que el fragmento no contiene ningún marco abierto de lectura, tanto la incompatibilidad con R1162 como la reducción en el

número de copias por clonación en R1162 parecían estar mediadas por los iterones.

Trabajando con RSF1010, Persson y Nördstrom hicieron deleciones con la enzima Bal31 a un fragmento de 500 bp conteniendo las DRs y ligaron los fragmentos resultantes a un plásmido de multicopia. La mezcla de ligazón fue usada para transformar a una célula huésped que contenía el plásmido pCP120, portador del *ori* de RSF1010 y del gen *lac Z*. Dos de las clonas transformantes fueron rojas y blancas en agar Mc Conkey-lactosa. Los plásmidos de estas dos clonas (d61 y d62), al igual que el de una clona roja (d63), fueron aislados y secuenciados. La secuenciación del DNA mostró que d63 había perdido las cuatro DRs, d62 retenía un poco más de una repetición y d61 tenía dos repeticiones. Los experimentos cuantitativos de incompatibilidad mostraron una relación directa entre el grado de incompatibilidad y el número de repeticiones presentes en el plásmido (3).

Meyer y colaboradores encontraron que un fragmento conteniendo las DRs de R1162 provocaba inhibición de la replicación de R1162 *in vitro*, lo cual sugirió que la incompatibilidad era resultado de la inhibición de la replicación (4). Los autores señalan que la periodicidad de las DRs en R1162 y su relación con la incompatibilidad sugieren que los iterones son sitios múltiples de unión para la proteína replicadora RepIB, y proponen que las DRs deben estar cubiertas por la proteína para que el complejo de replicación quede ensamblado (5).

Estudios de Pal y Chattoraj (6) con el bacteriófago P1, que se lisogeniza en forma de plásmido en *E. coli*, mostraron que las secuencias repetidas de 19 bp cercanas al origen regulaban negativamente la replicación y provocaban incompatibilidad hacia plásmidos conteniendo el mismo origen. Los mismos autores encontraron que la sobreproducción hasta cierto nivel de proteína RepA contrarrestaba el efecto inhibitorio de los iterones, pero concentraciones más altas inhibían la replicación. Con base en estos resultados propusieron que RepA tenía un papel dual, propiciando la replicación a bajas concentraciones, pero inhibiéndola a altas concentraciones, probablemente por represión de la síntesis de RepA, causada por unión a los iterones cercanos al promotor del gen *repA* (Fig. 1)(7).

Los mecanismos de control de la concentración de RepA por unión a los iterones y por autorregulación parecen mutuamente excluyentes. Es probable que exista una concentración en la que la autorregulación por represión de RepA sea efectiva, y otra en la que las repeticiones sean efectivas para inhibir la replicación. De acuerdo con este modelo el sitio de autorregulación tendría la máxima afinidad por RepA, pero habría un período refractario entre la represión y la traducción y decaimiento del RNA mensajero de *RepA*, presentándose acumulación de la proteína, que saturaría primero los sitios de regulación y finalmente el sitio de la iniciación de menor afinidad, desencadenándose la replicación. La aparición de un nuevo replicón con múltiples iterones titularía la proteína replicadora, causando el alto abrupto en la replicación observado en la regulación del número de copias vía iterones (8).

RK2 es un plásmido conjugativo con un tamaño de 60 Kb que se replica en la mayoría de las bacterias Gram negativas estudiadas. Su origen de replicación en *E. coli* está contenido en un fragmento de 393 pares de bases y contiene 8 iterones de 17 bp cada uno. Tres de los iterones están ubicados río arriba y cinco se localizan río abajo del origen mínimo. Los cinco iterones río abajo van seguidos por una región rica en AT y otra rica en GC. (Fig. 1) (9).

Para el plásmido RK2 la deleción de los iterones río arriba provoca un aumento en el número de copias y está asociada con incompatibilidad. El plásmido codifica para dos proteínas en el gen *trfA*: TrfA-44 y TrfA-33, de 44 y 33 kd respectivamente. TrfA-33 es producto de una reiniciación traduccional y permite la replicación en muchos huéspedes, excepto en *Pseudomonas aeruginosa*. TrfA-44 permite la replicación del plásmido en *P. aeruginosa* y en otros organismos Gram negativos. Las dos proteínas TrfA actúan mediante unión a los iterones del origen, como se ha demostrado en experimentos de competencia entre un fragmento radioactivo conteniendo el origen mínimo y fragmentos conteniendo iterones, así como en estudios de huella de protección contra la DNAsa I (footprinting). A pesar de la alta especificidad de unión, los ensayos de huella requirieron grandes relaciones proteína-DNA, lo cual es poco probable en una interacción *in vivo* donde se estima que existen sólo unos 300

monómeros de TrfA-33 más TrfA-44 en cada célula portadora de RK2. Una proporción mucho menor de TrfA es requerida cuando se utilizan extractos crudos conteniendo la proteína. La mayor afinidad observada tanto *in vivo* como en extractos crudos podría deberse, al menos en parte, a la presencia de proteínas del huésped que facilitan la formación de complejos estables entre TrfA y los iterones del origen. (10).

La baja en el número de copias de un replicón por adición de iterones en exceso ha llevado a proponer (7) que las secuencias repetidas "titulan" a la proteína replicadora evitando su interacción con el origen, inhibiendo con ello la replicación. Una evidencia en contra de este modelo de titulación es que un aumento de 200 veces en la cantidad de TrfA en una célula provocó un incremento de sólo un 30% en el número de copias de RK2. Asimismo, la inhibición de la replicación de RK2 provocada por

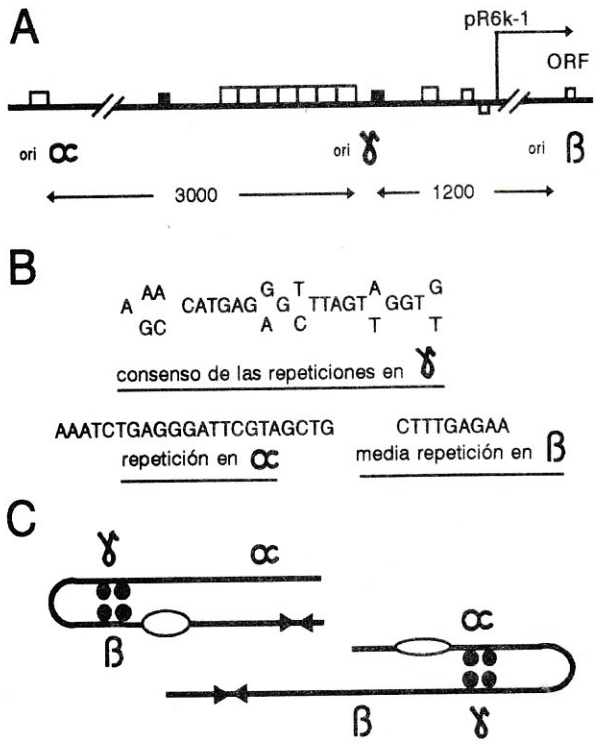

Figura 2. Región de control de la replicación del plásmido R6K. *A.* Mapa físico mostrando las localizaciones del potenciador/origen γ y los orígenes α y β. (ORF) representa el marco abierto de lectura que codifica para la proteína π. pR6K-1 es el promotor del ORF de π. □ iterones γ e iterones parciales de pR6K-1 y ori β. ■, sitio de unión a DnaA. *B.* Secuencia del iterón α, secuencia consenso de los 7 iterones γ y del iterón parcial de β. *C.* Diagramas mostrando la formación de asas mediada por la proteína π entre las secuencias γ-β y γ-α (12).

la presencia de 2 o más de sus iterones en un plásmido de multicopia no fue superada por un incremento en la concentración de TrfA. Más aún, una proteína TrfA mutante que da lugar a un aumento del número de copias (trfA-cop 254 D) inicia la replicación de RK2 de manera normal en presencia de exceso de iterones. Los resultados anteriores apoyan el modelo de acoplamiento intermolecular de iterones o de " esposamiento " para el control de la replicación, análogo al propuesto para R6K (11) y P1 (6).

RK6 es un plásmido autotransferible de 38 Kb que confiere resistencia a antibióticos y se mantiene en un número de copias de 12 a 18. El replicón contiene tres origenes: α, β y γ, y el gen que codifica para la proteína π (Fig. 2) (12).

Se ha propuesto que la regulación negativa de la replicación por la proteína π y DRs depende de la habilidad de ésta para asociar orígenes γ, resultando en plásmidos intermolecularmente acoplados, bloqueados en su capacidad de replicación. Para confirmar visualmente las interacciones entre π y el origen γ, se incubó porteína π purificada con fragmentos de un plásmido conteniendo el origen γ. La microscopia electrónica mostró que entre el 21 y el 80 % de los fragmentos con el ori γ tenían proteína π, siempre en la posición correcta. Además de los fragmentos individuales asociados a π se encontró que 365 de 465 moléculas unidas a la proteína estaban formando estructuras apareadas, siendo el punto de contacto la región de las DRs. Según lo anterior, dos moléculas conteniendo el ori γ se asocian a través de sus iterones mediante la proteína π para inhibir la replicación plasmídica. La regulación de la replicación de R6K podría verse tal vez como una competencia entre la agregación inhibitoria γ-γ y las interacciones activadoras γ-α y γ-β (12).

El ori γ de R6K tiene dos actividades; no sólo es un origen de replicación potencial, sino que también es un potenciador de la replicación iniciada en los orígenes α y β, colocados a 3,000 y 1,200 bp respectivamente del ori γ. Se ha propuesto que la acción activadora del ori γ se debe a una asociación intramolecular, es decir, la formación de una asa entre iterones.

Bastia y colaboradores desarrollaron un sistema

que permitió aislar las mutantes de π defectivas en la formación de asas. La propuesta básica es que π promueve la formación de asas entre γ y α o entre γ y β de manera mutuamente excluyente. El ori γ funciona entonces como un potenciador que transfiere a π, y probablemente a proteínas asociadas del huésped a los orígenes α o β. El origen γ se mantiene latente mientras α o β están en el mismo cromosoma.

Para favorecer el aislamiento de las mutantes se colocaron dos grupos de 7 iterones, conteniendo promotores, río arriba de un gen *lac Z*, de tal modo que estuvieran en la misma cara de la hélica del DNA y promovieran la transcripción del gen *lac Z* carente de promotor en ausencia de la proteína π. (Fig. 2). La presencia de π en el medio celular

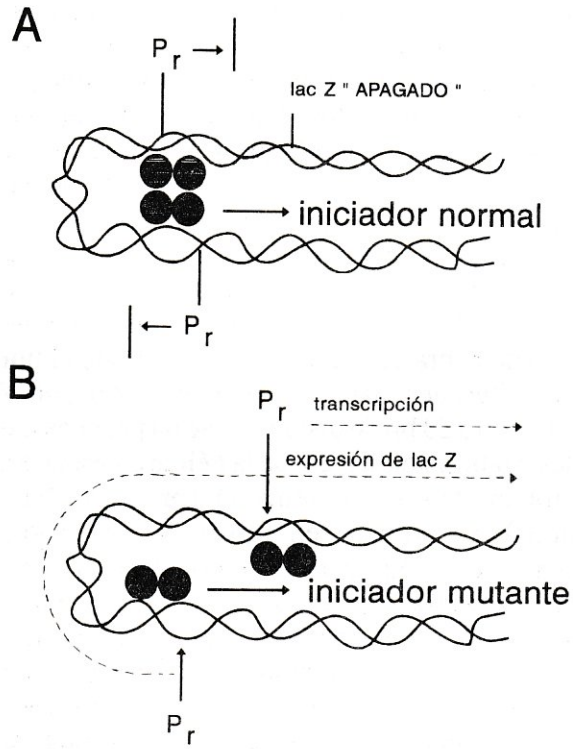

Figura 3. Estrategia para el aislamiento de mutantes de la proteína π defectivas en la asociación intramolecular de iterones (looping). *A.* La proteína π normal provoca contactos entre dos grupos de interones γ y evita que la RNA polimerasa active los promotores naturales incluidos en los interones, apagando la expresión del gen *lac Z*. *B.* La proteína π defectuosa no es capaz de evitar que la RNA polimerasa se asocie a los promotores, lo que permite la síntesis de la β-galactosidasa (12).

provocaría la formación de una asa entre los dos grupos de iterones, evitando que la RNA polimerasa se uniera al promotor y reprimiendo la expresión de *lac Z*. Las mutantes de π defectivas en la formación del asa se detectarían por su incapacidad para bloquear la transcripción de *lac Z* (colonias rojas en agar Mc Conkey-lactosa) (Fig. 3). Para asegurar que la pérdida de expresión de *lac Z* se debía a la formación del asa, más que a la unión independiente de π a los iterones, se diseñó una molécula que contenía los dos grupos de iterones en caras opuestas de la hélice del DNA, y se comparó su expresión de

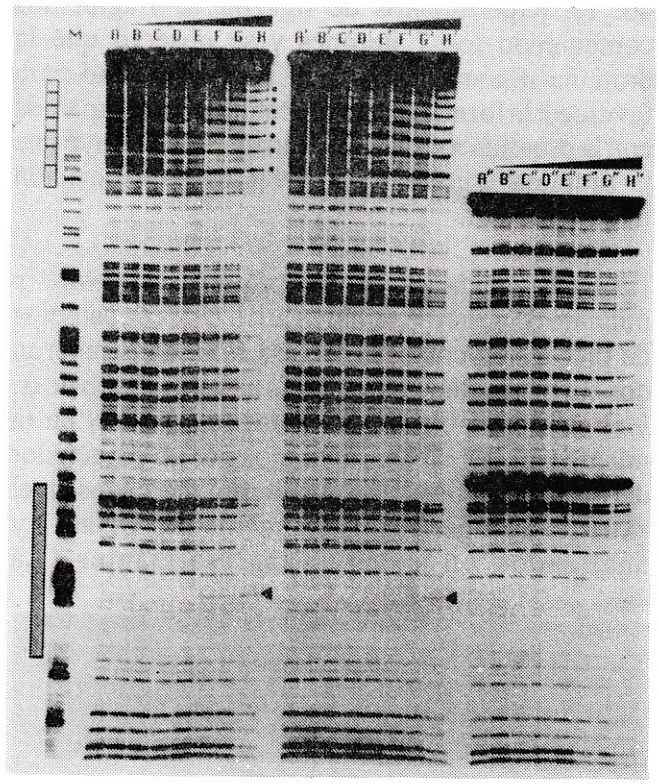

Figura 4. Autorradiogramas de geles de poliacrilamida al 10% con urea 6M mostrando las huellas de protección contra la DNasa (footprints) de las proteínas π silvestre y mutante sobre un fragmento α-γ y la de la proteína silvestre sobre un sustrato α. M, carril marcador mostrando una reacción de ruptura B—>A del sustrato α-γ marcado terminalmente. *Izquierda*: A. Huella obtenida en presencia de 0 ng de proteína π silvestre. B-H, huellas obtenidas en presencia de concentraciones crecientes de la misma proteína. Note que las 7 bandas incrementadas corresponden a los siete iterones del ori γ (●). La unión de la proteína silvestre al iterón α en la segunda G de la secuencia GAGGGG se manifiesta por la banda incrementada de la parte baja (◀). *Centro:* A'. Huella obtenida en presencia de 0 ng de la proteína mutante. B'-H', huellas obtenidas en presencia de concentraciones crecientes de la proteína π mutante con el sustrato α-γ. Note que no obstante que la proteína π mutante es tan eficiente como la proteína silvestre para unirse a los iterones γ, es mucho menos eficiente para unirse al iterón α (◀). Compare los carriles F, G y H con F', G' y H'. *Derecha:* A"-H", huellas de concentraciones crecientes de la proteína π silvestre sobre un sustrato de DNA α. Cada carril tiene las mismas cantidades de proteína π que los carriles correspondientes (A-H). Note la ausencia de unión (no hay banda incrementada) por la proteína π en el iterón α cuando el iterón γ no está presente en *cis* (12).

lac Z con la del plásmido con los iterones del mismo lado en presencia de la proteína π silvestre, encontrándose que el primero daba colonias rojas en Mc Conkey - lactosa, mientras que el segundo daba colonias blancas.

Con el esquema de selección anterior se aisló una mutante de π con un cambio Pro-Leu en la posición 46. En experimentos de ligazón de fragmentos conteniendo los 7 iterones γ se observó que la proteína mutante tenía muy baja capacidad para favorecer la formación de concatómeros, comparada con la proteína π silvestre, de lo que se concluyó que la proteína mutada tenia defectos de asociación intermolecular.

Las capacidades de las proteínas silvestre y mutante de π fueron también analizadas en estudios de protección contra la DNasa I. Se construyeron dos sustratos, uno conteniendo el único iterón de α, y el otro conteniendo los iterones de α y γ en la misma cara del DNA, separados por un espaciador de 147 bp. Ambos sustratos fueron marcados en el extremo 5', digeridos parcialmente con DNasa I y analizados en geles desnaturalizantes. La

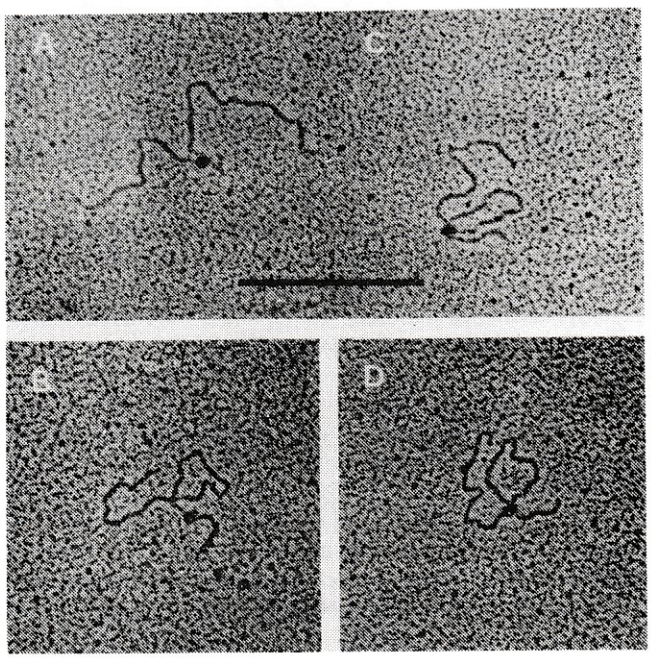

Figura 5. Ejemplos de complejos DNA-proteína entre un fragmento de DNA conteniendo el origen mínimo de P1 y proteína RepA purificada. La proteína está aparentemente en el sitio ori (A), en el sitio incA (B), y en los dos sitios simultáneamente, provocando la formación de una asa de DNA (C y D) (6).

comparación de las huellas de las dos proteínas con el sustrato α-γ reveló que ambas se unen con igual afinidad a los iterones γ. La interacción de la proteína π silvestre con el iterón α fue revelada por el incremento de la banda correspondiente a la segunda G de la secuencia GAGGG. La proteína π mutante no protegió ninguna zona del iterón α (Fig. 4) (12).

Una última observación interesante fue que las bacterias portadoras de la mutación en π tenían un elevado número de copias, lo que se interpretó como una desrepresión del ori γ causada por la deficiencia de la proteína π mutada para acoplar los orígenes γ y α (Fig. 3). Este modelo de regulación por acoplamiento intramolecular de iterones explicaría la acción inhibitoria de secuencias repetidas no próximas al origen sobre la replicación. La figura 5 muestra la microscopía electrónica de una asa de este tipo formada por la proteína RepA del fago P1 unida a los iterones del origen y a la región incA del mismo fago (6).

Existen diversos antecedentes de que la unión de las proteínas Rep a las secuencias repetitivas directas causa desnaturalización local de la hélice en regiones ricas en AT. En el caso del ori del fago lambda la región de hebra sencilla se extiende desde el límite de los iterones hasta el segmento rico en AT localizado a 23 bp de distancia. Se ha propuesto que la desestabilización local de la hélice causada por el complejo iterones-proteína O (proteína Rep de lambda), se propaga en forma de una onda de desnaturalización hasta la región rica en AT. La proteína RepIB de R1162 también es capaz de desnaturalizar localmente la región rica en AT del ori, después de interaccionar con las repeticiones directas de 20 bp del origen. Ésto se puso en evidencia mediante estudios de sensibilidad a la nucleasa P1, que digiere DNA de hebra sencilla (2). Mutaciones puntuales en la región rica en AT evitaron la desnaturalización. Una de las mutaciones en AT pudo ser suprimida por una mutación en repIb, lo que sugiere que *RepIB* interactúa no sólo con las DRs, sino también con el origen, causando fusión localizada de la región AT situada a 60 bp del sitio de unión de RepIB.

Dada la distancia entre las repeticiones directas de R1162 y su región rica en AT es difícil imaginar

que la desnaturalización de ésta ocurra por un mecanismo análogo al que se propone para el origen del fago lambda, es más sencillo suponer que RepIB interactúa directamente con el origen en una segunda

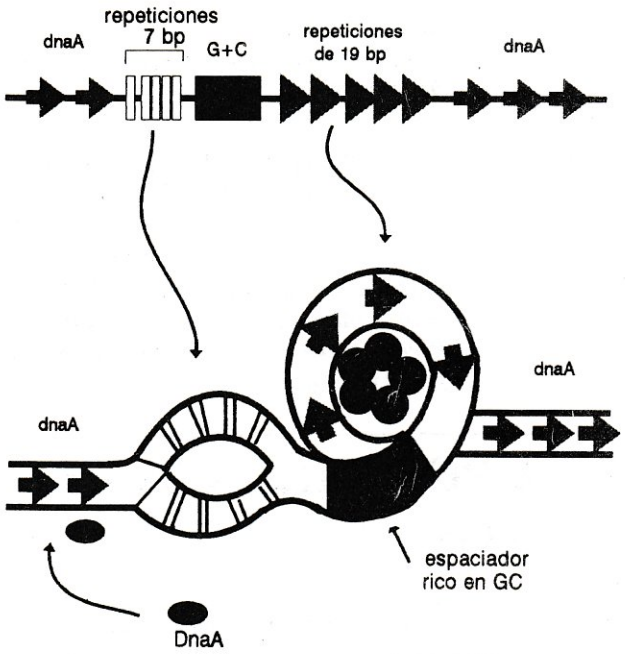

Figura 6. Modelo de los pasos tempranos de iniciación en el origen del plásmido P1. Las secuencias DnaA, las repeticiones de 7 bp, el espaciador rico en G+C, y las repeticiones RepA de 19 bp se muestran en forma de cajas. La unión de la proteína iniciadora RepA (círculos) a la región repetida de 19 bp curva el DNA, envolviéndolo en un núcleo de proteína. Contactos específicos entre el complejo y la región repetitiva de 7 bp provocan fusión de la hélice. Esto es dependiente de la posición relativa de las dos regiones definidas por el espaciador GC. Las cajas DnaA no son parte integral del complejo, pero sirven para capturar la proteína DnaA (óvalos) y colocarla en la región desnaturalizada, donde juega un papel en la formación del preiniciador sobre las hebras expuestas (13).

localización. Abeles y colaboradores (13) proponen una adaptación al modelo de Bramhill y Kornberg (14) para explicar el mecanismo de apertura del origen del plásmido P1. Según los autores la unión de la proteína iniciadora a una serie de repeticiones provoca que el DNA se envuelva en un núcleo de proteínas. Una secuencia aledaña responde a la distorsión del DNA y/o a la proteína unida en la primera región con una apertura de la doble cadena, evento necesario para la formación del iniciador de replicación. Las regiones propuestas para la apertura son en general ricas en AT (siendo P1 la excepción) y contienen secuencias repetidas. En el caso de P1 el complejo iniciador consiste de proteína RepA unida a las secuencias repetidas de 19 bp (Fig. 6).

Aunque se conoce a grandes rasgos el papel de los iterones en la promoción de la replicación y el control del número de copias de los plásmidos, existen todavía un gran número de interrogantes, tales como la forma en que se unen a las proteínas Rep. Sólo en unos cuantos casos (15) se han encontrado en estas proteínas estructuras típicas de unión al DNA, tales como regiones hélice-giro-hélice o zippers de leucina. Tampoco existe claridad sobre las posibles interacciones de los iterones y/o las proteínas Rep con las proteínas de replicación del huésped. Probablemente el esquema se aclarará en un futuro cercano.

REFERENCIAS

1. Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. Microbiol Rev *51:* 381-395.

2. Yung-Jin, K. y R.J, Meyer (1991). An essential iteron-binding protein required for plasmid R1162 replication induces localized melting within the origin at a specific site in AT-rich DNA. J. Bacteriol. *173:* 5539-5545.

3. Persson, C. y Nördstrom, K. (1986). Control of replication of the broad host range plasmid RSF1010: The incompatibility determinant consists of directly repeated DNA sequences. Mol. Gen. Genet. *203:* 189-192.

4. Lung-Shen, L., Yung-Jin, K. y Meyer, R.J. (1987). The 20 bp, directly repeated DNA sequence of broad host range plasmid R1162 exerts incompatibility *in vivo* and inhibits R1162 DNA replication in vitro. Mol. Gen. Genet. *208:* 390-397.

5. Lung-Shen, L. y Meyer, R.J. (1986). Directly repeated, 20-bp sequence of plasmid R1162 DNA is required for replication, expression of incompatibility, and copy-number control. Plasmid *15:* 35-47.

6. Pal, S.K. y Chattoraj, D.K. (1988). P1 plasmid replication: Initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. J. Bacteriol. *170:* 3554-3560.

7. Chattoraj, D., Cordes, K. y Abeles, A. (1984). Plasmid P1 replication: Negative control by repeated DNA sequences. Asoc. Natl. Acad. Sci (USA) *81:* 6456-6460.

8. Chattoraj, D.K., Abeles, A. y Yarmolinsky, M.B. (1985). P1 plasmid maintenance: A paradigm of precise control. En Plasmids in Bacteria. Eds Helinsky, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A. y Hollaender, A. Plenum Press, N.Y. pp 355-381.

9. Perri, S. y Helinsky, D.R. (1993). DNA sequence requirements for interaction of the RK2 replication initiation protein with plasmid origin repeats. J. Biol. Chem. *268:* 3662-3669.

10. Perri, S., Helinsky, D.R. y Toukdarian, A. (1991). Interactions of plasmid-encoded replication initiation proteins with the origin of DNA replication in the broad host range plasmid RK2. J. Biol. Chem. *266:* 12536-12543.

11. Mc Eachern, M.J., Bott, M.A., Tooker, P.A. y Helinsky, D.R. (1989). Negative control of plasmid R6K replication: Possible role of intermolecular coupling of replication origins. Proc. Natl. Acad. Sci *86:* 7942-7946.

12. Miron, A., Mukherjee, S. y Bastia, D. (1992). Activation of distant replication origins *in vivo* by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. EMBO J. *11:* 1205-1216.

13. Brendler, T., Abeles, A. y Austin, S. (1991). Critical sequences in the core of the P1 plasmid replication origin. J. Bacteriol. *173:* 3935-3942.

14. Bramhill, D. y Kornberg, A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. Cell *54:* 915-918.

15. Nieto, C., Giraldo, R., Fernández-Tresguerres, E. y Díaz, R. (1992). Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar savastanoi. J. Mol. Biol. *223:* 415-426.

LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III DE PROCARIOTOS

José Luis Muñoz-Sánchez. Laboratorio de Regulación Celular, Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, México, D. F. 11340.

RESUMEN

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la perpetuación del material hereditario de los organismos vivos es tema central de la Biología moderna, ya que dependiendo de la fidelidad con se copie la información genética, dependerá la subsistencia de la especie a la que pertenecen los caracteres hereditarios. Esta función, en bacterias, es llevada a cabo por un complejo multiproteico, el cual ha recibido el nombre de Holoenzima de la DNA polimerasa III. En esta asombrosa estructura, al interaccionar entre sí y con el DNA sus subunidades proteicas componentes, se da un mecanismo perfectamente sincronizado con una alta continuidad y una velocidad increíble y aún así con un alto grado de perfección.

PALABRAS CLAVE: DNA polimerasa III, holoenzima, replicación, continuidad, estados de agregación de Pol III.

INTRODUCCION

De acuerdo con Portugal y Cohen (1), en 1969 se cumplieron 100 años de que se inició la historia del ácido desoxirribonucleico, con el aislamiento de esta macromolécula por F. Miescher. Posteriormente, en 1953, con el advenimiento del trabajo de James Watson y Francis Crick, se intensificó la investigación en los campos relacionados con esta substancia, entre ellos, el de cómo se lleva a cabo su duplicación durante el ciclo celular. Así, el trabajo pionero de M. Meselson y F. W. Stahl, en 1958, demostró que la replicación del DNA en bacterias, se efectúa de una manera semiconservativa; es decir, sobre cada una de las hebras de la doble cadena del DNA, se sintetizan las cadenas complementarias y estos híbridos de DNA-progenitor (que funciona como molde o plantilla) con el DNA de síntesis *de novo*, son los que se transfieren a la progenie. Este modelo, estuvo de acuerdo con la hipótesis planteada por Watson y Crick como corolario de la estructura por ellos propuesta para el DNA: que en el momento de la replicación, la doble cadena se abriría y cada una de las hélices serviría como molde para la síntesis de las cadenas complementarias (2, 3).

Tal vez con esta idea en mente, surgieron los

trabajos primarios de quien, hasta la fecha, ha hecho la mayor aportación para la elucidación del mecanismo de la síntesis del ácido desoxirribonucleíco: Arthur Kornberg. En sus primeras publicaciones, Kornberg detalló los procedimientos para aislar una enzima que llevase a cabo la síntesis del DNA. En ellas, describió las características de la proteína a la que denominó DNA polimerasa.

Entre las características de esta enzima, se encuentra que, además de poseer la capacidad de polimerizar desoxirribonucleótidos utilizando un DNA molde en presencia de un catión divalente (siendo este el Mg^{2+} en condiciones fisiológicas), requiere de un iniciador que provea un extremo 3'-OH, para que a partir de él se unan los nucleótidos subsecuentes; posee dos actividades de exonucleasa, una que actúa en dirección 3'——>5' y la otra en la dirección opuesta; también posee una característica intrínseca la cual comparte con todas las DNA polimerasas aisladas y analizadas a la fecha: la actividad de polimerización únicamente la presenta en la dirección 5'——>3'(2). Con este polipéptido y teniendo como DNA molde el genoma circular de cadena sencilla del bacteriófago ϕX174, Kornberg y colaboradores, fueron capaces de sintetizar en tubo de ensayo por vez primera un DNA que poseía las mismas características de actividad biológica que el DNA natural. Por este trabajo, Kornberg recibió el premio Nobel. En 1968, R. Okazaki y colaboradores informaron la presencia de pequeños fragmentos de DNA durante el proceso de la replicación y propusieron la hipótesis de que una de las cadenas del DNA (la de polaridad 5'——>3') se sintetiza en forma discontínua, proveyendo así un mecanismo para explicar el por qué una polimerasa con actividad solamente en una dirección, pueda sintetizar ambas cadenas del DNA (2, 3). Sin embargo, en 1969 apareció publicado un trabajo de Cairns y DeLucia, en el cual informaron el aislamiento de una mutante con una actividad muy baja de la DNA polimerasa de Kornberg; mutante a la que denominaron pol. Dicha cepa era idéntica en todas sus características a la cepa silvestre de *Escherichia coli*, con la excepción de presentar la propiedad de una resistencia disminuida a la irradiación con luz ultravioleta. Con el aislamiento de esta mutante, quedó demostrado que la DNA polimerasa de Kornberg, no era la enzima que llevaba a cabo el proceso de la replicación del DNA. En ese mismo año, trabajos hechos en el laboratorio del mismo Kornberg, informaron el aislamiento de dos nuevas proteínas con actividad de DNA polimerasas, a las que denominaron pol II y III, respectivamente. Sin embargo, el polipéptido llamado pol III, era inactivo bajo las condiciones de ensayo en que las otras dos polimerasas sí presentaban actividad. Estos datos comenzaron a realzar el hecho de que la polimerasa III, tenía propiedades distintas a las otras polimerasas (2, 3).

I. EL MECANISMO DE ALARGAMIENTO DE LAS CADENAS DE DNA DURANTE LA REPLICACION.

Al iniciarse la década de los 70, en varios laboratorios se hicieron contribuciones importantes en el área de la replicación del DNA. Además del grupo dirigido por Kornberg, los trabajos hechos por los grupos bajo las direcciones de K. G. Lark, S. Wickner, J. Hurwitz, T. Horiuchi, O. Maalϕe, etc. y más recientemente M. O'Donnell, C. McHenry, etc., han hecho también su aportación para el esclarecimiento del mecanismo de la replicación del DNA.

En la década anteriormente mencionada, se hizo un uso exhaustivo de las mutantes de replicación sensibles a la temperatura, tanto para lograr el aislamiento de los productos proteínicos involucrados en el proceso de la replicación, como para experimentos tendientes a esclarecer cuál es su función.

De esta manera, se propuso que, en tanto que en la cadena molde con dirección 3'——>5' la replicación se lleva a cabo en forma contínua (cadena directriz), en la que posee la polaridad 5'——>3', la síntesis se efectúa en fragmentos (cadena de rezago). Además, mediante experimentos de "reconstitución" (sistemas *in vitro*, en los cuales se añaden las proteínas en un alto grado de homogeneidad), se va logrando el conocimiento de qué proteínas se requieren en los diferentes estadios de la replicación: Iniciación, Alargamiento y Terminación.

A fin de lograr el sistema de ensayo *in vitro* de replicación del DNA, se fraccionaron los "factores del sobrenadante" de los primeros experimentos de

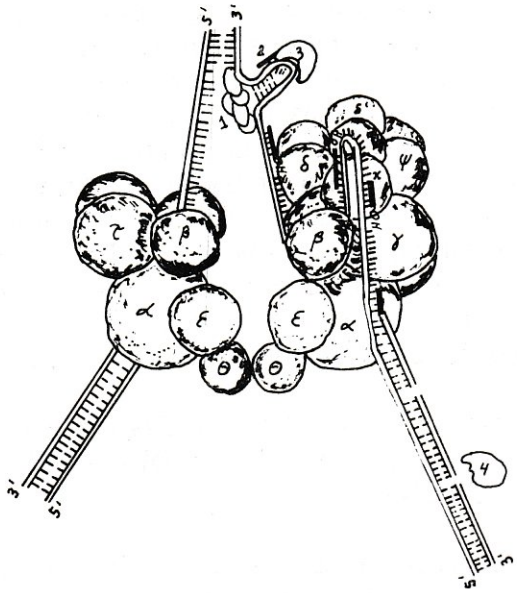

Figura 1. Mecanismo propuesto para explicar la actividad de síntesis conjunta de las cadenas guía (3'—>5') y de rezago (5'—>3') del DNA, por el dímero asimétrico de la holoenzima de la DNA polimerasa III.

1. Complejo del Promotor móvil que sintetiza al RNA iniciador de los fragmentos de Okazaki.
2. RNA iniciador
3. DnaG (Iniciasa)
4. Dna Ligasa

Modificada de las referencias 4 y 11.

Kornberg y colaboradores, lográndose aislar polipéptidos para los cuales no se tenía el dato de qué genes los codificaban, como fueron los casos para las proteínas denominadas inicialmente i, n, n', n'', que son constituyentes esenciales para dar la actividad de "iniciosoma" (primosome), ahora denominados Dna T, PriA, PriB y PriC. Este fue el caso también para algunas de las proteínas que forman parte del complejo proteínico que da la actividad de pol III: las proteínas δ, δ', ψ, χ, y θ, cuyos genes (*hol*, Tabla I), fueron identificados mediante la llamada *genética inversa* (proceso en el cual, a partir del conocimiento de una parte de las secuencias de los aminoácidos de las proteínas respectivas, se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes y por hibridación de ellos a fragmentos de DNA de *E. coli* clonados en plásmidos, se logró la identificación de los genes correspondientes). Teniéndose ya un sistema *in vitro* de ensayo para llevar a cabo la replicación del DNA, se hicieron los experimentos correspondientes para hacer la disección de las funciones que cada proteína requerida en este sistema, lleva a cabo.

De esta manera, se tiene el conocimiento de que en el proceso de alargamiento de las cadenas del DNA, participan en forma fundamental, dos grandes conglomerados de proteínas, uno de los cuales es conocido con el nombre de "iniciosoma" (primosome), que participa en la síntesis del RNA iniciador

TABLA I
SUBUNIDADES PROTEINICAS QUE CONSTITUYEN A LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III DE ENTEROBACTERIAS

SUBUNIDAD	PESO MOLECULAR (Mr)	GEN ESTRUCTURAL
α	129,900	*dna*E
τ	71,100	*dna*X
γ	47,500	*dna*Z*
β	40,600	*dna*N
δ	34,000	*hol*A
δ'	32,000	*hol*B
ε	27,500	*dna*Q (*mut*D)
ψ	14,000-16,000	*hol*D
χ	12,000-14,000	*hol*C
θ	10,000	*hol*E

*Este gen se encuentra dentro de *dna*X; el RNA mensajero se produce por un cambio del marco de lectura traduccional.

Datos tomados de las referencias 6 y12.

en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, formando parte de él las proteínas DnaB, DnaC, DnaT (i), PriA (n'), PriB (n), PriC (n'') y DnaG (iniciasa). El otro, es el complejo de la holoenzima de la DNA polimerasa III.

II. LAS DNA POLIMERASAS DE *Escherichia coli.*

En la bacteria *Escherichia coli*, se ha informado la presencia de tres actividades de DNA polimerasa, las cuales han sido denominadas Pol I, Pol II y Pol III. La primera de ellas es la enzima originalmente descrita por Kornberg, a la cual, en la actualidad, se le ha asignado como papel principal el de reparación de daños en las cadenas del DNA. La segunda, ha sido poco estudiada; sin embargo, existen informes en los cuales se le atribuye también el papel de reparación, pero bajo el control de la proteína LexA, la cual es el represor de las funciones del regulón

SOS, de respuesta al daño al DNA. A la tercera de ellas, se le ha atribuído el papel de llevar a cabo la síntesis del genóforo de la bacteria *E. coli.*

Sin embargo, a diferencia de las dos primeras polimerasas cuya actividad polimerizante radica en un solo polipéptido, la actividad de polimerasa III, requiere de la participación de cuando menos 10 diferentes cadenas polipeptídicas (4 y 5), para que realice plenamente su función.

III. LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III.

El gran complejo multiproteínico denominado holoenzima de la DNA polimerasa III (DNA pol IIIHE) (6), es el que lleva a cabo la síntesis replicativa del genóforo de *E. coli.* Este complejo contiene, cuando menos, 10 diferentes subunidades, cada una con una función especializada, para lograr una replicación eficiente. En la actualidad, se ha logrado purificar a este conjunto de proteínas en forma homogénea y contiene cantidades equimoleculares de cada uno de sus componentes, excepto la subunidad beta, la cual se encuentra en una proporción del doble que los demás componentes (4, 6), lo cual tal vez indique que esta proteína tenga un papel de especial relevancia, idea que es reforzada por el dato de que su cantidad en la célula, es particularmente grande: aproximadamente 300 veces la que se necesitaría para que forme parte del complejo de Pol III (6). Anteriormente, tanto en el laboratorio de Kornberg, como en el de Hurwitz se aislaron, utilizando métodos de separación estándar (fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografías de filtración en gel, de intercambio iónico, centrifugación en gradientes con diferentes substancias, etc.) diferentes formas de agregación que presentaban actividad de esta polimerasa. Estos diferentes estados de agregación (Tabla II) estaban constituidos por el núcleo de la polimerasa o por ésta y algunos de sus factores accesorios.

El núcleo de la polimerasa III, está compuesto por tres subunidades, las cuales no se disocian al someterlas a cualquier tipo de cromatografía. Estas subunidades son la alfa, con una masa molecular de 140 kD, la cual está codificada por *dna*E (*pol*C), y que posee la actividad de polimerización de los nucleótidos; la subunidad épsilon, codificada por *dna*Q (*mut*D), la cual posee la actividad de exonucleasa de corrección (7), y la subunidad theta (*hol*E), a la cual no se le ha podido asignar aún una función específica. Esta forma, aunque es la que posee la función clave de polimerización, tiene un muy pobre grado de continuidad, pues se disocia del DNA después de haber polimerizado, en promedio, alrededor de 10 nucleótidos; semejando, en este respecto, a la continuidad de Pol I. La presencia de las subunidades

TABLA II. ESTADOS DE AGREGACION EN QUE SE HA AISLADO A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA DNA POLIMERASA III.

Denominación	Subunidades que la constituyen	"Continuidad"*	Actividad característica
Holoenzima	$\alpha, \varepsilon, \theta, \tau, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi, \beta$.	>5,000-150,000	Síntesis de DNA de fagos de una sola cadena.
Holoenzima reconstituída	$\alpha, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi, \beta$.	3,000	Síntesis de DNA *in vitro*.
Pol III*	$\alpha, \varepsilon, \theta, \tau, \gamma, \delta, \delta', \chi, \psi$.	200	Síntesis de DNA estimulada por la proteína SSB
Pol III'	$\alpha, \varepsilon, \theta, \tau$.	60	Síntesis limitada de cadenas de DNA largas, en presencia de espermidina.
Pol III (núcleo)	$\alpha, \varepsilon, \theta$.	10	Síntesis de cadenas cortas de DNA 3'--->5' y actividad de exonucleasa de 5'----->3'.

* La "continuidad" es el número de nucleótidos que son polimerizados por unidad de DNA molde en cada caso de asociación de la polimerasa al DNA molde-catálisis (adición de nucleótidos) disociación de la polimerasa del DNA molde.
Datos tomados de las referencias 2, 5 y 12.

accesorias, le da el alto grado de continuidad observado en el núcleo de la polimerasa III.

Las subunidades gamma y tau, ambas codificadas en *dna*X, se encuentran en cantidades equimoleculares en la holoenzima. La proteína más pequeña de las dos, γ, se sintetiza por un cambio de marco de lectura traduccional muy eficiente, el cual provoca que el ribosoma encuentre rápidamente un codón de terminación en la secuencia del RNA mensajero y termine la traducción alrededor de dos tercios de la longitud total del mensajero (5 y 8). Las mutaciones que afectaban únicamente a tau, llamadas originalmente *dna*Z, se descubrió que están realmente en el gen *dna*X. Al interaccionar con las subunidades alfa de dos núcleos enzimáticos, un dímero de la subunidad gamma puede dimerizar a la polimerasa. El que gamma sea el responsable principal de la forma dimérica de la DNA Pol IIIHE, queda aún por aclarar.

La subunidad gamma se asocia a las otras subunidades accesorias (delta, delta prima, xi y psi), asociación la cual, junto con la subunidad beta, le confiere su alta continuidad a la holoenzima. Un poco antes de que comience la síntesis del DNA, la subunidad beta es introducida al DNA de doble cadena por el complejo gamma, en alguna muesca que el DNA presenta. El complejo gamma tiene una actividad de ATPasa dependiente de DNA, que de manera particular reconoce a un DNA que posea un iniciador. Esta actividad de ATPasa es estimulada por la subunidad beta. Una vez introducida al DNA, la subunidad beta puede moverse libremente en cualquier dirección en el DNA, en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP (6, 9 y 10). Esta asociación de beta con el DNA, es extremadamente estable y sólo se disocia de cadenas lineales de DNA, cuando alcanza alguno de sus extremos. Es por esto que la subunidad beta ha sido descrita como una pinza deslizante, actividad que es clave en el alto grado de continuidad que posee la holoenzima (Fig. 2). La estructura de la subunidad beta, deducida a partir de patrones de difracción de rayos X por Kong y col (6), da elementos para explicar el papel de pinza deslizante que posee beta; el dímero de beta es una estructura exagonal constituída por dos subunidades orientadas en forma opuesta una de la otra, lo cual crea un orificio central en esta estructura con dimensiones ligeramente mayores al diámetro de la molécula de DNA. Esta forma circular, al envolver al

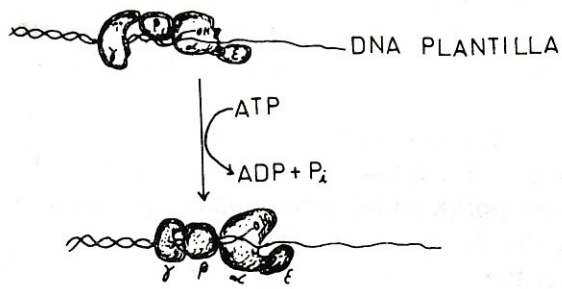

Figura 2. Actividad de ATPasa del complejo gamma-beta, proteínas del complejo de la holoenzima de la DNA polimerasa III, mediante la cual se introduce a la proteína beta (actividad de pinza deslizante) a la doble cadena de DNA, para comenzar la síntesis del DNA con un alto grado de continuidad (síntesis procesiva). También se muestran las interacciones del complejo gamma con las subunidades alfa (actividad de polimerasa) y épsilon (actividad de exonucleasa de corrección) de la polimerasa III. Modificada de las referencias 9 y 10.

DNA pudiera permitir una asociación extremadamente fuerte, pero que permite un deslizamiento expedito sobre él.

IV. LA FORMA DIMERICA DE LA HOLOENZIMA DE LA DNA POLIMERASA III.

Alberts y col indicaron que durante los ciclos múltiples que se llevan a cabo de síntesis de los fragmentos de Okazaki, la polimerasa que actúa en la cadena de rezago debería de disociarse del molde y del DNA recién sintetizado por ella, después de haber terminado la síntesis del fragmento, por lo que para que se efectuase la síntesis del siguiente fragmento de Okazaki, la misma polimerasa u otra presente en el sitio de la replicación, debería asociarse nuevamente al DNA molde. La observación de que complejos de replicación aislados por cromatografía de filtración en gel, después de haberles añadido los cuatro dNTPs y el DNA molde (cadena de DNA del fago ϕX174), pueden llevar a cabo la síntesis de la forma replicativa RFII en 10 o 15 segundos y de que la subunidad beta (y posiblemente todos los demás componentes de la holoenzima de Pol III) permanece asociada en una forma bastante estable con los complejos de iniciación y de terminación de la replicación, durante cuando menos 30 minutos (5), detectaron un problema en los sistemas *in vitro* de replicación ya que un fragmento de Okazaki se sintetiza en la cadena de rezago del DNA cada segundo, a una temperatura de 37°C. Por lo tanto, se requeriría que la polimerasa que actúa en la

cadena de rezago, en cada segundo sintetizara un fragmento de cerca de 1,000 nucleótidos de longitud, se disociara y se volviese asociar al DNA en el sitio donde estuviera el siguiente RNA iniciador, por lo que la velocidad de disociación de la holoenzima de 30 minutos, observada en los sistemas *in vitro*, es considerablemente más lenta que la que se requeriría *in vivo* para llevar a cabo la replicación del DNA.

Shina y col (5), han propuesto que, para maximar la eficiencia y la velocidad del proceso de la replicación en la cadena de rezago, la polimerasa debería permanecer unida a la horquilla de replicación por medio de la interacción de subunidades proteínicas a la polimerasa que sintetiza el DNA de la cadena guía en tanto se transloca la polimerasa de la cadena de rezago al nuevo RNA iniciador. A pesar de los esfuerzos hechos para tratar de demostrar esta hipótesis, a la fecha se tiene poca evidencia que la confirme. Por otra parte, existen datos que apoyan fuertemente la idea de que la DNA Pol IIHE, es un dímero, constituido por dos núcleos de Pol III, con sus correspondientes subunidades accesorias. Kornberg y col (4), han propuesto que el dímero de la DNA Pol IIIHE, posee la siguiente estructura: (alfa, épsilon, theta, $beta_2)_2 tau_2$-$gamma_2$(delta, delta prima, psi, $xi)_2$. Puesto que se tienen pruebas que indican que la DNA Pol IIIHE puede existir en forma de un dímero asimétrico (4, 11 y 12), se ha propuesto que la replicación del DNA se lleve a cabo al unísono en ambas cadenas (la de rezago y la guía) como se representa en la figura 1 (4 y 11). Esto presupone una cooperatividad entre las diferentes subunidades proteínicas que componen a la DNA Pol IIIHE, lo cual a su vez daría una alta continuidad al proceso de replicación del DNA.

La diferencia esencial entre las polimerasas I y II y la holoenzima de Pol III, radica más que nada en sus grados de continuidad, la cual es máxima en la polimerasa III. Esta diferencia se puede visualizar como se representa en la figura 3. Este es el principal argumento para que se afirme que es ese maravilloso prodigio de la naturaleza, la holoenzima de la DNA polimerasa III, la que lleva a cabo con una fidelidad asombrosa y una velocidad casi increíble, la síntesis del material genético en bacterias.

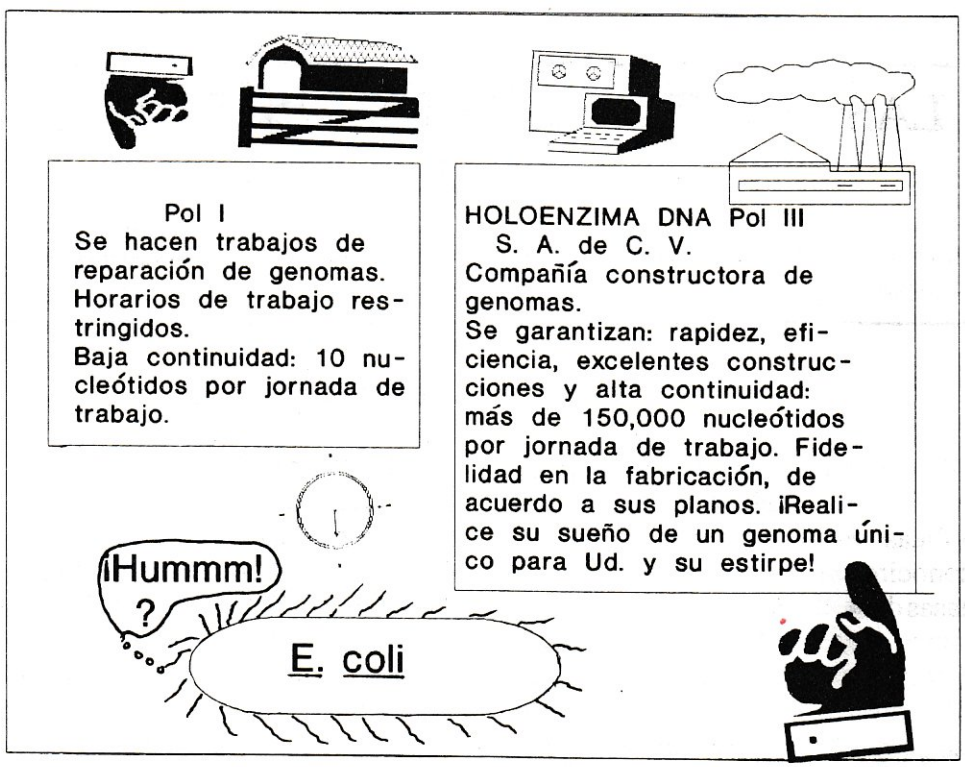

Figura 3. Diferencia fundamental entre las actividades de la DNA polimerasa I y la de la holoenzima de la DNA polimerasa III.

REFERENCIAS

1. Portugal, F. H. y J. S. Cohen. (1972). A century of DNA. A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance. MIT Press, Cambridge.

2. Kornberg, A. (1978). Síntesis del DNA. H. Blume Ed. Madrid.

3. Stent, G. S. y R. Calendar. (1971). Molecular Genetics. An introductory narrative. 2nd. Ed. Freeman and Co. San Francisco. p. 199-250 y 607-632.

4. Maki, H.; S. Maki y A. Kornberg. (1988). DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. IV. The holoenzyme is an asymmetric dimer with twin active sites. J. Biol. Chem. *263:* 6570-6578.

5. Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. Annu. Rev. Biochem. *61*: 673-719.

6. Baker, T. A. y S. H. Wickner. (1992). Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. *26:* 447-477.

7. Hard, K.; H. Scheurmann y H. Echols. (1984). A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *81*:7747-7751.

8. Flower, A. M. y C. S. McHenry. (1990). The gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* is produced by ribosomal frameshifting. Proc. Natl Acad. Sci. USA. *87:* 3713-3717.

9. Onrust, R.; T. Stukenberg y M. O'Donnell. (1991). Analysis of the ATPase subassembly which initiates processive DNA synthesis by DNA polymerase III holoenzyme. J. Biol. Chem. *266*: 21681-21686.

10. Stukenberg, P. T.; P. S. Studwell-Vaughan y M. O'Donnell. (1991). Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. J. Biol. Chem. *266*: 11328-11334.

11. Hübscher, U. (1984). DNA polymerase holoenzymes. TIBS *9:* 390-393.

12. McHenry, C. S. (1991). DNA polymerase III holoenzyme. J. Biol. Chem. *266:* 19127-19130.

LAS PROTEINASAS DE CISTEÍNA DE *Entamoeba histolytica*

Ruy Pérez Montfort, Nallely Cabrera González, y Emma SaavedraLira. Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular,.U.N.A.M., Apartado Postal 70-242, 04510 México D.F.

RESUMEN

La destrucción de tejidos en algunas formas invasivas de la amibiasis puede estar mediada por enzimas proteolíticas. En este trabajo se revisan algunos de los conocimientos que se han adquirido sobre las proteinasas de la clase catalítica de cisteína, la más abundante en *Entamoeba histolytica*. Actualmente se conoce la secuencia de tres genes que codifican diferentes proteinasas de cisteína y se han estudiado las propiedades bioquímicas de dos de ellas: la "amebapaína" y la "histolisina".

PALABRAS CLAVE: *Entamoeba histolytica,* proteínasa, cisteína.

INTRODUCCION

Una enfermedad que a finales del siglo XX todavía es relativamente común en México, es la amibiasis. Esta enfermedad, que afecta casi exclusivamente a los humanos, se produce por la infección con el protozoario parásito *Entamoeba histolytica*. Aunque en aproximadamente un 90% de las infecciones hay distintos grados de síntomas a nivel gastrointestinal, en el 10% restante se presentan manifestaciones graves que, en ausencia de tratamiento, resultan fatales para el enfermo.

Esto ocurre en la complicación más común: el absceso hepático amibiano.

Para que *E. histolytica* pueda producir absceso en el hígado es necesario que invada el tejido de su hospedero. Desde hace ya bastantes décadas se ha pensado que el comportamiento invasivo de distintos tipos de células o tejidos se puede deber, en parte, a las enzimas proteolíticas que produce. En el caso de *E. histolytica*, Councilman y LaFleur sugirieron en 1891, que las amibas tienen una acción disolvente sobre el tejido infectado. Tres años más tarde Roos postuló la existencia de una toxina cuya liberación provocaba la destrucción de las células del epitelio intestinal, ya que sus observaciones le indicaban que la invasión del tejido era un fenómeno secundario a la proliferación de las amibas en la mucosa. Fue Schaudinn quien nueve años más tarde, en 1903, estudió a estas amibas y les dio el nombre de *E. histolytica* por su supuesto efecto lítico sobre los tejidos. Después de estos estudios, pasaron alrededor de 50 años antes de que se volviera a publicar una investigación sobre las enzimas proteolíticas de estas amibas.

PRIMEROS ESTUDIOS SOBRE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EN *E. histolytica*

Para poder realizar los primeros estudios bioquímicos sobre las enzimas proteolíticas en *E. histolytica* fue necesario desarrollar métodos de cultivo de las amibas *in vitro*. El cultivo de amibas se logró a principios de siglo, pero éste siempre debió ser en presencia de bacterias u otros microorganismos asociados a las amibas. No fue sino hasta 1961 cuando se logró el cultivo *axénico* (en ausencia de microorganismos asociados) por Diamond (1), de manera que todos los estudios hechos antes de esa fecha fueron realizados con cultivos de amibas que tenían uno (*monoxénicos*) o muchos microorganismos asociados (*xénicos*). Actualmente se considera que las investigaciones realizadas antes del desarrollo del cultivo axénico tienen poca relevancia, debido a que estudiaron poblaciones mezcladas de células y aunque en muchos trabajos se hicieron los controles que establecían que la población de células asociadas no tenía o mostraba muy poca actividad proteolítica, nunca se pudo descartar la posibilidad de que lo que se observaba era el producto de la interacción o la influencia de la (o las) célula(s) asociada(s) con las amibas. A la luz de los conocimientos actuales, varios de los trabajos hechos en esas condiciones tienen resultados generalmente confusos y en algunos casos, erróneos. Sin embargo, en múltiples estudios que se hicieron por varios grupos antes de 1961, se llegaron a algunas conclusiones que todavía se consideran correctas. Entre estas conclusiones están: a) que *E. histolytica* posee enzimas proteolíticas muy activas capaces de degradar varios sustratos proteínicos como gelatina, caseína, albúmina, etc., así como péptidos pequeños, b) que las amibas intactas o lisadas poseen productos tóxicos con actividad proteolítica, c) que las actividades tóxicas y de proteólisis pueden ser inhibidas por componentes del suero.

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas o proteasas, hidrolizan proteínas o péptidos. Estas se han clasificado en dos grandes grupos que son las proteinasas o endopeptidasas y las exopeptidasas (Fig. 1). Las exopeptidasas cortan enlaces peptídicos de los extremos de los péptidos o proteínas y reciben su nombre por la especificidad de los grupos que atacan. Las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos alejados de los extremos de la proteína o péptido y se clasifican por el mecanismo catalítico con el que rompen el enlace peptídico. Se piensa que por lo menos, existen cuatro grupos de proteinasas que son: las de serina, cisteína, aspártico y metaloproteinasas. Se ha determinado que el mecanismo catalítico de cada uno de estos cuatro grupos de proteinasas incluye en forma muy importante a una agrupación de aminoácidos en el sitio activo y los tres primeros grupos derivan su nombre del aminoácido principal. Las metaloproteinasas tienen un requerimiento absoluto de metales como cofactores. El metal más común es el cinc, pero existen algunas enzimas que utilizan otros metales. Gracias a que el mecanismo catalítico, la estructura y la función del sitio activo están conservados en las distintas clases de proteinasas, éstas comparten ciertas características como su sensibilidad a diferentes inhibidores y activadores así como el pH al que tienen su actividad óptima. Muchas veces esto permite asignar a qué clase catalítica pertenece una enzima purificada, o a veces un conjunto de enzimas, con relativa facilidad.

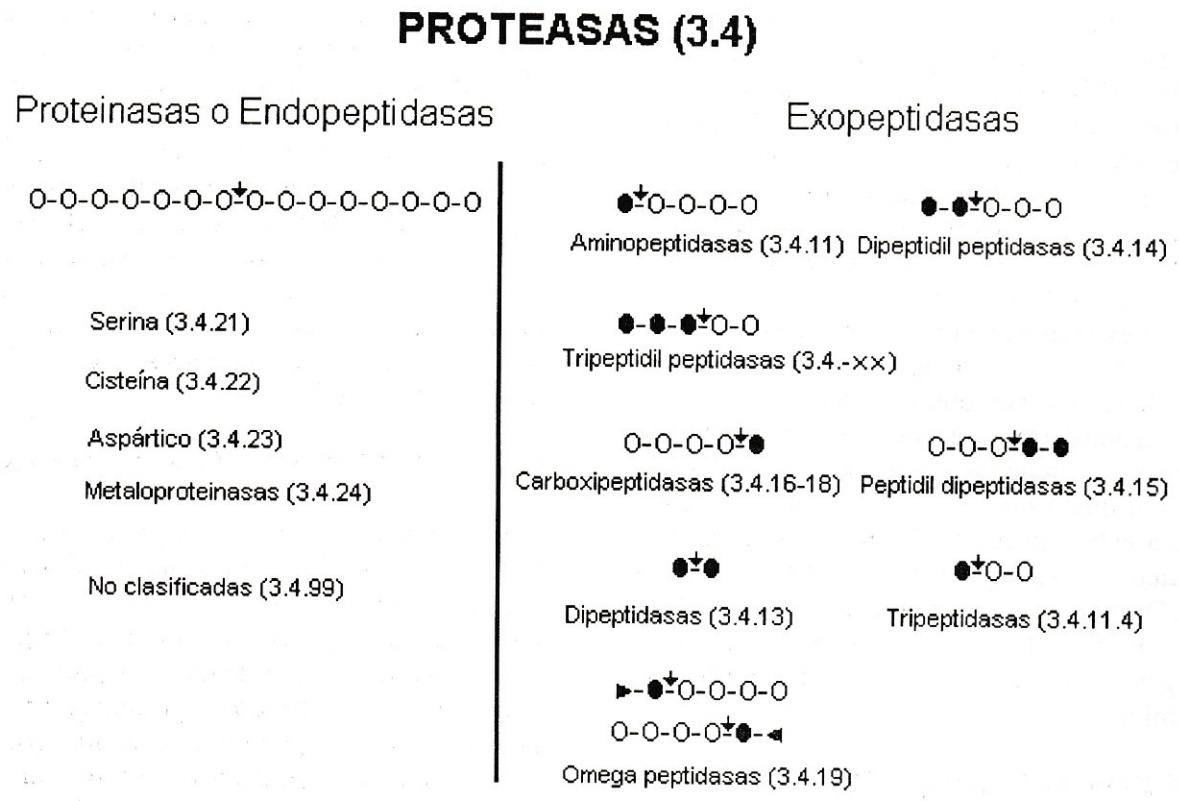

Figura 1. Clasificación de las enzimas proteolíticas. Todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos se denominan proteasas. A su vez estas se dividen en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas se clasifican con base en su mecanismo catalítico, mientras que las exopeptidasas se clasifican con base en su especificidad por el sustrato. En estas últimas los círculos vacíos representan aminoácidos que permanecen en la cadena y los círculos llenos los del fragmento que se separa. Los triángulos representan extremos amino y carboxilo terminales bloqueados. Los números entre paréntesis indican la división a la que han sido asignadas las enzimas según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica. (Las tripeptidil peptidasas todavía no reciben un número.)

Hasta la fecha sólo se han estudiado endopeptidasas en *E. histolytica*. Quizá la falta de interés por el estudio de las exopeptidasas se deba a que se piensa que el ataque hidrolítico inicial sobre una proteína lo hacen las endoproteinasas y que las exopeptidasas sólo terminan la digestión de los péptidos que producen las primeras. Sin embargo, *E. histolytica* debe poseer varias enzimas con actividad de exopeptidasa (que inclusive pudieran ser también endopeptidasas, ya que se han descrito enzimas con ambos tipos de actividad en otros casos) cuyas características y propiedades todavía no se han explorado.

ESTUDIOS CON CULTIVOS AXÉNICOS

McLaughlin y Faubert en 1977 (2) fueron los primeros en estudiar a las enzimas proteolíticas en una cepa de *E. histolytica* cultivada en forma axénica. Ellos identificaron y purificaron parcialmente dos proteinasas, una de aspártico y otra de cisteína. La proteínasa de aspártico tenía una masa molecular de 41 kDa y un pH óptimo de 3.5, con hemoglobina como sustrato. La proteínasa de cisteína tenía una masa molecular de 27 kDa y su pH óptimo fue de 6.0, utilizando azocaseína como sustrato. En este trabajo, así como en algunos posteriores, se equipararon a las proteinasas de *E. histolytica* con proteinasas conocidas de células de mamíferos, por compartir algunas de sus propiedades. Así, se comparó a la proteínasa de aspártico con la catepsina D y a la proteínasa de cisteína con la catepsina B. En trabajos posteriores, otros investigadores no han vuelto a observar, ni a buscar la proteínasa de aspártico, por lo que su existencia queda por confirmarse por un grupo

independiente. Sin embargo, la existencia de proteinasas de cisteína ha sido demostrada por varios grupos y se han transformado en las moléculas más estudiadas de este protozoario.

A partir de este primer estudio de proteinasas de amibas cultivadas axénicamente, se desarrollaron dos tipos de líneas de trabajo. En la primera se intentó estudiar las propiedades tóxicas y degradativas de extractos acelulares y en la segunda la orientación fue hacia la purificación y la caracterización de toxinas y proteinasas de dichos extractos.

Los grupos de Lushbaugh en los Estados Unidos (3) y de Bos en Holanda (4) fueron los principales iniciadores del estudio de las propiedades citopáticas y citotóxicas de extractos de amibas. Entre 1978 y 1981 establecieron que las principales toxinas tenían masas moleculares entre 25 y 45 kDa, que podían ser glicoproteínas, que no eran inactivadas por el inhibidor de tripsina de frijol de soya, que su actividad dependía de grupos sulfhidrilo y que eran inhibibles por los inhibidores de proteinasas séricos antiproteasa-α-1 y macroglobulina-α-2, así como por suero normal y suero inmune. El hecho de que algunos inhibidores de proteinasas bloquearan el efecto citotóxico de los extractos amibianos estableció una correlación entre esos estudios y el de las enzimas proteolíticas.

Posteriormente McGowan y colaboradores (5) estudiaron la relación que existe entre la citotoxina de *E. histolytica* y la virulencia de varias cepas amibianas. Ellos encontraron una correlación entre la virulencia de la cepa y la actividad citotóxica del extracto correspondiente y lograron inhibir dicha actividad por inhibidores de proteasas, confirmando su identidad de enzimas proteolíticas.

Gadasi y Kobiler en 1983 (6) establecieron una correlación entre la actividad aparente de enzimas proteolíticas en los extractos amibianos y la virulencia reportada para distintas cepas.

Aunque existían trabajos desde la década de los setentas en que se reportaba que las actividades tóxicas o proteolíticas de extractos amibianos eran sensibles a reactivos que activan o que bloquean grupos sulfhidrilo, los resultados eran súmamente confusos, ya que también existían otros reportes en los que se afirmaba que estos reactivos no tenían ningún efecto. No fue sino hasta 1985 en que Avila y colaboradores.(7) demostraron cláramente en extractos de *E. histolytica* y *E. invadens* que el 2-mercaptoetanol incrementa la actividad proteolítica y que, inclusive, revierte la acción inhibitoria de agentes que bloquean grupos sulfhidrilo. En estos estudios se logró inhibir totalmente la actividad proteolítica con estos reactivos, por lo que se concluyó que las principales enzimas proteolíticas de estas dos especies son de la clase catalítica de cisteína.

En un estudio subsecuente de Pérez-Montfort y colaboradores (8) con un número mayor de inhibidores, se encontró, en extractos de *E. histolytica,* que los inhibidores de proteinasas de cisteína bloqueaban entre 80 y 90% de la actividad y que los inhibidores de proteinasas de serina inhibían entre 15 y 18% de la misma. En este trabajo sólo se logró la inhibición total con una combinación de ambos tipos de inhibidores. Para tratar de identificar el número y las masas moleculares de las proteinasas que se encontraban en esos extractos, utilizaron electroforesis con gel de sustrato (el gel fue de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y el sustrato fue gelatina) y observaron tres zonas de proteólisis de 56, 40 y 27 kDa, que correspondían a las proteinasas de cisteína y una zona de proteólisis de 66 kDa cuya clase catalítica no pudo ser determinada con seguridad.

Los resultados de estos estudios confirmaron que en *E. histolytica* predominan las proteinasas de la clase catalítica de cisteína; propiedad que se ha observado en un gran número de protozoarios parásitos.

La segunda línea mencionada anteriormente fue la de la purificación de las proteinasas. Scholze y Werries en 1984 (9) aislaron una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 21 kDa. Esta proteínasa mostró un pH óptimo de actividad de 4.4 y una temperatura óptima de 85°C. En el curso de casi diez años, el grupo de Scholze ha hecho una caracterización extensa de esta proteínasa, a la que recientemente nombró "amebapaína". Esta caracterización ha incluido su actividad sobre sustratos naturales como las enzimas aldolasa,

gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, citrato sintasa y malato deshidrogenasa; la localización del enlace peptídico que digiere en la cadena B de insulina y en el péptido alfa 1-CB2 de colágena tipo I bovina; la determinación de su especificidad sobre péptidos sintéticos con diferentes secuencias; su capacidad de digerir laminina y fibronectina, colágena tipo I bovina nativa y la cadena alfa-2 de colágena humana; determinación de su secuencia amino terminal y su distribución subcelular. Las conclusiones de estos estudios se pueden resumir diciendo que la amebapaína digiere a los sustratos naturales en forma parecida en unos casos a la catepsina L y en otros a la catepsina B, que digiere preferentemente secuencias del tipo Arg-Gli-Fen(Leu)- en el enlace entre Gli y Fen o Leu y que requiere de la Arg en la posición P2 (posición del segundo aminoácido hacia el extremo amino terminal respecto al enlace peptídico que hidroliza la enzima), que es capaz de digerir a las tres principales proteínas del tejido conectivo mencionadas arriba, que tiene una secuencia amino terminal muy similar a la de la histolisina (ver adelante) y que está localizada en la membrana plasmática en la superficie celular y en las membranas de vesículas intracelulares. Recientemente, en colaboración con el grupo de biólogos moleculares encabezado por Tannich, lograron obtener la secuencia del gen de la cepa patógena HM-1:IMSS y además obtuvieron la secuencia de un gen homólogo en otra cepa de *E. histolytica* (SAW 1734) considerada no patógena (10). Ambas secuencias permiten clasificar a estas enzimas en la familia de proteinasas de cisteína perteneciente a la papaína. Estos autores encontraron niveles de ARN mensajero para amebapaína entre 10 y 100 veces más altos en las cepas virulentas que su homólogo en las no virulentas, confirmando por otro método observaciones anteriores de la correlación entre el contenido de proteinasas y la virulencia (6).

Ha habido otros grupos que han reportado purificaciones de proteinasas de *E. histolytica.* En 1985 Lushbaugh purificó una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 16 kDa a la que designó catepsina B (11). Esta enzima fue identificada con la existente en mamíferos debido a que degradaba óptimamente el sustrato "específico" para catepsina B: carbobenzoxi-L-arginil-L-arginil-7-amino-4-trifluorometilcumarina. También demostraron que tenía actividad sobre hemoglobina y caseína y una actividad proteolítica mayor en cepas virulentas que en las no virulentas.

En 1986 Keene y colaboradores (12) purificaron una proteínasa de cisteína neutra con una masa molecular de 56 kDa, capaz de degradar colágena tipo I, fibronectina, laminina y elastina así como el sustrato azocol y el péptido benciloxicarbonil - arginil-arginil-4-amino-7-metilcumarina, lo que les indicó que es una enzima con requerimiento de una Arg en la posición P2. También demostraron que la proteínasa puede activar al plasminógeno y que tiene efecto citopático sobre cultivos de células de riñón de hámster recién nacido.

En trabajos posteriores la expresión y secreción de esta proteínasa se ha correlacionado con la patogenicidad de trofozoítos de *E. histolytica* aislados de pacientes con amibiasis de distintos niveles de gravedad. Su presencia se detectó en todos los casos de 10 cepas aisladas de personas con colitis o absceso amibiano y sólo en 1 de 10 casos de personas asintomáticas. Aparentemente, la secreción de la proteínasa a medios de cultivo fue mayor en aislados patógenos y los autores postularon que la enzima se libera durante el curso de la enfermedad por la presencia de anticuerpos circulantes, mismos que detectaron por la técnica de ELISA. En colaboraciones posteriores este mismo grupo observó que una clona mutante de la cepa virulenta HM-1:IMSS denominada L-6, la cual es deficiente en su capacidad fagocítica y en otros marcadores de virulencia *in vitro,* también es deficiente en la expresión de la proteínasa de 56 kDa. Por otro lado también demostraron que esta enzima tiene actividad de convertasa de C3, (el tercer componente del complemento)

Las proteinasas de 16 kDa y 56 kDa requieren de un comentario adicional. No ha habido reportes confirmatorios sobre la existencia de la proteínasa de 16 kDa por otros grupos y en general no se observan proteinasas de esa masa molecular en extractos crudos de *E. histolytica*, por lo que lo más probable es que represente un fragmento activo de otra proteínasa. Tanto la proteínasa de 16 kDa como la de 56 kDa tienen propiedades muy similares a otras proteinasas purificadas como la amebapaína o

la histolisina y para ninguna de las dos primeras existen datos sobre su secuencia. En el caso de la proteínasa de 56 kDa es posible que se trate de un precursor de alguna de las proteinasas de 24-27 kDa o que se trate de un dímero estable. Un resultado más concluyente sobre su identidad se pudiera obtener por medio de microsecuenciación de ambas proteinasas.

En 1988 Luaces y Barrett (13) purificaron una proteínasa de cisteína con una masa molecular de 27 kDa a la que llamaron "histolisina". Esta proteínasa es capaz de degradar azocaseína, azocol, polvo azul de cuero, elastina, proteoglicano nasal bovino y colágena de membrana basal glomerular, así como por el péptido benciloxicarbonil-Arg-Arg-7-(4-metil) cumarilamida (con una Arg en la posición P2). Sin embargo, no digirió colágena tipo I nativa. Se obtuvo una secuencia amino terminal y los autores la clasificaron como más parecida a la papaína que a la catepsina B. La relación entre la amebapaína y la histolisina se aclaró recientemente debido a que el grupo de Tannich reportó la secuencia completa de la histolisina que resultó tener una homología del 84% con la de la amebapaína (14).

Las estrategias que se han seguido para tratar de determinar cuál o cuáles proteinasas son importantes para la producción del daño tisular han sido ver que enzimas "secreta" la amiba al medio de cultivo y el estudio de su distribución subcelular. Desde los primeros estudios se trató de determinar si las amibas secretaban proteinasas al medio. Hay reportes contradictorios al respecto, pero todos los estudios que reportan secreción de proteinasas no han podido satisfacer adecuadamente las críticas de que los trofozoítos en cultivo son sumamente frágiles y la ruptura de unos cuantos pudiera liberar suficientes enzimas para que pareciera secreción o que las amibas en cultivo se encuentran en condiciones tan diferentes a las que están en tejidos humanos, que la secreción de enzimas *in vitro* no tenga ninguna relevancia fisiológica. En cuanto a su distribución subcelular se ha demostrado por varios grupos de trabajo y por diversos métodos que *E. histolytica* posee enzimas en la membrana plasmática y en membranas de vesículas internas, además de poseer proteinasas en fracciones subcelulares solubles (15). Sin embargo, todavía existe variación en los resultados respecto al número y peso molecular de las enzimas que se encuentran asociadas a membranas (Avila, E.E. y Calderón, J.(1993) *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. Exp. Parasitol. *76*:232-241). Debido a que la amiba requiere adherirse al tejido que va a invadir es muy probable que las proteinasas de la membrana plasmática sean importantes para destruir el tejido del hospedero.

Muy recientemente los grupos de Reed y McKerrow reportaron la clonación y secuenciación de un tercer gen que codifica otra proteínasa de cisteína (Reed, S., Bouvier, J., Pollack, A.S., Engel, J.C., Brown, M., Hirata, K., Que, X., Eakin, A., Hagblom, P., Gillin, F. y McKerrow, J.H. (1993) Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*: pathogenic strains possess a unique cysteine proteínase. J. Clin. Invest. *91*: 1532-1540). En su trabajo muestran alguna evidencia de que sólo se encuentra en cepas que producen enfermedad. La secuencia de esta proteínasa tiene entre 35 y 45% de homología con la amebapaína y la histolisina y muestra más homología con la catepsina L que con la catepsina B o la papaína. Como la catepsina L es la proteína principal secretada por fibroblastos que han sufrido transformación maligna, los autores especulan que la proteínasa recién descrita puede ser la responsable de la invasividad de la amiba a los tejidos, en forma análoga a lo que se ha descrito para ciertos tipos de células cancerosas. Sin embargo, todavía será necesario purificar esta proteínasa y hacer estudios sobre su actividad proteolítica, su especificidad y otras características como las que se han descrito para la amebapaína e histolisina.

Las proteinasas de cisteína de *E. histolytica* no son las únicas a las que se les ha atribuido la capacidad de destruir tejidos del hospedero. En 1982 Muñoz, Calderón y Rojkind (1982, The collagenase of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. *155*: 42-51) describieron una actividad de colagenasa parecida a la de una colagenasa de mamífero (que es una metaloproteínasa). En trabajos subsecuentes también se han presentado evidencias de que esta proteínasa pudiera ser un factor determinante en la patogenicidad de las amibas. Es claro que todavía se requiere de investigación adicional para determinar, cuál o cuáles enzimas son importantes para el comportamiento invasivo de las amibas y cuáles nada más lo son para su propio metabolismo.

REFERENCIAS

1. Diamond, L.S. (1961) Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science, *134*: 336-337.

2. McLaughlin, J. y Faubert, G. (1977) Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteínase from *Entamoeba histolytica*. Can. J. Microbiol. *23:* 420-425.

3. Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Hofbauer, A. F., Arnaud, P., Cantey, J.R. y Pittman, F.E. (1981) Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. Am J. Trop. Med. Hyg. *30:* 575-585.

4. Bos, H.J. y van den Eijk, A.A. (1980) Serum inhibited toxicity of *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.) *11*(Supl. 1): 135-141.

5. McGowan, K., Deneke, C.F., Thorne, G.M. y Sherwood, L.G. (1982) *Entamoeba histolytica* cytotoxin: purification, characterization, strain virulence, and protease activity. J. Infect. Dis. *146*: 616-625.

6. Gadasi, H. y Kobiler, D. (1983) *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. Exp. Parasitol. *55*: 105-110.

7. Avila, E.E., Sánchez-Garza, M. y Calderón, J. (1985) *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: sulfhydryl-dependent proteolytic activity. J. Protozool. *32*: 163-166.

8. Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez-Medina, L., Montfort, I. y Becker, I. (1987) Catalytic classes of proteínases of *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. *26*: 87-98.

9. Scholze, H. y Werries, E. (1984) A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. *11*: 293-300.

10. Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R. y Horstmann, R.D. (1991) Homologous cysteine proteínases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: differences in structure and expression. J. Biol Chem. *266*: 4798-4803.

11. Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. (1985) *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. Exp. Parasitol. *59*: 328-336.

12. Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S. y McKerrow, J.H. (1986) The major neutral proteínase of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. *163*: 536-549.

13. Luaces, A.L. y Barrett, A.J. (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteínase of *Entamoeba histolytica*. Biochem. J. *250*: 903-909.

14. Tannich, E., Nickel, R., Buss, H. y Horstmann, R.D. (1992) Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteínases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. *54*: 109-112.

15. Ostoa-Saloma, P., Cabrera, N., Becker, I. y Pérez-Montfort, R. (1989) Proteínases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. Mol. Biochem. Parasitol. *32*: 133-144.

EL COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA

Livnah, O., Bayer, E., Wilchek, M. y Sussman, J. (1993). "Threedimensional structure of avidin and the avidin-biotin complex." Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) *90,* 5076-5085.

La unión entre la avidina y la biotina formando el complejo avidina-biotina es la inteacción más fuerte que se conoce en la naturaleza. Esta unión ha servido para marcar diversas moléculas, para purificar materiales biológicos, para diagnosticar enfermedades, así como para muchas otras aplicaciones industriales y biomédicas.

Un grupo de investigadores del Instituto Weizmann de Ciencias de Israel, compuesto por los Drs. Sussman, Livnah, Wilchek y Bayer, ha logrado resolver la estructura espacial de la avidina y del complejo avidina-biotina hasta el último átomo.

Comenzaron por obtener cristales de avidina pura previamente tratada con enzimas especiales para eliminar la mayor parte de las cadenas de carbohidratos que forman parte de su estructura normal. Después trataron los cristales con una solución de biotina y los sometieron a la difracción de rayos-X para obtener un mapa de densidad electrónica tridimensional. Después acomodaron los aproximadamente 4,000 átomos (excluyendo los hidrógenos) de la avidina y los 16 de la biotina en el mapa.

El modelo tridimensional reveló que la avidina está compuesta por 4 monómeros idénticos en forma de barriles o cilindros. La superficie del extremo superior de cada cilindro tiene 16 elementos de unión que fijan una molécula de biotina.

Desde que la aplicación práctica del complejo avidina-biotina fue desarrollada por los Drs. Wilchek y Bayer en la década de los setentas, se han multiplicado las aplicaciones de este método. Puede por ejemplo, unirse la biotina a cualquier molécula de interés (hormona, enzima, anticuerpo, ácido nucleico, nulceótido, etc.) para descubrir cuál es su molécula blanco. Se puede purificar cualquier sustancia unida artificialmente a la biotina en una columna que contenga avidina. Recientemente se han diseñado biotransistores en los cuales el sílice es sustituido por la avidina.

Quedan aún varias preguntas sin resolver: ¿Interaccionan la avidina y la biotina en la naturaleza? ¿Cual es el propósito de esta interacción?

Comentado por Alberto Huberman
Instituto Nacional de la Nutrición,
Dr. Salvador Zubirán.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
VI REUNION NACIONAL DE BIOQUIMICA VEGETAL
Octubre 10-14 de 1993. Morelia, Michoacán

Conferencia Magistral
6 sesiones plenarias
6 simposia
Exposición de carteles

TEMAS:

Metabolismo Secundario
Interacciones Planta-Microorganismo
Fitorreguladores
Fisiología y Desarrollo
Estress
Bioenergética

CURSOS PRECONGRESO:

a) CULTIVO DE TEJIDOS

b) BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS

INFORMES:

DRA. EVA SORIANO B.
TEL. Y FAX.91 (43) 14-21-52
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUIMICO-BIOLOGICAS, UMSNH.
MORELIA, MICH.

DRA. ESTELA SANCHEZ DE J.
TEL. 91 (5) 550-91-96
DEPTO. DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
MEXICO, D.F.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTICULOS DE REVISION

1) El artículo deberá enviarse en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB de capacidad, escrito en el procesador de textos ***"Word 5"***, sin ningún formato y con una extensión máxima de 18,000 caracteres. Este deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que se marcarán en color las palabras o líneas que deban ir en *cursivas* o **negritas**, así como todas las anotaciones necesarias. En el caso de no tener acceso a este procesador, el manuscrito podrá enviarse mecanografiado, con una extensión que no exceda de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).

2) Se deberá incluir un resumen de más o menos diez renglones, que deberá ir seguido por un conjunto de tres a seis palabras clave, que se usarán como código en el catálogo internacional.

3) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, número del volumen en *cursivas* y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:.

   Miller, C. O. (1982) Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plant Physiol *69*: 1274-1277.

   Los libros deberán citarse de la siguiente forma:

   Larckins, B. A., Peralmutter, N. L. y Hukman, W. J. (1979). The mechanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Preservation and Germination, Editores: Rubenstein, I.; Phillips, R. L.; Green, C. E. y Gengenbach, B. G. Academic Press. New York. pp. 49-55

4) Se aceptarán como máximo seis figuras o tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta, las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros.

5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de página. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.

II. OTRAS COMUNICACIONES

1) El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etc.

2) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.

3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.

4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla.

Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias así como las pruebas de página se comunicarán al primer autor.

Los discos y las dos copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apdo. Postal 70-281, México 04510, D. F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 14-740, México 07000, D. F., o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.