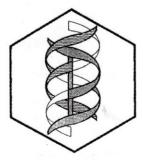
200

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, AC



SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA, AC

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos PERIÓDICA (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES

SOCORRO CONCEPCIÓN DURÁN VARGAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

GRACIELA MEZA RUIZ

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

JORGE JOEL REYES MÉNDEZ

División de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana

EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Instituto Politécnico Nacional

COORDINADOR DE CORRESPONSALES

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES ASOCIADOS

EDMUNDO CHÁVEZ COSÍO

Instituto Nacional de Cardiología "Dr Ignacio Chávez"

MARINA GAVILANES RUIZ

Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México

ELIZABETH LANGLEY McCARRON

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

JAIME MAS OLIVA

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

MARÍA DE LOS ANGELES BOFFILL CÁRDENAS

Facultad de Ciencias Médicas Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba

ALMA LETICIA BORBOA OSUNA

Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Sinaloa

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

Instituto de Ciencias Básicas "Victoria de Girón" Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana, Cuba

GUADALUPE OLIVA

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Tamps.

KATERINA LIRA RUÁN

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.

ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

Biotecnología Marina

Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo de Sonora

REVISORES ASOCIADOS AL COMITÉ EDITORIAL

KARLA CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

RAUL MIGUEL COVIAN

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

SILVIA DEVARS RAMOS

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

OSCAR FLORES HERRERA

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

CECILIA GARCÍA PÉREZ

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

CARLOS GÓMEZ LOJERO

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Instituto Politécnico Nacional

LUIS GONZÁLEZ DE LA VARA

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Instituto Politécnico Nacional

DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

RICARDO JASSO CHÁVEZ

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México

HERMINIA LOZA TAVERA

Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México

BLAS LOTINA HENNSEN

Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México

GUADALUPE MALDONADO MERCADO

Depto. de Bioquímica. Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

JOSE LUIS MOLINARI SORIANO

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

FERMÍN PACHECO MOISÉS

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ

Depto. de Bioquímica. Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México

HORACIO REYES VIVAS

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México

SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

LUIS HUMBERTO SILVEIRA TORRE

Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

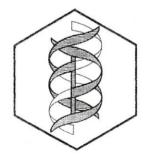
MARÍA EUGENIA TORRES MARQUEZ

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

SALVADOR URIBE CARVAJAL

Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México



Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM



Facultad de Medicina, UNAM

BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, CP 04510 México, D F. Certificados de: Licitud de Título No 6703; Licitud de Contenido No 6989; No de expediente 1/432"92"/8443; Reserva al título en derecho de autor No 6703. Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos PERIÓDICA (Indice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias). Impresa en los talleres Editorial Uno, SA de CV, 1er Retorno de Correggio No 12, México 03720 DF; tiraje 1,300 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-0403; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

EDITORIAL

RETOS Y PERSPECTIVAS PARA LA ACTUAL PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.

La historia

Durante el VIII Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. (AMPB, A.C.), en agosto de 2000, un servidor fue elegido para ocupar la Presidencia de la Mesa Directiva de la Asociación. Por supuesto que fue una agradable noticia el conocer el resolutivo de la asamblea, pues además de ser un honor, representa una oportunidad para trabajar en favor de la docencia y de la difusión de la Bioquímica. No olvido que el puesto conlleva el compromiso de mantener, y de ser posible superar, el ritmo de trabajo alcanzado por las Presidencias y de las Mesas Directivas que me preceden, las que con su dedicación han logrado cristalizar y consolidar dos de los objetivos de la Asociación: la difusión de material docente actualizado, mediante la publicación del Boletín de Educación Bioquímica (BEB); y la realización del Congreso de la AMPB, A.C., un foro de análisis y discusión de los problemas inherentes a la práctica docente. Ambas tareas han sido el fruto de numerosos esfuerzos, por parte de las mesas directivas, de los comités editoriales, de los asociados y del apoyo institucional que ha recibido la Asociación.

Los retos

-Tratar de incrementar en dos años, los logros anteriormente descritos, representa un reto de gran magnitud, el cual difícilmente podrá superarse sin la ayuda de sus asociados y de la asesoría de las mesas precedentes. La praxis indica que así han funcionado varias asociaciones, v. gr., el Vicepresidente de la mesa previa pasa a ser el Presidente de la siguiente mesa. En el artículo décimo segundo de los estatutos de la AMPB se indica que "El Presidente de la Mesa Directiva será elegido por los socios de Número en una Reunión de Negocios Ordinaria, la cual se llevará a cabo cada dos años, durante la celebración del Congreso de la Asociación. Para ello, el Consejo Directivo convocará a los Asociados al registro de candidatos por lo menos con seis meses previos a la

fecha de reunión". La propuesta de que uno de los candidatos a ocupar la Presidencia sea el Vicepresidente no se contrapone a lo referido en el citado artículo; por el contrario, proporciona *ipso facto* al primer candidato, entre otros posibles.

-La comunicación oportuna entre los asociados ha sido un gran reto. Actualmente la AMPB, A.C. se comunica con sus asociados mediante el BEB, cuatro veces al año; y a través del correo electrónico del mismo: beb@laguna.fmedic.unam.mx. No obstante, es deseable abrir más caminos de comunicación. Para facilitar la comunicación expedita y oportuna entre los colegiados, se puede aprovechar las ventajas del correo electrónico. En la actualidad ya no es necesario tener una computadora para obtener una dirección electrónica gratuita. Es suficiente con acudir a un servicio público de internet y solicitar, entre los muchos prestadores de servicios (v.gr., hotmail, yahoo, correoweb, aol, entre otros) una cuenta gratuita de correo electrónico, la cual puede ser consultada desde cualquier computadora conectada a internet. Cualquier notificación de la AMPB, A.C., así como la Convocatoria para ocupar la Presidencia de la misma, podrán ser enviadas con oportunidad a las direcciones electrónicas incorporadas a la base de datos actualizada. Próximamente, la Asociación dispondrá de una dirección electrónica y de una página web, mientras tanto, exhorto a todos los asociados y a los interesados en pertenecer a ella, a mandar sus datos a mi dirección electrónica: majo@bq.unam.mx majo@servidor.unam.mx

-La actualización de los datos de la membresía es igualmente un enorme reto, para ello es necesario establecer un mecanismo periódico de actualización y verificación de la base de datos. En la página web de la AMPB, A.C. se podrá verificar, y en su caso solicitar su corrección, del listado de la membresía.

Durante el XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB), realizada en noviembre de 2000, la nueva mesa directiva de la AMPB, A.C. difundió entre los investigadores asistentes al Congreso un tríptico informativo de las actividades de la Asociación, solicitando nos lo regresaran en caso de estar interesados en dichas actividades. La respuesta al tríptico por parte de los investigadores, pero no así de la mesa directiva de la SMB, fue pobre, lo que nos sugiere que debemos redoblar esfuerzos para fortalecer la membresía.

-Para afrontar el reto de fortalecer la membresía, se invitará a profesores y alumnos de las diferentes instituciones educativas del país a pertenecer a nuestra Asociación, así como a contribuir en sus dos principales actividades de difusión, el BEB y el congreso anual de la Asociación.

El BEB ha mejorado constantemente, tanto en la regularidad como en la calidad de sus publicaciones. Lo anterior no es fortuito. Es el resultado de la ardua labor editorial y del apoyo generoso de los investigadores que contribuyen con sus manuscritos, así como de los apoyos institucionales que ha recibido principalmente por parte de la UNAM, entre otros, y recientemente de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

-Fortalecer al BEB significa, nuevamente, un magno reto, implica proporcionarle seguridad económica, incrementar el número y calidad de las contribuciones, darle más versatilidad a las comunicaciones (v.gr., cartas al editor, críticas académicas a los trabajos publicados, establecer vínculos con otras sociedades académicas y de difusión, y muchas otras formas que los lectores y asociados nos puedan sugerir), darle mayor difusión entre las diferentes bibliotecas de las instituciones educativas del país y, en lo posible, en instituciones del extranjero, además de la posibilidad de consultar en línea una selección de los artículos ya publicados.

El Congreso anual de la AMPB, A.C. es la actividad que se ha desarrollado con menor solidez, a pesar de los enormes esfuerzos invertidos. Es cierto que en el Congreso de la Asociación caben las exposiciones referentes a las experiencias docentes, pero también se espera que el Congreso sirva como un foro de análisis y discusión de los problemas inherentes a la práctica docente. Las presentaciones no deben quedar en el ámbito descriptivo, deben alcanzar los niveles

analítico y prospectivo. La investigación educativa no ha fertilizado suficientemente el campo de la Bioquímica y los investigadores básicos, aunque contribuyen escasamente en la difusión de la Ciencia, sólo participan modestamente en la investigación educativa. En palabras del Ing. Parada, nuevo director del CONACYT, al referirse a la difusión de la Ciencia mencionó: "Otro gran reto es hacer que el tema de la ciencia y la tecnología sea un tema de la sociedad, no sólo de una élite; un tema de la sociedad en general, por lo cual creo que tenemos que incorporar estos temas, a los programas de educación, desde los de educación básica, y emprender una campaña de difusión de la ciencia y la tecnología en los medios, en la prensa. Creo que tenemos como reto principal que la sociedad se apropie del tema de ciencia y tecnología y no sólo nuestra comunidad científica y tecnológica."

-El reto de hacer del Congreso de la AMPB, A.C. un foro de excelencia académica implica un cambio de actitud no sólo de los organizadores, sino también de los participantes, estar dispuestos a trabajar en pro de la docencia; conjuntar esfuerzos entre los miembros que realizan investigación básica y los que realizan investigación educativa. Igualmente importante, es el sensibilizar a los órganos colegiados (v.gr., SNI, Consejos Técnicos, entre otros), encargados de evaluar las actividades académicas, de la importancia y trascendencia del mejorar la labor docente. Pasemos del discurso a la práctica, demos pues una mejor vida académica al Congreso de la AMPB.

Las perspectivas

La perspectiva académica del la AMPB es infinita, pero depende en gran medida de la actividad y creatividad de sus asociados. El impacto que pueda tener la AMPB en el futuro de la enseñanza de la Bioquímica en el país, descansa no solamente en la actividad de las Mesas Directivas, sino también en la respuesta de sus asociados. Es por eso que invito a la membresía y a nuestros amables lectores a unir esfuerzos en pro de una vida colegiada activa, que le dé liderazgo a nivel nacional y la proyecte a nivel internacional, ya que éste es el gran reto.

Marco Antonio Juárez Oropeza,
Presidente.
Departamento de Bioquímica.
Facultad de Medicina, UNAM

LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Félix Recillas Targa. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-242. C. P. 04510, México, D. F. Fax: 5622-5630. Correo electrónico: frecilla@ifisiol.unam.mx

Recibido: 24 de marzo de 2000. Aceptado: 22 de agosto de 2000.

RESUMEN

El ADN de las células eucariotes interacciona con proteínas básicas conocidas como historias para formar el nucleosoma. A este conjunto de proteínas y ADN se define como cromatina. En los pasados 10 años han ocurrido avances significativos en el entendimiento del efecto de la estructura de la cromatina en la modulación de la expresión genética. La estructuración del ADN en cromatina, favorece su compactación y posibilidad de ser contenido dentro del núcleo celular, pero al mismo tiempo genera un obstáculo estructural para la maquinaria de transcripción, duplicación, recombinación y reparación del ADN. La expresión eficiente y ordenada de un gen se lleva a cabo en el contexto de la cromatina, siendo éste uno de los niveles primarios de regulación. Los cambios postraduccionales de las histonas que forman al nucleosoma, los complejos de remodelaje de la cromatina y la metilación del ADN, entre otros, forman parte de esta regulación. Todos estos cambios ocurren en contextos cromosómicos bien definidos, conocidos como dominios

PALABRAS CLAVE: nucleosomas, cromatina, acetilación, remodelaje, metilación, dominios.

ABSTRACT

In the last decade the impact of chromatin structure on gene activity has become increasingly apparent. Chromatin is defined and composed by a repetitive element known as the nucleosome that consist of an octamer of histones. The packaging of the genetic material into chromatin allows the compaction of DNA into the nucleus generating an obstacle to different but related regulatory processes as transcription, replication, recombination and DNA repair. Chromatin remodeling is required

as one of the first steps to coordinate regulation of distinct regulatory events. Postranslational histone modifications, chromatin remodeling complexes, methylation and others have direct implications on gene expression. Such modifications take place in a remodeled and active chromatin domain where the overall chromatin structure favor the optimal regulation of gene expression.

KEY WORDS: nucleosomes acetylation, remodeling complexes, methylation and chromatin domains.

INTRODUCCIÓN

El ADN contenido en el núcleo de una célula eucariota tiene la información genética necesaria para la formación y desarrollo de un organismo. El conjunto de proteínas (conocido como cromatina) que interaccionan con el ADN permite distintos niveles de compactación. Gracias a esta compactación, de dos a cuatro metros de ADN pueden ser contenidos dentro de un núcleo de 10 micras de diámetro. Sin embargo, esta compactación del ADN también trae como consecuencia una cierta inaccesibilidad del ADN para la maquinaria transcripcional. Para que un gen o grupo de genes puedan ser expresados de manera correcta en tiempo y espacio, se necesita un sistema de regulación que ejerza su influencia a distintos niveles. Uno de los niveles de organización más tempranos, es aquel que favorece una reorganización estructural de la cromatina. Para ello, la cromatina debe llevar a cabo continuamente eventos de compactación y descompactación, organización y localización muy precisa dentro del núcleo. Durante muchos años la comunidad científica había considerado la regulación de la expresión genética y la estructura de la cromatina

como dos campos de investigación independientes. Hoy en día, resulta claro que para poder entender como se regula la expresión de los genes, debemos entender cual es la estructura de la cromatina y como se remodela.

Durante los últimos diez años han habido un gran número de avances en esta área del conocimiento. El objetivo de esta revisión, es introducir al lector al mundo de la estructura de la cromatina y poner en evidencia su clara relación con la regulación de la expresión genética.

LA CROMATINA Y LOS NUCLEOSOMAS

La cromatina está conformada por ADN y un conjunto de proteínas. Como elementos básicos se encuentran las histonas, las cuales al interactuar con el ADN forman los nucleosomas. El nucleosoma es la estructura base para la formación de la cromatina, cuya función principal es condensar el ADN y permitir ser contenido dentro del núcleo celular eucariote. El nucleosoma está constituido por un octámero de histonas; un tetrámero de las histonas H3/H4 y un dímero de las histonas H2A y H2B. El nucleosoma abarca 147 pares de bases (pb) de ADN y después de muchos intentos fallidos, la estructura del nucleosoma ha sido establecida a una resolución de 2.8 Å (1). Además de las histonas que conforman al nucleosoma, existe una quinta histona llamada histona H1 o H5, también conocida como la histona de enlace, la cual colabora en la estabilización de la estructura nucleosomal y en la formación del nivel estructural superior de la cromatina (la fibra de 30 nm también denominada "solenoide").

La cromatina pareciera ser un medio inhóspito para la maquinaria molecular que tiene al ADN como substrato para la transcripción, la duplicación, la recombinación y la reparación (2). A lo largo de muchos años, se había considerado que tenía un papel estructural únicamente. Actualmente, son múltiples las evidencias que demuestran que la estructura nucleosomal juega un papel central y dinámico en la regulación de la expresión de los genes. Estudios realizados en la levadura Saccharomyces cerevisiae mostraron que la falta de histonas provoca la activación espontánea de un gran número de promotores y én consecuencia de genes (3). Esta observación indica una capacidad

represora intrínseca de la cromatina. Como veremos más adelante, los extremos amino de las histonas son necesarios para mantener un estado de represión basal (4).

Durante muchos años se ha pensado que la expresión genética se lleva a cabo a nivel de la fibra de 10 nm, también conocida como "collar de perlas" y que éste es uno de los niveles mínimos de estructuración de la cromatina apta para la actividad transcripcional. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que ésta estructura resulta poco probable in vivo (5) ya que la fibra de 10 nm, con una organización nucleosomal espaciada, proviene de estudios realizados por microscopía electrónica en donde la cromatina ha sido preparada en concentraciones bajas de sal, lo cual no refleja el estado fisiológico del núcleo. Se ha demostrado que, en ciertas condiciones fisiológicas de sal, la cromatina forma de manera espontánea, una fibra de 30 nm, incluso en ausencia de la histona H1 (5). A su vez, resulta poco probable que la fibra de 10 nm refleje el estado basal de la cromatina en dominios activos transcripcionalmente, dado que sería imposible que el genoma completo pudiera ser contenido al interior del núcleo. Estas evidencias sugieren que la estructura basal de la cromatina es la fibra de 30 nm, la cual contiene seis nucleosomas en cada vuelta, formando así una estructura con un grado mayor de compactación. Es por lo tanto en este nivel de compactación de la cromatina donde probablemente ocurran una gran parte de los procesos de regulación que se describirán más adelante. En resumen, las histonas y en consecuencia los nucleosomas, deben ser considerados como componentes de la maquinaria de transcripción. con funciones bien definidas dentro de la regulación de la expresión de un gen, en conjunción con su participación en la estructuración del genoma.

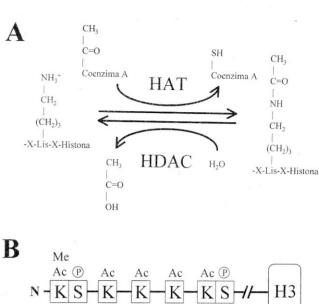
LA ACETILACIÓN Y DESACETILACIÓN DE LAS HISTONAS

Las alteraciones en la estructura de la cromatina, a través de la modificación postraduccional de las histonas, tienen consecuencias directas en la regulación de la expresión de los genes. La idea de que las histonas poseen sólo una función estructural no se sostiene actualmente (6). El que estas proteínas se consideren elementos centrales en la expresión de los genes está ligado al hecho de que

las histonas pueden ser modificadas, de manera reversible, mediante la acetilación específica de residuos de lisina, localizados en sus regiones amino terminal (Fig. 1) (3, 4). Esta acetilación específica, ocasiona una neutralización de la carga positiva y la consecuente disociación de las histonas y el ADN (Fig. 1B). El resultado es una relajación de la estructura nucleosomal, haciendo a la cromatina más accesible para la maquinaria transcripcional. De esta manera es ahora posible el reconocimiento e interacción de factores de transcripción con sus secuencias blanco, en particular, en regiones promotoras. A otro nivel, la acetilación de las histonas induce una disminución en la establidad de la fibra de 30 nm y la formación de dominios activos que incluyen a un gen o a un grupo de genes, como el caso de los genes de globina, los cuales se incluyen en una zona de la cromatina donde las histonas se mantienen mayoritariamente acetiladas (4, 7).

Los niveles de acetilación de las histonas dependen de la actividad de dos familias de enzimas, las acetiltransferasas y las desacetilasas de histonas, conocidas como HATs y HDACs, respectivamente (Tabla I). Recientemente se han descubierto una serie de activadores y co-activadores con actividades de acetiltransferasas, por ejemplo Gcn5p en levadura, CBP/300 y su proteína asociada PCAF, al igual que el factor asociado a la transcripción, la TAF₁₁250 (8). Por otra parte, existe una serie de represores de la transcripción con actividad de desacetilasa, por ejemplo Mad y miembros de la familia de receptores nucleares. Se han clonado y caracterizado bioquímicamente las desacetilasas HDAC1, 2 y 3. Los estudios orientados a evaluar el papel de la acetilación y desacetilación de las histonas han sido realizados principalmente en regiones promotoras, en diversos organismos.

Como un ejemplo, se comentará el descubrimiento reciente de la asociación entre el supresor tumorigénico del retinoblastoma (RB) y las desacetilasas de histonas. El RB es una molécula central en la regulación de la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular (9). El RB mantiene reprimidos, durante la fase G1 del ciclo celular, a una serie de genes necesarios para el proceso de duplicación del ADN. Se sabe que el mecanismo de represión por parte del RB, es mediante su



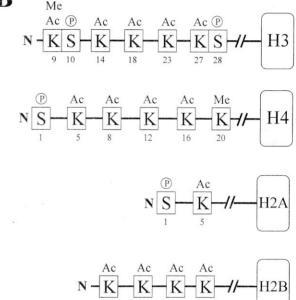


Figura 1. Acetilación y desacetilación de las regiones amino terminal de las histonas. A. La acetilación de histonas es un proceso reversible donde las enzimas acetiltransferasas de histonas (HATs) transfieren el grupo acetilo de la acetil-coenzima A al grupo ε-NH₃+ de lisinas localizadas específicamente en las regiones amino terminal de las histonas. La acetilación de cada lisina provoca la neutralización de la carga positiva, incrementando la hidrofobicidad. En la reacción opuesta las desacetilasas de histonas (HDACs) remueven el grupo acetilo reestableciendo la carga positiva de las histonas (tomado de Kuo y Alli 1998). B. Las regiones amino terminal de las histonas contribuyen, de manera importante, a la estructuración del ADN en cromatina. La acetilación de los residuos específicos de lisinas (Ac) indicados provoca una drástica disminución en la afinidad de los nucleosomas por el ADN y desestabilización de la estructura de la cromatina, facilitando la transcripción. Las regiones amino terminal de las histonas sufren otras modificaciones como la metilación (Me) y la fosforilación (P) (tomado de 28).

humano

Tetrahymena

levadura

levadura

humano *Drosophila*

humano

humano

humano

humano

humano *Drosophila*

Gcn5

Ada

NuA3

NuA4

Esa1

SAGA

PCAF

CBP/p300

SRC-1

ACTR

Tip60

TAFII250

TABLA I

ACETILASAS Y DESACETILASAS DE HISTONAS

ACETILASAS DE HISTONAS (HATs) DESACETILASAS DE HISTONAS (HDACs) Rpd3p levadura levadura levadura levadura Hda1p levadura

Familia

HDAC

levadura HATs: Gcn5, descubierto como un co-activador y forma parte de otros complejos con actividad de acetilasa de histonas: Ada, es un complejo en el cual las proteína Ada2 y Ada3 interactúan con Gcn5; NuA4, es un complejo que acetila histonas H2A y H4 únicamente cuando forman parte de un nucleosoma y es reclutada por Gcn4 en levadura; Esa1, no es capaz de acetilar un sustrato de cromatina, pero forma parte de la unidad catalítica del complejo NuA4 con la capacidad de acetilar las histonas H2A y H4; SAGA es un complejo multi-peptídico de 1.8 MDa que como Ada, contienen Ada3 y Ada2 los cuales unen a Gcn5; PCAF, su región carboxilo-terminal es similar a la de Gcn5 en levadura y su región amino terminal se asocia con co-activadores con una función HAT (como CBP/p300); CBP/p300, es un co-activador con actividad de HAT con la capacidad de acetilar las cuatro histona y a factores de transcripción; SRC-1, co-activador del receptor de esteroides mientras que ACTR se une a distintos receptores nucleares de manera dependiente del ligando. Ambos pueden atraer distintos co-activadores con funciones de HAT (como Tip60, SRC-1, CBP y PCAF); TFII₂₅₀, es uno de los factores asociados a TBP (la 'TATA-binding protein') y que forma parte de TFIID. HDACs, Rpd3p, forma parte de la primera clase de desacetilasas de histona en levadura donde se incluye a una parte de la familia de HDACs (siendo HDAC2 el homólogo en mamíferos de RPD3). La clase dos está formada por Hda1p en levadura y HDAC4, HDAC5 y HDAC6 en mamíferos. Hda1p forma parte del complejo HDA de 350 kDa, ambas clases de desacetilasas pueden actuar sobre las cuatro histonas, aunque la especificidad está dada por componentes de los distintos complejos.

interacción física con una familia de factores de transcripción, con una función activadora, conocidos como E2F. Una de las señales más importantes para el inicio de la transición entre la fase G1 y S, es la fosforilación de RB por parte de cinasas dependientes de ciclinas. De esta manera, RB pasa de un estado de represión (hipofosforilado) a un estado activo (hiperfosforilado). En su estado hiperfosforilado, RB libera a E2F permitiendo que este factor realice sus funciones reguladoras en promotores de genes importantes para la duplica-

ción del ADN. La importancia del RB en el control de la progresión en el ciclo celular queda de manifiesto si se considera que RB representa un blanco molecular de una serie de oncoproteínas, por ejemplo E7 del papilomavirus humano. La interacción entre el RB y las oncoproteínas trae como consecuencia la entrada forzada y prematura a la fase S del ciclo celular, es decir, colabora en la proliferación desmedida de la célula. Recientemente, se ha demostrado que RB se asocia a la desacetilasa de histonas HDAC1. Esta interacción

se favorece en el estado hipofosforilado de RB, lo cual sugiere que además de la interacción entre RB y E2F, RB contacta la HDAC1, fomentando una estructura de la cromatina más compacta la cual contribuye a su función represora en distintos genes que debe ser transcritos en la fase S del ciclo celular (9). La gran mayoría de las mutaciones en RB con efectos tumorigénicos se localizan en el dominio de la proteína RB que precisamente contacta a la HDAC1. También se ha demostrado la interacción entre RB y BRG1, un homólogo humano de la proteína SWI2/SNF2 de levadura (ver más adelante), la cual forma parte de un complejo de remodelaje de la cromatina. Estos datos sugieren que además de la desacetilación, se requiere una reestructuración de la cromatina para el efecto represor de RB (9).

Un mecanismo similar de regulación ha sido demostrado para p53 (una proteína central en la regulación del ciclo celular) en donde, mediante la interacción con la proteína mSin3a, p53 interactúa con las desacetilasas de histonas para realizar sus funciones de represión (10). Estos ejemplos constituyen las primeras evidencias que ponen de manifiesto la relación entre la regulación del ciclo celular, la actividad de un supresor tumoral y la estructura de la cromatina. Cabe señalar que queda mucho por entender acerca de estos sistemas de modificación y regulación de la estructura de la cromatina. Aún no existen estudios que muestren cuál es el papel de la acetilación en la función de un 'enhancer' o aumentador en zonas alejadas del inicio de la transcripción. Por otra parte, existen evidencias claras de que la desacetilación de las histonas y la metilación del ADN se encuentran relacionadas. Experimentos como los descritos anteriormente muestran que la acetilación constituye uno de los sistemas de regulación de la estructura de la cromatina con mayor impacto en la expresión genética. También, se ha propuesto que la acetilación pudiera servir como un sistema de señalización y atracción, para que en zonas específicas del genoma, se concentren y actúen otros miembros de la maquinaria de regulación y de modificación de la estructura de la cromatina (5).

La acetilación y desacetilación no son las únicas modificaciones postraduccionales que ocurren en

las regiones amino terminal de las histonas. La fosforilación, la metilación, la ubiquitinización y la ADP-ribosilación son modificaciones enzimáticas que se llevan a cabo en las regiones amino terminal de las histonas (Fig. 1B). En particular, la fosforilación tiene consecuencias directas en la compactación cromosómica durante la mitosis (11). Por otra parte, poco se sabe del efecto de la metilación de ciertos residuos en esta misma región, aunque existe una evidencia que apoya la idea de que esta modificación postraduccional favorece la activación transcripcional (11). Estas y otras observaciones han servido para proponer la existencia de un 'código de histonas' basado en las distintas modificaciones postraduccionales de las regiones amino terminal de las histonas, que permiten proponer un mecanismo diferencial de regulación de la estructura de la cromatina. Queda por demostrar que este código realmente dicte distintas funciones de la cromatina, pero esta atractiva hipótesis abre un nuevo horizonte en el estudio del efecto de las histonas en la estructura de la cromatina y la regulación genética.

COMPLEJOS DE REMODELAJE DE LA CRO-MATINA

Como se mencionó previamente, la estructura nucleosomal no sólo puede ser modificada por cambios postraduccionales como la acetilación de las histonas. En años recientes, se ha descubierto una serie de complejos multi-peptídicos con la capacidad de remodelar la organización de los nucleosomas en el ADN. Por remodelación se entiende el desplazamiento de los nucleosomas, de manera dependiente de la hidrólisis de ATP (2, 12). Uno de los componentes mejor caracterizados dentro de estos complejos es SWI/SNF (Tabla II), el cual forma parte de otros complejos protéicos que llevan los nombres de NURF (NUcleosome Remodeling Factor), CHRAC (CHRomatin Accessibility Complex) y ACF (ATP-dependent Chromatin assembly and remodeling Factor). Todos estos complejos presentan una actividad de ATPasa, descubierta originalmente en Drosophila y confirmada recientemente en levadura y mamíferos (Tabla II) (13). A pesar de que estos complejos tienen en común el componente SWI/SNF, poseen propiedades bioquímicas y funcionales distintas. Por ejemplo, NURF desestabiliza el arreglo de los nucleosomas mientras CHRAC y ACF inducen

TABLA II

COMPOSICIÓN POLIPEPTÍDICA DE LOS DISTINTOS COMPLEJOS DE REMODELAJE DEPENDIENTES DE ATP

s #	SWI/SNF	RSC	ISWI	ISW2
Levadura	SWI1 SNF5 SWI2/SNF2 SNF6 SWI3 S11F7 SWp29 SNF9 SWp73 SNF11 SWp82	STH1 SFH1 RSC1-3 RSC5-10 RSC13-15 Arp7 Arp9	ISW1 p74 p110 p105	ISW2 p140
	hSWI/SNF	NU	RD	RSF
Humano	Brg1 BAF60a-b-c Ini1 BAF155 hBrm BAF170 BAF47 BAF250 BAF50	Mi2CF HDA HDA RbA RbA MTA MB	AC1 AC2 .p48 .p46 A1-2	hSNF2h p325
	dSWI/SNF	NURF	CHRAC	ACF
Drosophila	Brm Snr1 BAP47 BAP55 BAP60 BAP74 BAP11	ISWI p38 p55 p215	ISWI TopoII p18 p20 p175	ISWI ACF1-170 ACF1-185 p47

(Tomada de 13.)

un arreglo regular de los nucleosomas (12). Esto último a sido propuesto a partir de resultados que muestran que estos complejos inducen el movimiento de los nucleosomas sobre el ADN, generando una nueva posición de los nucleosomas, favoreciendo la activación de un gen. CHRAC y ACF inducen un arreglo regular a partir de una distribución irregular de nucleosomas (Fig. 2) (14). Lo anterior puede traer como consecuencia la accesibilidad o no a secuencias blanco en al ADN por parte de factores de transcripción (Fig. 2). Sorprendentemente, la abundancia y necesidad vital de estos complejos varía. Por ejemplo, el complejo SWI/SNF no es muy abundante en la levadura y no es esencial para la viabilidad de la célula (13). Por el contrario, el complejo RSC (Remodels the Structure of Chromatin, Tabla II), con similitud a SWI/SNF, es abundante y esencial en la levadura.

¿Pero cuáles son los mecanismos de acción de estos complejos? Se han propuesto tres mecanismos generales. El primero contempla el deslizamiento de los nucleosomas por el ADN sin que estos se disocien (Fig. 2). El segundo mecanismo propone una disociación transitoria, parcial o completa de los nucleosomas para después reposicionarse en el ADN. El tercer y tal vez el menos estudiado, es el que propone que estos complejos reducen la torsión negativa del ADN impuesta por el arreglo de nucleosomas, provocando cambios topológicos en el ADN que favorecen la interacción de factores de transcripción.

Un giro importante ha ocurrido recientemente en este campo de investigación. Hasta hace poco tiempo, los complejos de remodelaje se consideraban como elementos que promovían la activación trancripcional (12). Investigaciones recientes han

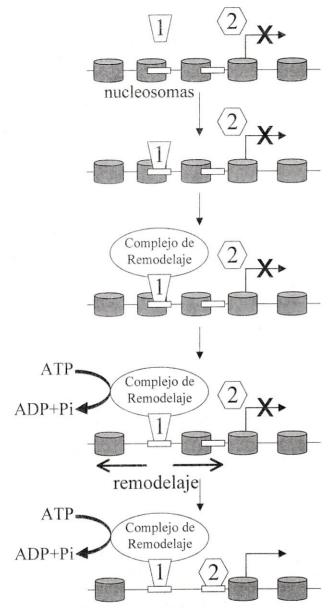


Figura 2. Cambios en la estructura de la cromatina por medio de complejos de remodelaje dependiente de ATP. Por lo general, la estructura de la cromatina fomenta un estado inactivo de la transcripción, mediante la inaccesibilidad por parte de factores de transcripción (factores 1 y 2) a sus secuencias blanco (rectángulos blancos). De manera simplificada, la unión específica de un factor (factor 1) inicia el proceso de regulación atrayendo al complejo multi-peptídico de remodelaje. Mediante la hidrólisis de ATP, los complejos de remodelaje afectan la arquitectura de la región de regulación desplazando y reorganizando la localización de los nucleosomas, sin disociación de las histonas (flechas horizontales). Este paso de regulación a nivel de la estructura de la cromatina trae como consecuencia la accesibilidad por parte de los factores de transcripción (factor 2) e incluso del complejo de inicio de la transcripción a sus secuencias blanco. Finalmente, la expresión de un gen puede realizarse de una manera controlada (tomado de 14).

demostrado que los complejos de remodelaje de la cromatina, dependientes de ATP, no sólo facilitan la activación sino que también promueven la represión de la transcripción (14). Estudios realizados en el genoma completo de levadura (mediante 'DNA micro array analysis') demostraron que la inactivación del complejo de remodelaje SWI/SNF únicamente altera la expresión del 6% de los genes del genoma. Dentro de éste 6% de genes afectados, la mutación del complejo SWI/SNF reveló la desrepresión (o activación) de un número considerable de genes (15). Estas observaciones sugieren una actividad dual por parte de estos complejos de remodelaje de la cromatina, afectando la actividad transcripcional tanto de una manera positiva, como negativa (14).

El descubrimiento del complejo multi-peptídico NuRD/Mi-2 ha puesto en evidencia una conexión entre la actividad de remodelaje de la cromatina y la desacetilación de histonas. El complejo NuRD/Mi-2 posee ambas actividades. Se ha propuesto que la actividad de remodelaje de NuRD/Mi-2 es necesaria para facilitar la desacetilación de histonas, en un templado de cromatina. Una evidencia adicional de la función ligada a la represión a nivel de la estructura de la cromatina, es el hecho de que NuRD/Mi-2 reconoce e interactúa con el ADN metilado. Esto sugiere que la inactivación transcripcional, mediada por NuRD/Mi-2, también es dependiente del estado de metilación del ADN (16, 17).

Una de las preguntas que quedan por resolver es: ¿Qué tan generales son estos sistemas de remodelaje de la cromatina? Existen dos posibles respuestas. La primera contempla la acción concertada entre los complejos de remodelaje de la cromatina y los factores de transcripción, posiblemente con la ayuda de cofactores, con los cuales se pueden atraer de manera específica estos complejos hacia regiones de control y colaborar en la regulación de un gen o grupo de genes. La segunda posibilidad sugiere una función más global por parte de estos complejos, en la que actuarían de una manera menos específica, incluso abarcando regiones más amplias dentro del genoma, por ejemplo a nivel de un dominio.

En conclusión, los complejos de remodelaje de la cromatina fomentan la movilización de los nucleosomas, tal vez, mediante la ruptura y restablecimiento de las interacciones entre las histonas v el ADN. Resultará interesante saber cuál es la función específica de cada uno de los distintos complejos de remodelaje, cuál es su participación in vivo, tanto en el ensamblaje como en el movimiento de los nucleosomas, qué función tienen estos complejos en la duplicación, recombinación y reparación del ADN, en la actividad de los elementos de regulación localizados a distancia y en la formación de dominios cromosómicos. Finalmente, podemos considerar que los complejos de remodelaje de la cromatina constituyen un eslabón dentro de la cascada de eventos que llevan a la reorganización de la cromatina, que contribuyen a la regulación de la expresión genética.

LA METILACIÓN DEL ADN

Una forma alternativa de regular la expresión de los genes, es la modificación covalente del ADN. El genoma de una célula de vertebrado adulto posee entre un 60 y 90% de sus citosinas en el dinucleótido CpG metilados (18). La metilación del ADN tiene efectos directos en la relación entre la estructura de la cromatina y la regulación de la expresión de los genes.

La metilación representa un mecanismo epigenético de información asociada al ADN, es decir, que ocasiona cambios heredables en la expresión genética, sin que ocurran cambios en la secuencia del ADN. Se piensa que la metilación surgió evolutivamente como una forma de protección contra los transposones, considerados como ADN parásito, para evitar inestabilidades genómicas (19). La metilación del ADN implica la presencia del grupo metilo en las citosinas, lo cual altera el patrón de aceptores y donadores de protones en el surco mayor de la doble hélice y representa un impedimento estérico para los factores de transcripción. Esto afecta directamente la función de un promotor o un 'enhancer', evitando la unión de factores de transcripción (18). De manera global, la metilación del ADN constituye la forma de transmitir, de una generación a otra, una señal tanto estructural como de regulación (20). La metilación del ADN puede ser heredada, dado que se mantiene después de la duplicación del ADN. Se propone que la metilación genera una marca epigenética que permite mantener un estado particular en la actividad genética a través de la división celular. Sin embargo, la metilación del ADN no es común en todos los eucariotos ya que en la levadura (Saccharomyces cerevisiae) y en la mosca de la fruta (Drosophila melanogaster) no se ha detectado metilación del ADN en sus genomas, por lo tanto, podemos suponer que en estos organismos han desarrollado distintos mecanismos de regulación. En el caso de los mamíferos, en particular en el ratón, la metilación juega un papel central en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Un estado de metilación del ADN casi inexistente permite que un gran número de genes requeridos para la diferenciación celular puedan ser expresados. Una transición drástica ocurre al momento del nacimiento, va que los niveles de metilación del ADN se incrementan de manera considerable, coincidiendo con la represión de un gran número de genes que ya no son necesarios para el desarrollo posterior del organismo. Si tomamos en cuenta la complejidad de un vertebrado, con un gran número de genes con distintas especificidades tisulares, la metilación proporciona un mecanismo global que permite reprimir de manera permanente, conjuntos de genes que no sean necesarios para una etapa determinada del desarrollo o simplemente no sean requeridos en un tejido en particular. Como consecuencia, surge la hipótesis que sugiere que la metilación permite que la maquinaria de transcripción se concentre en aquellos genes cuya expresión sea necesaria, generando posiblemente un ahorro de energía.

De manera general, son dos los mecanismos por los cuales la metilación puede reprimir la expresión genética. El primero y más directo, es mediante la metilación del dinucleótidos CpG localizados en sitios claves en regiones de control, por ejemplo un promotor. Al ser metiladas dichas secuencias, se evita el reconocimiento y unión de factores de transcripción a sus secuencias blanco. El segundo mecanismo, que fue descubierto recientemente, establece una relación directa entre el estado de metilación del ADN y la estructura de la cromatina. La represión mediada por la metilación depende de la unión de factores que reconocen el ADN metilado, tales como las proteínas MeCP1 y MeCP2 (21). Se ha demostrado que esta unión trae como consecuencia la atracción de un complejo multi-peptídico, el cual mediante interacciones proteína-proteína, en particular con mSin3, recluta a una desacetilasa de histonas. Esto provoca la formación de una estructura nucleosomal más estable y fomenta un mayor grado de compactación de la cromatina (Fig. 3) (21). Esta es la primera evidencia que muestra una conexión entre la metilación y la modificación por desacetilación de histonas. A diferencia de la represión dependiente de secuencias definidas, este mecanismo de represión tiene un espectro de acción mucho mayor, dado que puede abarcar regiones completas del genoma, y no depende de secuencias consenso específicas (Fig. 3).

Al transformar de manera estable ciertas líneas celulares, la expresión del transgen es variable y en la mayoría de los casos, se presenta un silenciamiento progresivo. Este silenciamiento depende de un proceso gradual de desacetilación y metilación, que trae como consecuencia un estado de la cromatina totalmente inaccesible a elementos de regulación (16). Esta observación sugiere una relación causal entre la metilación y la desacetilación de las histonas como un mecanismo permanente de represión (16, 21).

En conclusión, la metilación constituye un sistema tanto local como global de control de la expresión mediada por la represión de la transcripción. Recientemente, se ha propuesto una vía global para la acción de la metilación, a través de la desacetilación de histonas, promoviendo una estructura de la cromatina condensada con efectos represores permanentes (Fig. 3) (21).

CONCEPTO DE DOMINIOS CROMOSÓMICOS

Los eventos de regulación a nivel de la estructura de la cromatina antes mencionados, no se pueden entender como eventos aislados y desorganizados dentro del genoma. Se ha propuesto que las modificaciones en la estructura de la cromatina que preceden al inicio de la transcripción se llevan a cabo en zonas bien definidas del genoma, conocidas como dominios cromosómicos activos (22, 23).

Evidencias citogenéticas y bioquímicas han demostrado que el genoma de una célula eucariote se encuentra organizado en dominios independientes. Cada dominio está constituido por un gen o grupo de genes que poseen un programa específico de expresión.

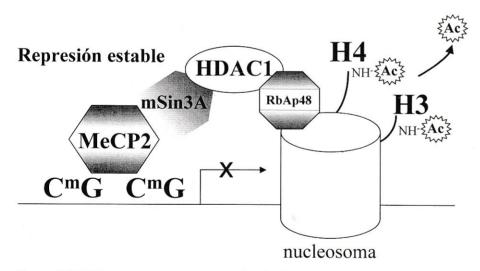


Figura 3. Modelo propuesto que muestra la relación entre la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas. La proteína MeCP2 tiene la capacidad de unirse al ADN metilado, en particular, en el dinucleótido C^mpG. Mediante interacciones proteína-proteína (mediante el cofactor RbAp48) se recluta a la desacetilasa HDAC1, la cual, en una matriz de cromatina, provocará la desacetilación de las regiones amino terminal de las histonas. Lo anterior trae como consecuencia un estado condensado de la cromatina que Razin ha propuesto como un estado de represión estable (21). Este mecanismo de regulación mediado por la cromatina resulta ser independiente de secuencias específicas en el ADN. Sólo depende del estado de metilación del ADN y puede silenciar regiones amplias en el genoma.

Observaciones de los cromosomas en distintos organismos realizadas por microscopía electrónica mostraron la existencia de dominios transcripcionalmente independientes. En Drosophila, el patrón de bandas de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de embriones, conocidos como 'bandas' e 'inter-bandas', muestran una organización basada en dominios independientes (Fig. 4) (23). Las 'bandas' corresponden a regiones donde se localizan un gen o un grupo de genes en un estado condensado de la cromatina, lo cual correlaciona con su inactividad transcripcional. Cuando un dominio es transcrito, la cromatina localizada en la 'banda' se relaja y descondensa, formando lo que se conoce como 'puff', permitiendo

el reconocimiento, por parte de la maquinaria transcripcional, de sus secuencias blanco (Fig. 4). Así pues, una 'banda' se transforma en un 'puff' cada vez que la estructura de la cromatina permite la formación de un dominio transcripcionalmente activo.

Desde el punto de vista bioquímico, una de las características principales de un dominio estructurado en cromatina, es su mayor sensibilidad al corte del ADN, por parte de distintas nucleasas (5, 7). La nucleasa más utilizada es la DNasa I, con la capacidad de digerir la doble cadena del ADN en zonas libres de nucleosomas. Una observación adicional que apoya el concepto de dominios, es que los sitios de hipersensibili-

dad al corte de la DNasa I, no sólo se encuentran en zonas cercanas a secuencias codificantes, sino que además, se pueden encontrar lejos y en ambos costados (5' y 3'), en relación a un gen o grupo de genes activos. En general, son tres clases de sitios de hipersensibilidad: i) los conocidos como tejido específicos, es decir, que coinciden con la expresión de genes tejido específicos ii) los constitutivos, que están presentes en la gran mayoría de tipos celulares y iii) los que forman un grupo de sitios conocidos como 'Locus Control Regions' (LCRs).

La primera clase de sitios de hipersensibilidad por lo general tienen funciones tejido específicas y corresponden a elementos de regulación tipo 'enhancer', donde se encuentran secuencias de unión al ADN para factores de transcripción general y específicos.

La segunda clase de sitios de hipersensibilidad, son los sitios constitutivos, es decir, que se encuentran en la mayoría de los tipos celulares estudiados. Por lo general, estos corresponden a elementos estructurales de la cromatina como los 'insulators' o delimitadores, los cuales son secuencias reconocidas por factores nucleares (Fig. 5) (23, 24).

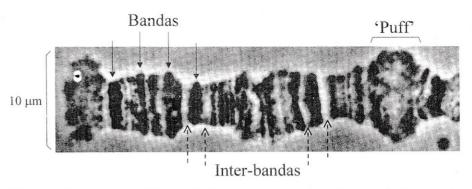


Figura 4. Cromosoma politénico de glandulas salivales de embriones de *Drosophila*. Los cromosomas politénicos son cromosomas gigantes que al ser teñidos pueden ser observados al microscopio óptico de luz. Presentan un patrón de bandas claras y obscuras, llamadas inter-bandas y bandas, respectivamente. Son aproximadamente 5000 las bandas que se observan en el genoma de *Drosophila*, cada una de las cuales abarca de entre 3 y 300 kbs. El estudio de mutantes y el reconocimiento de las regiones alteradas en los cromosomas ha permitido la localización de genes de manera individual. Estas localizaciones han demostrado que cada banda corresponde aproximadamente a una unidad genética o dominio (ver texto). Además, cada banda, estructurada en cromatina, tiene la capacidad de descondensarse formando una estructura conocida como 'puff', donde el gen o grupo de genes contenido en el 'puff' se encuentra activo transcripcionalmente. Estas observaciones apoyan el concepto de dominio, en donde la formación de un 'puff' representa un evento coordinado, en donde la estructura de la cromatina juega un papel activo.

Se ha propuesto que estás secuencias tienen dos funciones principales. La primera es la de delimitar un dominio, protegiéndolo de cambios en la estructura de la cromatina en dominios vecinos. La segunda, la de evitar la acción de elementos de regulación ajenos al dominio (23, 24).

El tercer tipo de sitios de hipersensibilidad, comprende los LCRs (5). Estos se han estudiado intensamente desde los años 70's y fueron originalmente definidos en el grupo de genes β-globina humanos (Fig. 5A). Se descubrió que en enfermos talasémicos, es decir, enfermos con anemias crónicas, las regiones codificadoras para la globina se encontraban intactos, sin ninguna mutación. Estudios más detallados, demostraron una serie de deleciones en la región río arriba del primer gen de la globina (Fig. 5A). Posteriormente se demostró que estas deleciones ocasionaban la pérdida de un grupo de 6 sitios de hipersensibilidad a la DNasa I, provocando un efecto dramático en la regulación de la expresión de los genes β-globina (5). Después de muchos años de esfuerzo, aún se desconoce el mecanismo de acción de los LCRs. La propuesta más reciente sugiere que los LCRs tienen una función dual: fomentando el relajamiento y la apertura de la cromatina de todo el dominio globina, y regulando

los niveles de expresión de los genes contenidos en el dominio (5).

Una constante en los elementos LCR, es que sus efectos en la regulación de la expresión genética ocurren a distancia (25), aunque se desconocen sus mecanismos de acción a distancia. Básicamente son cuatro los modelos propuestos: i) la formación de un 'loop' o asa que pondría en contacto a los elementos a distancia, con los promotores individuales, colaborando así en la expresión específica, ii) el 'tracking' o encarrilamiento que propone que estos elementos constituyen sitios de entrada a la maquinaria de regulación de la transcripción, iii) recientemente se ha comprobado la existencia de transcritos en regiones codificantes y que se inician cercanos al LCR; se piensa que estos transcritos, que no codifican ningún producto peptídico, corresponden a RNA's estructurales que fomentan la apertura de la cromatina y iv) experimentos realizados en Drosophila y apoyados en evidencias genéticas, sugieren que la comunicación a gran distancia entre elementos de regulación puede darse mediante la colaboración e interacción de proteínas que formando una cadena o puente, facilitaría los contactos entre el LCR y el promotor a ser regulado (modelo propuesto como 'linking') (5, 25).

Uno de los dominios mejor estudiados, es el que agrupa a los genes β-globina de pollo (Fig. 5B). Este dominio abarca alrededor de 33 kilo bases (kbs) y contiene cuatro genes expresados en distintas etapas del desarrollo: un gen embrionario ε , uno fetal ρ y dos genes adultos β^{H} y β^{A} . El dominio posee un LCR constituido por tres sitios de hipersensibilidad a la DNasa I que se presenta sólo en linajes celulares eritroides (Fig. 5B). Delimitando esta región genómica, se identificó en el lado 5', un sitio constitutivo de hipersensibilidad a la DNasa I con las propiedades de un 'insulator' o delimitador (22, 24). Recientemente se ha identificado, en el lado 3', el límite de este dominio definido por una clara transición en el estado abierto de la cromatina y por el descubrimiento del siguiente dominio representado por un gen que codifica para uno de los receptores olfatorios (Fig. 5B), conocido como 3'HS (26). En el lado 5' del dominio β-globina se identificó y caracterizó una región de 16 kbs de ADN con-

densado, conteniendo secuencias repetidas y altamente metiladas. Después de esta región, se descubrió el siguiente dominio constituído por un gen que codifica el receptor de folato (Fig. 5B) (27). Este gen tiene una expresión eritroide-específica, pero con un programa distinto al de los genes β-globina (27). En el lado 3', en relación con el sitio 3'HS, se localiza el siguiente dominio, representado por un gen miembro de la familia de receptores olfatorios (Fig. 5B) (26). Este es el primer ejemplo que muestra, a este nivel. una organización en dominios del genoma en células de mamíferos. Como podemos apreciar, estos dominios tienen límites bien definidos con actividades tipo 'insulator'. Se propone que estos límites protegen a un dominio de la acción inespecífica de elementos de regulación aledaños, y/o evitan que cambios en la estructura de la cromatina en un dominio invadan sus dominios vecinos. La organización del genoma en dominios cromosómicos transcripcionalmente activos, representa una etapa clave dentro de la regulación genética.

En resumen, existen evidencias claras de una organización en dominios cromosómicos, en los cuales un gen o grupo de genes pueden ser transcritos de una manera regulada. Si analizamos la expresión de uno de estos genes, el primer nivel de regulación se relaciona con la misma cromatina, puesto que su estructura y la formación de un dominio favorable para su expresión, representa la primera etapa dentro de dicha regulación. A su vez, colaborando y complementando este primer nivel de regulación, los LCR's permiten la transición entre la apertura de un dominio cromosómico y el inicio del proceso directo de activación a través de una función tipo 'enhancer' y la interacción específica con el o los promotores y la maquinaria de inicio de la transcripción.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Hoy en día, la regulación diferencial de un gen eucarioto no puede ser entendida sin tomar en cuenta el contexto cromosómico en el que se encuentra (6). Se ha dado un gran avance en la identificación y purificación de los componentes de la maquinaria basal de la trancripción y los factores de regulación. Pero poco se sabe de los mecanismos por los cuales un 'enhancer', un LCR o un

'insulator' participan en la regulación de la expresión genética. Lamentablemente, existen limitantes técnicas que no permiten el estudio de estos fenómenos in vivo, es decir, de una manera más cercana a lo que acontece realmente en la célula. Lo que queda claro es que una cascada de eventos, ligados directamente a la estructura de la cromatina, es decir, a la estructura y estabilidad nucleosomal, son necesarios para la función de un gen. Hemos visto que la acetilación y desacetilación participan directamente en la modificación postraduccional de las histonas, con consecuencias directas en la regulación de la expresión genética a través de cambios en la estructura de la cromatina. Recientemente, un número importante de complejos de remodelaje de la cromatina han mostrado su importancia tanto en la activación como en la represión. Ligado a lo anterior, la metilación, propuesta originalmente como un mecanismo de defensa del genoma, constituve actualmente un medio epigenético de represión transcripcional. Finalmente y con la intención de poner todos estos conceptos en un contexto natural, se propone que los procesos de modificación de la cromatina ocurren a nivel de un dominio cromosómico. Dichos dominios, además de tener sus límites, poseen mecanismos de apertura y mantenimiento. La información acumulada hasta

ahora, con relación a los dominios, no permite establecer generalidades en cuanto a la forma en que éstos se establecen. Se piensa que la formación de un dominio debe ser flexible, dinámica y capaz de adaptarse a distintos medios ambientes del genoma

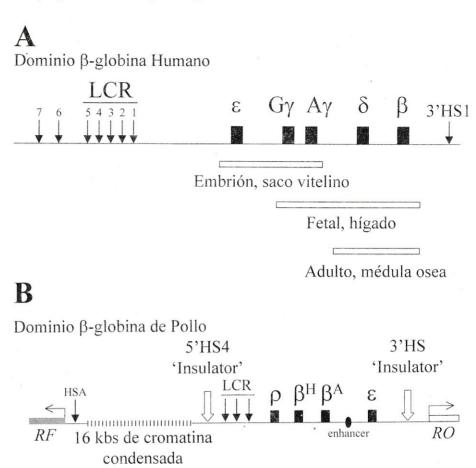


Figura 5. Ejemplo de dos dominios cromosómicos. A. El dominio β -globina humano con una organización evolutiva conservada. Durante el desarrollo, los genes se expresan en el orden 5'-3'. Este grupo de genes abarca más de 45 kbs y posee una serie de sitios de hipersensibilidad a la DNasa I en células eritroides que conforman el LCR ('Locus Control Region') del dominio (5). A cada sitio del LCR se unen factores de transcripción como GATA-1 y EKLF, entre otros, en una organización modular. Se desconoce el mecanismo por el cual LCR actúa a distancia. Son dos las funciones porpuestas (5). La primera sugiere una actividad tipo 'enhancer' fomentando la transcripción en las diferentes etapas del desarrollo de los genes β-globina. La segunda sugiere la participación del LCR en la apertura, abarcando el dominio completo, de la estructura de la cromatina para favorecer los eventos posteriores de regulación y transcripción. Los rectángulos blancos debajo del esquema muestran el patrón de expresión de los genes a lo largo del desarrollo. **B.** El grupo de genes βglobina de pollo posee una organización similar al del humano. En este dominio existe un 'enhancer' compartido por el gen adulto β^A y el gen embrionario ϵ . Se sabe mucho a cerca de este dominio, lo que sobresale de estudios recientes es la identificación de sus límites y dominios adyacentes, RF: gen del receptor de folato y RO: gen del receptor olfatorio (26, 27). Estos límites han sido definidos como 'insulators' o delimitadores. Se propone que estas secuencias, además de definir un dominio, colaboran en mantenerlo en un estado 'abierto', favorable para la expresión de los genes incluidos en él.

(23). Entender la relación entre la estructura de la cromatina y la regulación genética, representa en la actualidad un reto científico de gran interés y seguramente su comprensión tendrá consecuencias directas en problemas relacionados con la salud.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los comentarios y sugerencias de Blanca Pastrana, Lina Riego, Alejandro Zentella y Jesús Aguirre.

REFERENCIAS

- Luger K, Mader A W, Richmond R K, Sargent D F y Richmond T J (1997) Crystal structure of the nucleosome core particule at 2.8 Å resolution. Nature 389: 251-260.
- 2. Wolffe A P y Hayes J J (1999) Chromatin disruption and modification. Nucleic Acids Res 27: 711-720.
- 3. Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature *389*: 349-352.
- Luger K y Richmond T J (1998) The histone tails of the nucleosome. Curr Opin Genet Dev 8: 140-146.
- Bulger M y Groudine M (1999) Looping versus linking: toward a model for long distance gene activation. Genes Dev. 13: 2465-2477.
- 6. Felsenfeld G (1996) Chromatin unfolds. Cell 86: 13-19.
- Hebbes T R, Clayton A L, Thorne A W y Crane-Robinson C (1994) Core histone hyperacetylation comaps with generalized DNase I sensitivity in the chicken β-globin chromosomal domain. EMBO J 13: 1823-1830.
- 8. Kuo M H y Allis C D (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. BioEssays 20: 615-625.
- Brehm A y Kouzarides T (1999) Retinoblastoma protein meets chromatin. TIGS 24: 142-145.
- Murphy M, Ahn J, Walker K K, Hoffman W H, Evans R M, Levine A J y George D L (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. Genes Dev 13: 2490-2501.
- 11. Strahl B D y Allis D C (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403: 41-45.
- 12. Varga-Weisz P D y Becker B P (1998) Chromatinremodeling factors: machines that regulate. Curr Opin Cell Biol *10*: 346-353.
- 13. Kingston R E y Narlikar G T (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. Genes Dev *13*: 2339-2352.
- 14. Tyler J K y Kadonaga J T (1999) The "Dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. Cell *99*: 443-446.

- 15. Holstege F C, Jennings E G, Wyrick J J, Lee T I, Hengartner C J, Green M R, Golub T R, Lander E S y Young R A (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell 95: 717-728.
- 16. Pikaart J M, Recillas-Targa F y Felsenfeld G (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. Genes Dev 12: 2852-2861.
- Bird A P y Wolffe A P (1999) Methylation-Induced repression_ Belts, Braces and chromatin. Cell 99: 451-454.
- Ng H-H y Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. Curr Opin Genet Develop 9: 158-163.
- 19. Kass S U, Pruss D y Wolffe A P (1997) How does DNA methylation repress transcription? TIG 13: 444-449.
- 20. Singal R y Ginder G D (1999) DNA methylation. Blood *93*: 4059-4070.
- 21. Razin A (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing- a three-way connection. EMBO J 17: 4905-4908.
- 22. Bell A, Boyes J, Chung J, Pikaart M, Prioleau M-N, Recillas F, Saitoh N y Felsenfeld G (1998) The establishment of active chromatin domains. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Vol.* 63: 509-514.
- 23. Sun F-L y Elgin S C R (1999) Putting boundaries on silence. Cell 99: 459-462.
- 24. Bell A y Felsenfeld G (1999) Stopped at the border: boundaries and insulators. Curr Opin Genet Dev 9: 191-198.
- 25. Dorsett D (1999) Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. Curr Opin Genet Devel 9: 505-514.
- 26. Saitoh N, Bell A C, Recillas-Targa F, West A W, Simpson M, Pikaart M y Felsenfeld G (2000) Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken β-globin domain. EMBO J 19: 2315-2322.
- Prioleau M N, Nony P, Simpson M y Felsenfeld G (1999) An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. EMBO J 18: 4035-4048.
- 28. Spencer V A y Davie J R (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. Gene 240: 1-12.

ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C: AVANCES Y PERSPECTIVAS

Erika P. Rendón Huerta y Martha Robles Flores. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria. C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico: erendon@elwebmail.com y rmartha@servidor.unam.mx

Recibido: 3 de septiembre de 1999. Aceptado: 22 de agosto de 2000.

RESUMEN

Las proteínas cinasas, las enzimas que catalizan el proceso de fosforilación de proteínas blanco, constituyen un mecanismo de regulación esencial en las células, ya que junto con las fosfatasas, son parte fundamental de la maquinaria del aparato de transducción de señales actuando como elementos amplificadores de los mensajes hormonales. La superfamilia de proteínas cinasas C, formada a la fecha por 11 isoformas en células de mamíferos, ha sido clasificada en tres subfamilias de acuerdo a su estructura y modulación. Esta revisión presenta una reseña histórica acerca del descubrimiento y la caracterización estructural y funcional de la familia de la proteína cinasa C así como los modelos que se han propuesto para explicar el proceso de su activación y regulación en la célula.

PALABRAS CLAVE: Proteína cinasa C, transducción de señales, fosforilación de proteínas, proteína cinasa C activa, translocación.

ABSTRACT

Protein kinases, the enzymes that catalize the phosphorylation of target proteins, constitute an essential regulation mechanism within the cells. These proteins together with the protein phosphatases are a fundamental part of the signal transduction machinery and act as amplifying elements of the hormonal messages. The protein kinase C superfamily, comprise until now 11 isoforms in mammalian cells, that have been classified in three subfamilies according to their structure and modulation. These review presents an historical description of the discovery and the functional and structural caracterization of the protein kinase C family, as well as the proposed models to explain its activation process and its regulation.

KEY WORDS: Protein kinase C, signal transduction, protein phosphorilation, activated C kinase, translocation.

INTRODUCCIÓN

La proteína cinasa C (PKC) pertenece a una familia de cinasas de residuos de serina y treonina que además de ser una parte integral del sistema de transducción de señales hormonales, juega un papel muy importante en el control de un gran número de procesos celulares, los cuales incluyen secreción, función de receptores de membrana, diferenciación celular y promoción de tumores.

La proteína cinasa C fue primero identificada por Nishizuka y colaboradores como un precursor para una proteína cinasa independiente de cofactores, la proteína cinasa M (PKM), la cual es generada por proteólisis (1). Poco tiempo después se demostró que la PKC intacta tenía actividad de cinasa cuando estaba asociada a membranas (2). La purificación, a partir de la membrana, de los componentes que activan a la PKC revelaron que los fosfolípidos ácidos, especialmente la fosfatidilserina (PS) podían mantener la actividad de la PKC en presencia de altas concentraciones de calcio (2). Posteriormente se identificó al diacilglicerol (DAG) como un cofactor adicional que podía incrementar la actividad máxima de la enzima, disminuyendo la concentración de calcio requerida a niveles fisiológicos. Estos hallazgos relacionaron a la PKC con la hidrólisis, estimulada por hormonas, de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) dando como resultado la producción de DAG y fosfatos de inositol, los cuales incrementan los niveles de calcio intracelular.

Hoy en día es bien conocido que la proteína cinasa C es parte integral del sistema de transducción de señales acoplado a fosfolipasa C (PLC).

El proceso de transducción inicia cuando un agonista, por ejemplo la vasopresina en hepatocitos, se une a su receptor (en este caso un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteína G). El complejo hormona-receptor cataliza el intercambio de GTP por GDP sobre una proteína G asociada, activándola. Esta proteína, activa a su vez a una fosfolipasa C en la membrana plasmática, la cual produce dos segundos mensajeros por hidrólisis del PIP₂. Los productos de esta hidrólisis son el DAG y el IP3. El DAG activa directamente a la proteína cinasa C uniéndose a estructuras conocidas como "dedos de zinc". El segundo producto derivado de la acción de la PLC, el IP3, difunde de la membrana plasmática al retículo endoplásmico, en

donde se une a receptores específicos y causa la apertura de canales de calcio liberando el calcio secuestrado al citosol. El aumento en las concentraciones de calcio junto con el DAG y la interacción de la PKC con fosfolípidos ácidos hacen que la cinasa se encuentre en su estado "catalíticamente competente" en el cual puede fosforilar a sus sustratos específicos.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

A la fecha se han identificado 11 isoformas de PKC en células de mamífero codificadas por 10 genes, las cuales constituyen una familia de cinasas cuyas estructuras están relacionadas entre sí. Las isoformas de PKC descritas (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , η , θ , λ , μ y ζ) poseen diferencias en cuanto a su localización, especificidad de sustrato y propiedades cinéticas (3).

Las subespecies βI y βII son el resultado del procesamiento alterno en donde cada uno de sus ARNm derivan de un solo gen.

Como se muestra en la figura 1, las isoformas que constituyen la familia de PKC están formadas

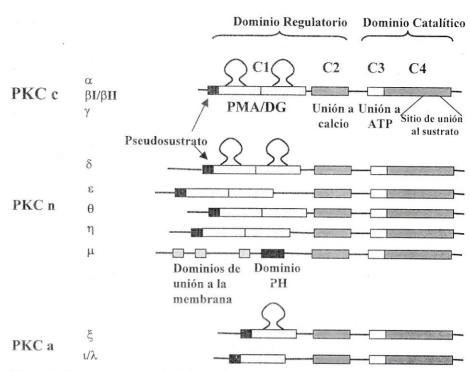


Figura 1. Estructura primaria de las diferentes subfamilias de proteína cinasa C, en donde se muestran la región pseudosustrato, las regiones altamente conservadas (C1-C4) las cuales constituyen los dominios regulatorio y catalítico y la región bisagra.

de una sola cadena polipeptídica, dividida en dos dominios separados por una región hipervariable (también llamada región bisagra): el dominio regulatorio (región amino-terminal) y el dominio catalítico (región carboxilo-terminal). Cada uno de estos dominios posee regiones altamente conservadas y regiones variables.

Las isoformas de PKC han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su estructura y a su regulación por cofactores: las convencionales (cPKC): α , β I, β II y γ , las cuales son reguladas por DAG, PS y Ca⁺²; las nuevas (nPKC): δ , ϵ , η , μ y θ reguladas por DAG y PS y las atípicas (aPKC): λ , y ζ cuya regulación no ha sido claramente establecida, aunque su actividad es estimulada por PS (Tabla I).

Dominio regulatorio.

El dominio regulatorio de la familia de proteínas cinasas C, posee un peso molecular que varía de 20 a 70 Kda de acuerdo a cada isoforma. Este dominio está constituido por una región autoinhibitoria de la enzima denominada la región pseudosustrato y por una o dos regiones conservadas: la

TABLA I

ISOFORMAS DE PKC EXPRESADAS EN TEJIDOS DE MAMÍFEROS.

PKC	SUBESPECIES	RESIDUOS DE AA.	ACTIVADORES LIPÍDICOS Y Ca ²⁺	EXPRESIÓN EN TEJIDOS
Convencionales	α	672	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFA,	Universal
Convencionares	βΙ	671	" " "	Algunos Tejidos
	βΙΙ	671	22 22 22	Muchos Tejidos
	γ	697	22 22 25	Cerebro
Nuevas	δ	673	DAG, PS	Universal
	3	737	DAG, PS, FFA, PIP,	Cerebro y otros
	η(L)	683	DAG, PIP ₃ , PS, Colesterol sulfato	Piel, Pulmón, Corazón
	θ	707	PS, ?	Músculo, Células T, etc
	μ	912	PS, ?	Células NRK
Atípicas	ζ $\lambda(i)$	592 587	PS, FFA, PIP ₃ ? PS, ?	Universal Muchos Tejidos

DAG: Diacilglicerol; PS: fosfatidilserina; FFA: Ac. grasos cis-insaturados; LysoPC: lisofosfatidilcolina; PIP₃: fosfatidilinositol 3, 4, 5-trisfosfato. Cinasas convencionales (cPKC), nuevas (nPKC) y atípicas (aPKC).

región C1 presente en todas las isoformas y la región C2 presente solo en las isoformas de cinasas C convencionales y nuevas. Se ha comprobado que cada una de estas regiones no son exclusivas de la familia de la PKC ya que están presentes en otras proteínas formando módulos funcionales y estructurales (4).

• La región pseudosustrato, presente en todas las isoformas, consiste de una secuencia de 8 aminoácidos (R-K-G-A-L-R-Q-K) muy parecida al sitio de fosforilación de los sustratos de la enzima. Esta región es la responsable de mantener a la enzima en su forma inactiva en ausencia de Ca⁺², DAG y fosfolípidos. La sustitución de un residuo de Ser en lugar del residuo de Ala, hace a esta secuencia un sustrato excelente de la cinasa por presentar residuos básicos flanqueando al sitio de fosforilación.

De acuerdo con algunos estudios, el papel de la región pseudosustrato es muy importante ya que se ha propuesto que en ausencia de cofactores activadores, la enzima se encuentra en una conformación plegada en la cual la región pseudosustrato se une a la región de unión al sustrato del dominio catalítico, evitando la fosforilación de sustratos potenciales. En esta conformación, la región pseudosustrato está protegida de proteólisis cuando la enzima no está catalíticamente activa, a diferencia de su estado activo en el cual esta región queda expuesta y es muy sensible a proteólisis por tripsina o endoproteasas (Fig. 2).

• La región C1, es una secuencia rica en cisteínas que coordina 2 átomos de Zn⁺², formando las estructuras llamadas "dedos de zinc". Esta se pliega en una estructura globular con dos hojas β apartadas formando la cavidad de unión al ligando. Es en esta región donde se lleva a cabo la unión del DAG y/o de ésteres de forbol (compuestos diterpénicos que pueden activar directamente a la PKC) a la cinasa, a través de la formación de puentes de hidrógeno y los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. Sorprendentemente, la unión del éster de forbol al dominio C1 no induce un cambio conformacional significativo pero altera la hidrofobicidad del dominio promoviendo interacciones hidrofóbicas con la membrana. Aunque todas las isoformas de la familia de PKC poseen dos de estas estructuras, excepto la isoforma ξ que posee una, se ha reportado que la estequiometría de unión de los ésteres de forbol a la cinasa C es de 1:1 (Fig. 3) (5).

• La región C2 es un motivo de secuencias regulatorias presentes en la naturaleza. Este dominio fue dilucidado a partir de la sinaptotagmina (6) (una proteína de vesículas sinápticas involucrada en la regulación del calcio) y de la fosfolipasa C (7). Esta región presente en las cPKC es una región rica en hojas B, cuva estructura tridimensional forma una cavidad en la cual se encuentra una secuencia de aspárticos con los cuales se lleva a cabo la interacción con los iones Ca+2. La unión de iones divalentes induce un cambio conformacional el cual expone residuos de

lisina sobre la cara anterior del dominio C2.

En las nPKC está presente una región denominada por algunos autores "C2-like" o región semejante a C2, ya que aunque presentan los residuos estructurales de la región C2, no poseen los grupos funcionales que parecen mediar la unión con el Ca⁺².

Dominio catalítico.

El dominio catalítico de la proteína cinasa C tiene una alta similitud con el de la proteína cinasa A. Este dominio de aproximadamente 45 kDa, está constituido por las regiones C3 y C4, presentes en todas las isoformas reportadas.

• La región C3, contiene una secuencia de Gly-X-Gly-X-X-Gly-X₁₆-Lys (donde X representa cualquier aminoácido), la cual es una estructura típica para los sitios de unión a ATP presente en todas las cinasas conocidas y en la cual el residuo de lisina juega un papel central. Esta secuencia es muy similar para todas las isoformas excepto para ξ en la cual el tercer residuo de glicina está reemplazado por un residuo de alanina.

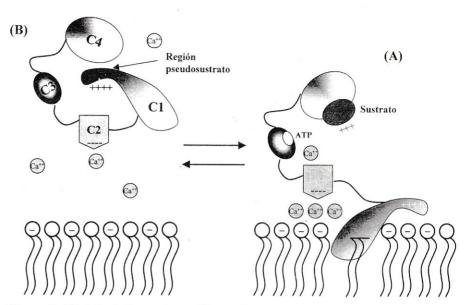


Figura 2. Modelo de la conformación activa (A) e inactiva (B) de la PKC. En la conformación inactiva, la región pseudosustrato de la cinasa C se encuentra interaccionando con la región de unión al sustrato (región C4). Después de ser fosforilada la PKC en el asa de activación y en el extremo carboxilo, la aparición de los cofactores específicos promueve la liberación de la región pseudosustrato permitiendo la interacción de la región C1 con la membrana y la fosforilación de los sustratos correspondientes.

 La región C4 está constituida por tres grupos de secuencias que son únicas en todas las isoformas de proteínas cinasas C. Estas secuencias son: Gly-Gly-Asp-Leu-Met, Tyr-Arg-Asp-Leu-Lys-Leu-Asp-Asn y Thr-Phe-Cys-Gly-Thr-Pro y constituyen la llamada "asa de activación". Su presencia es crucial para el reconocimiento del sustrato proteico y participan en la reacción de transferencia del grupo fosfato.

En la isoforma μ existen pequeños cambios que hacen que su especificidad de sustrato sea algo distinta.

ACTIVACIÓN DE LA PKC

La activación de la proteína cinasa C está regulada por dos mecanismos distintos e igualmente importantes: en el primero, la enzima alcanza un estado denominado "catalíticamente competente" por medio de fosforilaciones que alinean correctamente a los residuos para su catálisis, y en el segundo se lleva a cabo la unión de moduladores positivos (como el Ca⁺², el DAG y la PS) provocando la remoción de la región pseudosustrato del sitio de unión al sustrato.

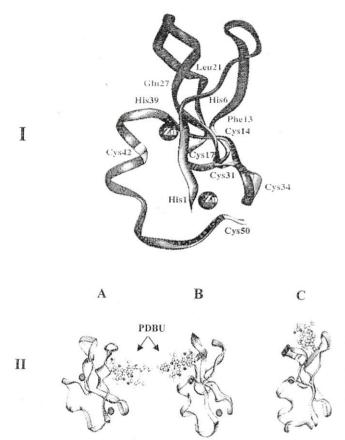


Figura 3. I) Estructura en solución determinada por resonancia magnética nuclear del segundo dominio rico en cisteina de la PKCα. Este dominio está constituído por dos cadenas β antiparalelas y una hélice en el extremo carboxilo terminal y II) Tres posibles modelos de unión del éster de forbol 12,13-dibutirato (PDBU). En los modelos A y B el éster de forbol puede estar localizado a ambos lados de las cadenas β antiparalelas y en C está localizado entre las dos cadenas. Tomada de J. Med. Chem. (1996) 39:2541-53.

Regulación por fosforilación in vivo

Experimentos del grupo de Fabbro y col. (8) dieron la primera evidencia de que las proteínas cinasas C son fosforiladas *in vivo*. Específicamente, ellos demostraron que la PKC es sintetizada como un precursor desfosforilado e inactivo de 74 kDa, posteriormente pasando de manera transitoria a una forma fosforilada de 77 kDa y finalmente como una forma madura de 80 kDa.

De acuerdo a las evidencias experimentales se ha propuesto que una vez que ha sido sintetizada, la PKC se convierte a su estado catalíticamente competente por una transfosforilación en el asa de activación, es decir es fosforilada por una cinasa de cinasa C. Recientes estudios han dado evidencia de que esta transfosforilación es realizada por la cinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) (9).

La carga negativa adquirida por esta fosforilación, alinea correctamente a los residuos que participan en la catálisis y localiza a la enzima en el citosol.

La primera consecuencia de la transfosforilación es una autofosforilación en el extremo carboxilo de la cinasa, estabilizando la conformación catalíticamente competente y probablemente regulando la localización subcelular de la enzima.

Las posiciones en las cuales se lleva a cabo la fosforilación de la cinasa han sido reportadas para la PKC β II: la Thr 500 en el asa de activación y Thr 641 y Ser 660 en el extremo carboxilo. Se ha demostrado por estudios de mutagénesis dirigida que la carga negativa en la posición 500 de la cinasa C β II es necesaria para mantener su estado catalíticamente competente.

Consistente con la regulación por dos fosforilaciones, algunos reportes indican que la proteína cinasa C madura aislada de baculovirus, está fosforilada en ambas regiones: el asa de activación y el extremo carboxilo terminal. La desfosforilación en el asa de activación provoca una pérdida de actividad de la proteína cinasa C, mientras que la desfosforilación en el extremo carboxilo terminal resulta en una refosforilación inmediata cuando se adiciona ATP.

De acuerdo a lo anterior, el asa de activación es entonces el primer sitio fosforilado en la proteína cinasa C, sin embargo, se ha propuesto que este sitio puede ser enmascarado cuando la región pseudosustrato ocupa el sitio activo, sugiriendo que el pseudosustrato debe estar fuera del sitio activo para que ocurra la fosforilación. De acuerdo a esta hipótesis, la desfosforilación del asa de activación requiere la conformación activa (sin el pseudosustrato) de la proteína cinasa C.

Como se mencionó anteriormente, después de la fosforilación en el asa de activación, la proteína cinasa C es autofosforilada en el residuo de treonina 641. La desfosforilación en esta posición de la PKC βII o una mutación que cambia el residuo de treonina por uno de alanina en la PKC βI resulta en una enzima que no puede ser activada (10). Curiosamente, una mutación en el residuo correspondiente para la PKC α resulta en una enzima activable, aunque muestra una baja estabilidad.

La tercera fosforilación *in vivo* se lleva a cabo en el residuo de serina 660. Esta fosforilación final correlaciona con la liberación de la proteína cinasa C al citosol, sugiriendo que su papel es dirigir la localización subcelular de la cinasa C. Las dos reacciones de autofosforilación en el carboxilo ter-

Señales que causan hidrólisis de fosfolínidos Medio extracelula SUSTRATO Enzima Proteína de Anclai Enzima Competente Enzima Sitios de Fosforilación Citoesqueleto 3 ATP 1. Fosforilación por PDK-1 Enzima Competente

Figura 4. Modelo para la regulación de la proteína cinasa C (PKC) por fosforilación, proteínas blanco y cofactores (tomado de Newton AC (1997) Curr Opinion Cell Biol. 9: 161-167). La PKC se asocia con el citoesqueleto en una conformación tal que expone el asa de activación manteniendo al carboxilo terminal (C) cercano al sitio activo. (a) Una transfosforilación por una cinasa de la cinasa C (en Thr 500 para la PKC βII) alinea correctamente los residuos para la catálisis, seguida de una autofosforilación en dos posiciones de extremo carboxilo terminal (Thr 641 y Ser 660 en PKC βII). La fosforilación en Thr 641expone a la cinasa en su estado catalíticamente competente y la subsecuente fosforilación en Ser 660 libera a la proteína cinasa C madura en el citosol. (b) El destino específico para cada isoforma de PKC puede estar modulado por proteínas de anclaje específicas. (c) La unión del diacilglicerol al dominio C1 y fosfatidilserina al dominio C2 provoca la remoción de la región pseudosustrato del sitio activo. El dominio C2 de las proteínas cinasas C convencionales tiene también un sitio de unión para Ca²⁺, el cual incrementa alostéricamente la afinidad de este dominio por fosfatidilserina y DAG. La interacción de la enzima activada con otras proteínas blanco, como los RACKs (receptores para la proteína cinasa C activa) puede ubicar a la enzima en regiones cercanas a sus sustratos. N, se refiere al extremo amino terminal.

minal parecen ser desencadenadas por la fosforilación en el asa de activación, por lo tanto, esta fosforilación mediada por una cinasa de cinasa C inicia esta cascada de fosforilaciones.

Aunque la fosforilación de las cinasas C se lleva a cabo en residuos altamente conservados, se han reportado casos en los cuales se ha observado fosforilación en residuos no conservados. Por ejemplo, la PKC δ es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a la activación de PKC en dos diferentes tipos celulares, sugiriendo que este evento pueda jugar un papel en la regulación de la actividad de esta isoforma diferente a las anteriormente

reportadas. Una explicación a estos hallazgos es que, probablemente, el mecanismo preciso de regulación para una isoforma determinada de PKC puede no ser el mismo para otras isoformas (Fig. 4).

Regulación por cofactores.

Para que se lleve a cabo la activación de la proteína cinasa C. se requiere de la remoción de la región pseudosustrato del sitio activo. Este cambio conformacional se favorece por la unión altamente específica de 1.2-sn-diacilglicerol, de calcio y de fosfatidilserina a los dominios que interaccionan con la membrana, C1 y C2. La unión de estos cofactores es suficiente para reclutar a la enzima en las membranas por una interacción hidrofóbica de baja afinidad. Sin embargo, adicionalmente ambos dominios deben estar unidos a la membrana por interacciones de alta afinidad que resultan en la remoción de la región pseudosustrato y en la activación máxima de la enzima (4).

El papel del Ca2+

En muchas células no estimuladas, la concentración de calcio es baja y se incrementa sólo transitoriamente en respuesta a estímulos hormonales. En contraste, las respuestas fisiológicas dependientes de calcio persisten aun cuando las concentraciones de calcio regresan a su estado basal. La activación prolongada de la PKC, es la responsable de mantener tales respuestas celulares. La movilización de calcio y la activación de la PKC actúan cooperativamente causando una variedad de respuestas celulares pero los mecanismos bioquímicos de este sinergísmo no están completamente entendidos. La movilización de calcio y la degradación de fosfolípidos están íntimamente relacionados y algunas veces son complementarios. En presencia de altas concentraciones de calcio, la activación de la PKC requiere menos degradación de fosfolípidos, mientras que en presencia de una intensa degradación de fosfolípidos se requiere de menos calcio para activar a la enzima.

La degradación de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato por fosfolipasa C lleva a la producción de DAG e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). El IP₃ se une a receptores específicos en retículo endoplásmico favoreciendo la liberación de calcio. El calcio liberado, incrementa las concentraciones de este catión en el citosol favoreciendo la interacción con los dominios C2 de la PKC para completar su activación.

El que la PKC requiera de calcio y fosfolípidos ácidos para su activación, llevó a pensar que las interacciones Ca²⁺-PS eran importantes. De acuerdo a esto, se han propuesto algunos modelos para explicar esta interacción.

En un primer modelo se propuso que cuando se une el calcio al dominio C2 se altera el potencial de superficie y este cambio en el potencial podía actuar como un "switch" electrostático y así regular las interacciones macromoleculares del dominio C2.

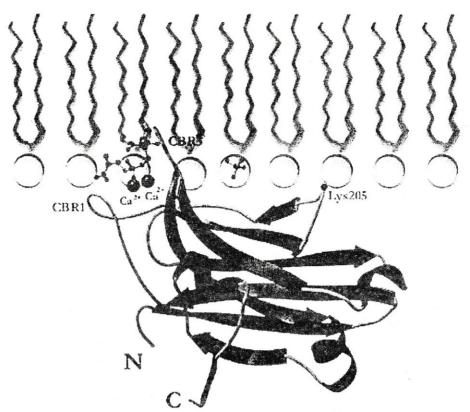


Figura 5. Modelo de la interacción del dominio C2 con la membrana plasmática. En este modelo se muestra la unión de dos iones de calcio en el surco formado por las asas β 2-3 y β 6-7. Asimismo se muestra la penetración del asa β 6-7 en la membrana y la interacción de la lisina 205 con los fosfolípidos de membrana.

Un segundo modelo basado en un sistema micelar, propuso que en la activación de la PKC las cabezas polares de los fosfolípidos ácidos se coordinaban con el calcio, el cual estaba unido a la región C2 de la proteína. La estequiometría obtenida en este modelo para las moléculas necesarias para la activación de la PKC fue de 4 moléculas de PS, 1 de Ca²⁺ y 1 de DAG.

Recientemente utilizando cristales del dominio C2 de la PKC α unido a calcio en presencia o ausencia de PS, se propuso un tercer modelo en el cual se muestra la presencia de dos iones calcio unidos a la región C2 en una cavidad formada por las hojas β 2-3 y 6-7. En este modelo se propone que el asa formada por las hojas β 6-7 es la que se inserta en la membrana lipídica y esta interacción se estabiliza con un grupo fosfato de la lisina 205 del mismo dominio presente en el asa formada por las hojas β 3-4 (Fig. 5). En ensayos de unión del dominio C2 a los fosfolípidos, se observó que la afinidad del dominio C2

a la fosfatidilserina incrementa con respecto al incremento en las concentraciones de calcio.

Aun cuando los modelos descritos anteriormente todavía están sujetos a revisión, éstos tratan de explicar cómo se lleva a cabo la interacción de las isoformas de PKC dependientes de calcio con la membrana y el papel fundamental del calcio. Sin embargo, todavía no existe a la fecha un modelo que pueda explicar la interacción de las isoformas de PKC que no dependen de calcio.

Fosfatidilserina y otros lípidos aniónicos.

En presencia de diacilglicerol, la proteína cinasa C posee una especificidad importante para unirse a fosfolípidos como la fosfatidil-L-serina, por lo menos en un orden de magnitud mayor que a membranas que contienen otro tipo de lípidos. Análisis bioquímicos y de mutagénesis han establecido que la región C2 se une a lípidos ácidos, sin embargo, las determinantes de unión para fosfatidilserina no han sido identificados todavía. Utilizando anticuerpos anti-idiotípicos para fosfatidilserina, se ha propuesto que en esta región reside un motivo de unión para este fosfolípido, paradójicamente, la mutación de este motivo no tiene ningún efecto sobre la regulación mediada por fosfolípidos.

Otros estudios han demostrado que las PKCs convencionales y nuevas interactúan con vesículas de fosfolípidos cargados negativamente a través de interacciones electrostáticas.

La fosfatidilserina es el fosfolípido preferido por la proteína cinasa C, sin embargo se ha encontrado actividad con ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol (PI). Por el contrario, la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) no tienen ningún efecto sobre la cinasa.

Por otro lado, la fosfolipasa A2 (PLA2) que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos generando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, generalmente ácido araquidónico. Algunos metabolitos oxigenados del ácido araquidónico, el araquidonato libre y la lipoxina A, así como la lisofosfatidilcolina también son activadores de la PKC.

Diacilglicerol y ésteres de forbol. Uno de los eventos clave en la activación de la proteína cinasa C dependiente de DAG y/o ésteres de forbol, es la "translocación" o redistribución de la enzima a la fracción membranal. Este evento ha servido como punto de partida para la realización de diversos estudios con los que se ha intentado dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales estas dos moléculas inducen la redistribución de la enzima.

El diacilglicerol (DAG) es un intermediario en la biosíntesis y degradación de glicerolípidos y un activador fisiológico de la PKC. El dominio hidrofóbico del DAG es crítico para asegurar que la molécula quede insertada en la membrana con una orientación tal que los grupos hidroxilo y carbonilo estén presentes en la interfase. Uno o más de estos grupos pueden interactuar específicamente con la cinasa y por lo menos uno puede ligar directamente al Ca²⁺. Esta unión en múltiples puntos del DAG al complejo PKC/PS/Ca²⁺ es un prerrequisito para la activación.

La proteína cinasa C es un receptor para promotores de tumores, como los ésteres de forbol. Estos son compuestos diterpénicos con una estructura muy similar a la del DAG que se intercalan fácilmente en la membrana activando directamente a la PKC.

Algunos estudios han revelado que el mecanismo por medio del cual el DAG y los ésteres de forbol activan a la PKC, es que ellos incrementan linealmente la afinidad de la PKC por las membranas. La interacción de la proteína cinasa C con los ésteres de forbol ha mostrado ser tan fuerte que ésta puede mantener una interacción de la PKC con membranas neutras, es decir en ausencia de lípidos ácidos y por lo tanto en ausencia de interacciones con el dominio C2 (5).

Como se mencionó anteriormente, la estequiometría de unión del éster de forbol a la PKC es de 1:1, sin embargo muchas de las isoformas de cinasa C poseen dos dominios C1. Aunque todavía no se entiende bien la presencia de estos dos dominios Blumberg y colaboradores (11) establecieron que estos dominios en la PKC intacta no son equivalentes, ya que realizando estudios de transfección usando mutantes de la PKC δ revelaron que el segundo dominio C1 juega un papel determinante en la "translocación" de la PKC en respuesta a éster de forbol.

REDISTRIBUCIÓN A SITIOS SUBCELU-LARES

Las isoformas de PKC inactivas se encuentran principalmente en el citosol mientras que sus activadores, los cuales tienen un carácter hidrofóbico, están presentes en la membrana.

Cuando la PKC está en su forma activa, se encuentra asociada con la membrana plasmática, elementos del citoesqueleto, núcleos y otros componentes subcelulares. Análisis inmunocitoquímicos, así como estudios usando microscopía convencional o confocal de fluorescencia revelan una localización específica y más compleja de las isoformas de PKC.

Una célula determinada puede expresar diversas isoformas de PKC. Muchas de estas isoformas se encuentran localizadas en estructuras subcelulares en su forma inactiva. Cuando son activadas, se translocan a nuevos sitios intracelulares. Algunos ejemplos son la PKCα, la cual en fibroblastos REF52 no estimulados está localizada en contactos focales y se transloca al perinúcleo después de su activación (12); la PKCβII asociada con estructuras fibrilares en miocitos cardiacos no estimulados se transloca al perinúcleo y a la periferia celular después de su activación (13). En las mismas células, la PKCε está localizada en el núcleo y el perinúcleo antes de la estimulación y se transloca a es-

tructuras estriadas y regiones de contacto célula-célula después de la activación (13).

Recientemente, ha sido posible observar la translocación de isoformas de PKCs convencionales (específicamente PKCy) mediante la utilización de proteínas de fusión expresadas en líneas celulares. En esta técnica, la isoforma de PKC es fusionada con proteína que emite fluorescencia verde (GFP) que sirve como una proteína marcadora. Utilizando esta técnica ha sido posible estudiar el proceso de translocación de la PKCδ y su implicación en la regulación del ciclo celular en células COS-7 y CHO-K1 en cultivo (14).

Por otro lado, el blanco subcelular por interacción con proteínas específicas provee un mecanismo atractivo para la regulación específica de cada isoforma. A continuación se describen brevemente los grupos de proteínas, descritos hasta la fecha, con los cuales pueden interaccionar las diferentes isoformas de PKC.

PROTEÍNAS QUE UNEN A PROTEÍNA CINASA C

La localización de diversas isoformas de proteína cinasa C en diferentes compartimentos celulares, ha generado la posibilidad de proponer un mecanismo en el cual se lleven a cabo interacciones proteína-proteína de la cinasa C con proteínas específicas, y que este mecanismo esté regulando el destino subcelular de cada isoforma. Recientemente se han identificado por lo menos tres grupos de proteínas que pueden interaccionar *in vivo* con diversas formas de proteína cinasa C.

Un grupo de ellas son proteínas que se unen a la PKC a través de un puente de fosfatidilserina y no requieren, en algunos casos, la activación completa de la PKC para su unión (15). Estas proteínas son sustratos de la PKC. Ejemplos de éstas son: talina, vinculina, MARCKS (sustratos de cinasa C ricos en alanina miristoilada), AKAP 79 (proteínas de anclaje a cinasas dependientes de AMPc), gravina/AKAP

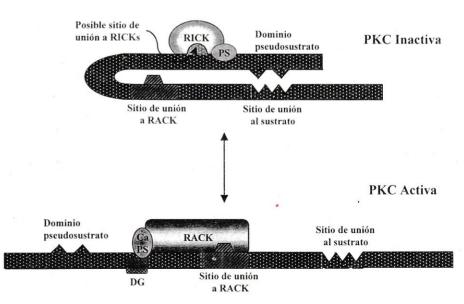


Figura 6. Modelo de la interacción de la PKC con proteínas de anclaje. Las proteínas RICKs se unen a la PKC inactiva y las RACKs a la conformación activa. Se representan los sitios de unión para estas proteínas en el dominio regulatorio de la PKC. Sin embargo también existen sitios para estas proteínas en el dominio catalítico.

250, SBRC (un producto génico relacionado a sdr que une cinasa C) y Btk ("Bruton tyrosine kinase").

Un segundo grupo de proteínas son las llamadas RACKs (denominadas así por receptor for activated C kinase). Estas proteínas unen solamente la forma activa de la PKC y esta unión es específica y saturable. Si bien se ha propuesto que las proteínas RACKs no son sustratos de PKC, hay trabajos que demuestran lo contrario.

Todos los reportes hasta la fecha, han mostrado que se requiere de una interacción específica proteína-proteína entre el RACK y la PKC, ya que no es suficiente con la formación de un puente de fosfatidilserina. Se ha sugerido que la interacción con estas proteínas, dependiente de glicerofosfolípidos, puede servir para estabilizar la asociación de la enzima activa con sitios específicos en la membrana (15). Actualmente existen diversos estudios realizados con RACK1, la primera de estas proteínas que ha sido clonada a partir de miocitos cardiacos de ratón. Estos estudios sugieren una especificidad de RACK1 para la PKCβII con la cual se une a través del dominio C2. Aún no ha sido comprobado si en las células existe un RACK específico para cada isoforma o subfamilia de PKCs; sin embargo, queda abierta la posibilidad de que así sea.

Un tercer grupo de proteínas que también interaccionan con PKC son las llamadas RICKs (receptores para la cinasa C inactiva). Estas proteínas unen, a diferencia de los RACKs, exclusivamente la forma inactiva de la proteína cinasa C. A la fecha se ha identificado una RICK para la PKCδ en el aparato de Golgi en células híbridas de neuroblastoma x glioma (NG 108-15) (16). El mecanismo de disociación es muy semejante al de las proteínas AKAPs que unen PKA en donde la AKAP se disocia después de una elevación en las concentraciones de AMPc. En el caso de los RICKs, se ha observado que el éster de forbol PMA u otros activadores promueven su disociación de la PKC. Estas proteínas al igual que los RACKs se sugiere que no son sustratos de PKC, aunque no es del todo cierto.

Un modelo para explicar la interacción de estas proteínas con la PKC se muestra en la figura 6.

PERSPECTIVAS

El avance en el estudio de esta familia de cinasas ha permitido tener una visión más amplia acerca de la importancia de estas proteínas en la fisiología y en los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual se regula la acción de las PKC por fosforilación así como los mecanismos moleculares implicados en su translocación en la célula todavía no son claros.

La presencia de diversas isoformas de PKC en una sola célula, así como el número de sustratos potenciales para estas enzimas, complica aún más los estudios para conocer el mecanismo por el cual cada una de estas isoformas puede ser activada y por lo tanto translocada. Algunas preguntas como: ¿por qué la activación de las PKCs se lleva a cabo para algunas isoformas en un momento determinado y para otras no?, y ¿por qué la translocación de cada isoforma se lleva a cabo hacia distintos sitios subcelulares y no hacia los mismos sitios?, hasta la fecha todavía no han sido del todo contestadas.

En la actualidad parece que la localización y la función de las diferentes isoformas de PKC estuvieran determinadas por la unión a diferentes proteínas de anclaje en diferentes sitios subcelulares. Por otro lado, hoy en día se está dando un gran impulso en diferentes campos de investigación para la identificación de inhibidores y activadores específicos para la translocación de la PKC, que puedan ayudar en gran medida a esclarecer estos procesos. Hoy en día se utilizan mutantes dominantes negativas o constitutivamente activas para una isoforma de PKC con el fin de definir la función de algunas de estas isoformas.

El advenimiento de técnicas como la microscopía confocal de fluorescencia, ha permitido también obtener una visión más clara de cómo es que la PKC se transloca, hacia dónde lo hace y con qué otra proteína podría interactuar.

Por último, debido a la demostrada participación de la PKC en los procesos de tumorigénesis y apoptosis celular, ha aumentado el interés acerca del potencial terapeútico de los inhibidores y activadores de la translocación de una determinada isoforma de PKC, tanto en la investigación básica como en la industria farmaceútica.

REFERENCIAS

- Takai Y, Kishimoto A, Inove M y Nishizuka Y (1977) Studies on a cyclic nucleotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. J Biol Chem 252: 7603-7609.
- Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T y Nishizuka Y (1979) Calcium-dependent activation of a multifuntional protein kinase by membrane phospholipids. J Biol Chem 254: 3692-3695.
- Dekker L V, Palmer R H y Parker P J (1995) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. Curr Opinion Struct Biol 5: 396.
- 4. Newton A C (1995) Protein Kinase C: seeing two domains. Curr Biol 5: 973-976.
- 5. Mosior M y Newton AC (1996) Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. Biochemistry *35*: 1612-1623.
- Sutton R B, Davletov B A, Berghuis A M, Sudhof T C y Spang S R (1995) Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca ²⁺/ phospholipid-binding fold. Cell 80: 929-938.
- Grobler J A, Essen L-O, Williams R y Hurley J H (1996)
 C2 domain conformational changes in phospholipase
 C-δ1. Nat Struct Biol 3: 788-795.
- 8. Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U y Fabbro D (1989) Biosyntesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. J Biol Chem 264: 13902-13909.

- Chau M M, Hou, W, Johnson J, Graham L K, Lee M H, Chen C S, Newton A C, Schaffhausen B S y Toker A (1998) Regulation of protein kinase C ξ by PI-kinase and PDK-1. Curr Biol 8: 1069-77.
- 10. Zhang J, Wang L, Schwartz J, Bond R W y Bishop W R (1994) Phosphorylation of Thr 642 is an early event of the processing of newly synthesized protein kinase C beta 1 and is essential for its activation. J Biol Chem 269: 19578-19584.
- Szallasi Z, Bogi K, Gohari S, Biro T, Acs P y Blumberg P M (1996) Non- equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cδ. J Biol Chem 271: 18299-18301.
- 12. Hyatt Sl, Klauck T y Jaken S (1990) Protein kinase C is localized in focal contacs of normal but not transformed fibroblast. Mol Carcinogen *3*: 45-53.
- 13. Mochly-Rosen D, Henrich C J, Cheever L, Khaner H y Simpson P C (1990) A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. Mol Biol Cell *I*: 693-706.
- Ohmori S, Shirai Y, Sakai N, Fujii M, Konishi H, Kikkawa U y Saito N (1998) Three distinct mechanisms for translocation and activation of the δ subspecies of protein kinase C. Mol Cell Biol 18(9): 5263-5271.
- 15. Mochly-Rosen D y Gordon A S (1998) Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. FASEB Journal 12: 35-42.
- Gordon A S, Yao L, Wu Z L, Coe I R y Diamond I. (1997)
 Ethanol alters the subcellular localization of δ and ε protein kinase C in Ng 108-15 cells. Mol Pharmacol 52: 554-559.

LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS ¿UN ENFOQUE EXPERIMENTAL ANTICUADO?

Gabriela Montero Morán, Laura I. Alvarez Añorve y Samuel Lara González. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado postal 70-159. C. P. 04510, México, D. F. Tel.: (525) 623-2168 Fax: (525) 616-2419. Correo electrónico: gabmar@servidor.unam.mx, laurai@bq.unam.mx, samuel@bq.unam.mx

Recibido: 24 de mayo de 2000. Aceptado: 17 de octubre de 2000.

RESUMEN

Las enzimas son biomoléculas cuyos mecanismos de acción y regulación constituyen un campo activo de investigación. Su estudio puede abordarse desde diferentes puntos de vista, por ejemplo: el cinético, estructural y termodinámico. Un estudio detallado de la función de los residuos importantes en la catálisis y unión de ligandos de una enzima involucra su modificación. Hay dos maneras de modificar una enzima, se puede alterar racionalmente el gen que la codifica por mutagénesis dirigida o bien, se puede actuar químicamente sobre la proteína, alterando específicamente las cadenas laterales de algunos residuos por modificación química. La mutagénesis dirigida se ha utilizado principalmente en la identificación de los sitios ligantes o catalíticos de las enzimas y en el análisis de su función. La modificación química es una herramienta poderosa que se ha utilizado para mapear sitios ligantes de las proteínas y es una técnica que nos permite obtener información valiosa acerca de una proteína, incluso cuando no conozcamos ni su estructura ni siquiera su secuencia. En el presente artículo explicamos las ventajas de las técnicas de modificación química en los estudios enzimológicos, las cuales complementan y amplían la visión que nos ofrecen los estudios estructurales o el estudio de mutantes sitio específicas.

PALABRAS CLAVE: Modificación química, mutagenesis dirigida, enzimas alostéricas, glucosamina 6-fosfato desaminasa (EC 3.5.99.6), *N*-acetilglucosamina 6-fosfato desacetilasa (EC 3.5.1.25).

ABSTRACT

Enzymes are bio-molecules whose mechanisms of action and regulation constitute an active research

field. Their study can be approached from different points of view, for example: kinetic and structural studies and physical thermodynamic analysis. A detailed study of the function of important residues in the catalysis or binding properties of an enzyme involves the alteration of the enzyme itself. We can modify an enzyme by two ways: the gene that encodes the enzyme can be rationally altered by site-directed mutagenesis, or the protein can be modified on the lateral chains of a residue by a specific chemical process "chemical modification". Site-directed mutagenesis has been mainly employed in the identification of binding and catalytic residues of enzymes and in the analysis of their function. Chemical modification is a powerful tool that has been used to map binding residues of proteins and it is a technique that allows us to obtain information about a protein even if its structure and sequence is unknown. The best approach to the analysis of enzyme functions is, therefore, a combination of both site-directed mutagenesis and chemical modification techniques.

KEY WORDS: Site-directed mutagenesis, chemical modification, glucosamine-6-phosphate deaminase (EC 3.5.99.6), *N*-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25).

INTRODUCCIÓN

Las enzimas representan una de las más diversas y sorprendentes biomoléculas presentes en los organismos; sus mecanismos de acción, especificidad, actividad catalítica y sus mecanismos de regulación constituyen un amplio campo de estudio. Las proteínas tienen diversos papeles, de hecho la vida, tal como la conocemos, realiza casi la totalidad de sus tareas por medio de las proteínas. La diversidad de las estructuras y funciones asociadas con las proteínas, son el producto de aproximadamente 3.5 miles de millones de años de evolución (1).

En las enzimas encontramos además de la función de reconocimiento específico, que es la base de la función de las proteínas en general, la función catalítica.

El estudio del mecanismo de acción de una enzima se puede abordar desde diferentes puntos de vista. Uno de ellos que es privativo de las enzimas, es a través de la reacción o reacciones que son capaces de catalizar, esto es, su estudio cinético. Un estudio cinético clásico nos da información sobre la secuencia de adición de sustratos o de salida de productos, el número y la composición de los complejos formados entre éstos y la enzima y las constantes de velocidad con que se suceden en el ciclo catalítico. También nos informa de la existencia de complejos abortivos y de complejos con diversos ligandos fisiológicos o artificiales, como es el caso de los inhibidores de diferentes tipos.

Cuando manejamos la concentración de ion H⁺ como variable, la cinética nos permite conocer el pK_a de los grupos participantes en la unión de ligandos o en el paso limitante de la velocidad de reacción. El estudio cinético de una enzima es una herramienta poderosa, y muy accesible para un laboratorio en el que, como ha dicho W. W. Cleland, se cuenta esencialmente con espectrofotómetros y cerebros humanos. La descripción formal del proceso cinético lleva a plantear un modelo de mecanismo que se conoce como mecanismo cinético, que contiene en general poca información estructural, siendo está además, hipotética y dependiente de la validez del modelo cinético propuesto. Un ejemplo derivado del trabajo de nuestro laboratorio es el estudio cinético de Souza y colaboradores (2) sobre la N-acetilglucosamina 6-fosfato desacetilasa de Escherichia coli, los autores han propuesto un modelo cinético que implica la acetilación transitoria de un residuo del sitio activo. El estudio cinético no nos permite conocer la naturaleza del residuo acetilado y la naturaleza especulativa de esta conclusión nos exige buscar información basada en métodos más directos y que no sean dependientes de un modelo. Con relación a este punto, hay que destacar que un modelo consistente con un conjunto de datos cinéticos, puede ser perfectamente consistente con ellos y ser además una excelente creación intelectual, pero no ser verdadero.

Si bien se puede conocer mucho acerca de la estructura de una proteína empleando técnicas fisicoquímicas en solución, los datos más espectaculares provienen de los métodos que permiten determinar la estructura tridimensional de las moléculas.

Una de estas herramientas es la resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN), que resuelve estructuras de no muy alto peso molecular (<18 kDa). La cristalografía de difracción de rayos X es más poderosa y más accesible, siempre que se disponga de la proteína cristalizada; ya es frecuente actualmente obtener datos a una resolución de 1.5-1.6 Å. La modelización es una herramienta teórica auxiliar que permite obtener estructuras tridimensionales de proteínas por predicción, tomando como base las coordenadas de una molécula homóloga y muy similar.

Cuando se resuelve la estructura de una enzima unida a ligandos funcionales o inhibidores, se tiene en forma directa la localización y la estructura detallada de los sitios ligantes, como pueden ser el sitio activo o el sitio alostérico (3). Con está información, a su vez, se puede plantear un posible mecanismo químico. No hay que olvidar, sin embargo, que la imagen cristalográfica de un sitio activo no sólo es estática sino que además fue obtenida en condiciones de cristalización (por ejemplo, alta fuerza iónica), que no son las condiciones naturales bajo las cuales funciona la enzima. Jeremy Knowles refiriéndose a la información cristalográfica, dijo que no podemos deducir el rendimiento de un caballo de carreras con sólo analizar sus fotografías.

En el caso del estudio de la enzima N-acetilglucosamina 6-fosfato desacetilasa de E. coli, creemos que la confirmación del mecanismo propuesto por Souza y col. provendrá del estudio cristalográfico que llevan a cabo actualmente Glaucius y colaboradores en São Carlos, SP, Brasil (4), con la enzima recombinante producida por Mendoza Hernández y col. en nuestro departamento. En este caso, la hipótesis planteada sobre el mecanismo de reacción implica que la enzima cristalizada en acetato tenga un residuo acetilado; la verificación cristalográfica del modelo parece ser el camino más sensato para confirmar o rechazar esta hipó-

tesis y tiene evidentes ventajas sobre los intentos de acetilación con acetato marcado. El acetato es un sustrato de la reacción reversa y se esperaría que exista una acetilación específica de un resido del sitio. Como ya sabemos que la mutante Asp248-Asn es inactiva, este aspartato es un buen candidato como portador del acetilo. La localización del residuo acetilado por medio del mapeo peptídico no es trivial porque se trata de un grupo hidrolizable.

El punto que nos interesa destacar es que el modelo estructural no sólo permite en muchos casos reconocer los sitios ligantes y estudiarlos con técnicas virtuales, sino que además nos da idea del mecanismo químico. Un ejemplo típico es el estudio, por parte de nuestro grupo, de la enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de E. coli, cuya estructura fue resuelta en colaboración con el grupo brasileño de Glaucius Oliva y con el de Eduardo Horjales en la UNAM. Con los datos cristalográficos de un complejo enzima-inhibidor competitivo y con la modelización del sustrato en forma piranosa en el sitio activo, se propuso un mecanismo químico para la enzima (5). Sin embargo, un modelo puede sugerir diversos mecanismos y plantear nuevas incógnitas. Un estudio fisicoquímico, derivado de las hipótesis que surgen del modelo estructural, es imprescindible para completar el conocimiento de una enzima. Si la historia de nuestra desacetilasa hubiese sucedido en orden inverso; es decir, primero se hubiese resuelto la cristalografía en la que por casualidad se hubiese usado acetato de potasio como sal precipitante y se hubiese descubierto que el Asp284 está acetilado (sólo una hipótesis en la fecha en que escribimos), hubiese sido la estructura la que hubiese inspirado el estudio cinético, en busca de este complejo estable, y de un paso de conversión de complejos enzima-acetato en acetil-enzima, el cual bien podría ser un paso limitante. Esto último hubiese sido la hipótesis, y la línea de razonamiento que guía la experimentación hubiera fluido en sentido contrario.

¿CÓMO SE ESTUDIA UNA ENZIMA?

En la aventura de revelar los secretos de la función enzimática no hay reglas ni protocolos fijos, pero un hecho es ineludible: en el estudio de un sitio activo tarde o temprano habrá que acudir a las técnicas que permiten introducirle modificaciones.

El enfoque del problema tiene algo en común con los métodos de cirugía experimental usados por los fisiólogos del siglo XIX para conocer la función de las principales glándulas de secreción interna. Éstas se extirpaban de un animal de experimentación y luego se observaban las alteraciones funcionales que se producían ¿Es esto aplicable a la ciencia de proteínas? La gran cantidad de información obtenida en esta forma, y que aparece en la literatura, nos llevaría a responder afirmativamente. Sin embargo, una modificación puede tener los efectos locales que deseamos provocar, pero también efectos inesperados, que nos sorprenderán a la hora de estudiar la proteína modificada. Éstos pueden ser efectos locales inespecíficos (impedimento estérico), cambios conformacionales a distancia o alteraciones de plegamiento nativo de la proteína. A pesar de esto, si se usan bajo condiciones estrictamente controladas, los métodos de modificación son una poderosa herramienta para mapear los sitios ligantes de las proteínas.

Pero, ¿cómo se explora la función? La idea fundamental es hacer que la proteína sea diferente a como está en la naturaleza y analizar los cambios en su estructura y su función que aparecen como consecuencia del cambio.

Disponemos de dos maneras de modificar una enzima, se puede alterar el gen que la codifica a modo de obtener mutantes diseñadas racionalmente, en las cuales algunos aminoácidos específicos aparezcan sustituidos por otros (lo que llamamos mutagénesis dirigida), o bien se puede actuar químicamente sobre la proteína, para alterar específicamente las cadenas laterales y algunos residuos (modificación química).

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA: Recompensas y Limitaciones

La mutagénesis dirigida constituye una herramienta poderosa en la ingeniería de proteínas, la cual se define como el diseño y construcción de nuevas proteínas por la manipulación de sus genes correspondientes. Esto implica el remplazo, supresión o adición de un residuo de aminoácido en la secuencia de una proteína natural o modificaciones mayores en las que se agregan, cambian o quitan fragmentos de cadena polipeptídica (6).

Las modificaciones a nivel genético pueden ser las interrupciones de cadena, la inserción de segmentos enteros o el entremezclado del ADN. Se recurre a una batería de técnicas, muchas de ellas basadas en la PCR para acelerar dramáticamente la generación de variedad en una biblioteca genética (7). Actualmente esta tecnología, combinada con técnicas de selección adecuadas, se utiliza para producir nuevas proteínas, imitando los métodos de la naturaleza. La técnica preferida para el estudio de mecanismos enzimáticos es la mutagénesis dirigida a sitios específicos, que procura introducir cambios locales, respetuosos de la estructura. La mutagénesis dirigida se lleva a cabo a través de la construcción del correspondiente ADN modificado, seguido de la expresión de la proteína recombinante para su posterior evaluación (8).

Esta técnica se ha enfocado principalmente a la identificación de los sitios ligantes o los sitios catalíticos y al análisis de su función, así como para establecer el papel de las cadenas laterales de los aminoácidos en el plegamiento de las proteínas.

La estructura cristalográfica de la enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de $E.\ coli$ muestra, que la His143 se encuentra formando parte del sitio activo. Este residuo está en contacto con el O5 del sustrato, sugiriendo que el grupo imidazol de esta histidina juega un papel importante en la catálisis (5). El anillo imidazólico de la His143 está flanqueada a su vez por los carboxilos del Asp141 y el Glu148, que interactúan con su nitrógeno δ 1 (Fig. 1). El sustrato es la glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) que es transformada en una reacción de isomerización-desaminación en fructosa 6-fosfato (Fru6P) y ion amonio.

Empleando mutagénesis dirigida para cambiar la His143 por glutamina y realizando un estudio de las propiedades ligantes y cinéticas de la mutante, comprobamos que la His143 tiene varias funciones, una de ellas en la unión de la forma extendida del sustrato al sitio activo. Demostramos además, que este residuo participa en la catálisis de la primera fase de la reacción, es decir la abertura del anillo de piranosa de la GlcN6P. Otro papel adicional del residuo se relaciona con la transición alostérica en esta enzima, His143 participa en el acoplamiento homotrópico-heterotrópico (Tesis de doctorado y artículo en preparación de GMM).

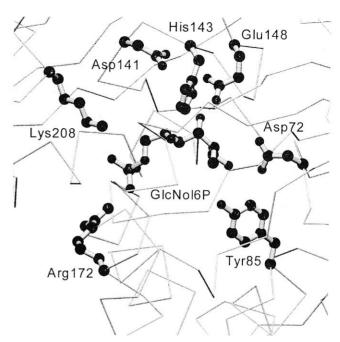


Figura 1. Representación esquemática del sitio activo de la enzima glucosamina 6-fosfato desaminasa de *E. coli* mostrando los residuos del sitio activo y las interacciones con un inhibidor competitivo (GlcNol6P). La His143 se encuentra flanqueada por los carboxilos del Glu148 y del Asp141. His143 participa en la apertura del sustrato (GlcN6P).

Sin embargo, los resultados de la mutagénesis dirigida no están libres de sospechas. Recordemos que la capacidad de una enzima para llevar a cabo su función depende de su estructura tridimensional nativa v de la estabilidad de ésta. Las fuerzas que mantienen la conformación nativa son del mismo tipo que las que intervienen en la unión de ligandos y en la catálisis. La mutagénesis dirigida, y también la modificación química específica, tienen como fundamento implícito que ambos fenómenos pueden analizarse por separado, y que hay residuos con función catalítica que no son fundamentales para el plegamiento nativo. Sin embargo, esto no puede afirmarse a priori y puede haber residuos que contribuyan a la vez a la conformación nativa y al proceso de unión y catálisis. La solución no es trivial, y requiere experimentación adicional. Más fácil resulta validar la mutagénesis dirigida cuando encontramos que la mutación disminuye seriamente la k_{cat} o la relación $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$, pero no se afecta significativamente la unión de sustratos y ligandos al sitio activo (constantes de disociación o bien valores de K_m en sistemas en equilibrio rápido). En este caso tenemos una garantía de la integridad geométrica del sitio y confirmamos que el residuo mutado tiene un papel directo en la catálisis, pero que

no participa en funciones ligantes. Un ejemplo de nuestro trabajo, es la mutante Asp71Asn de la desaminasa de $E.\ coli$ en la que la $k_{\rm cat}$ se hace $10\ {\rm mil}$ veces menor que en la enzima silvestre, pero la $K_{\rm m}$ para la GlcN6P sólo aumenta unas tres veces.

¿QUÉ ALTERNATIVAS OFRECEN LOS MÉTODOS DE MODIFICACIÓN OUÍMICA?

En los estudios de correlación estructura-función, puede plantearse la necesidad experimental de modificar un residuo racionalmente escogido en una posición determinada de la estructura de la proteína. Ya nos hemos referido a la mutagénesis dirigida, y frente a una metodología que parece impecable ¿qué ventaja puede tener la modificación química? La modificación química, salvo en rarísimas ocasiones, permite dirigir el cambio a una posición específica de la secuencia, ya que varios residuos similares pueden reaccionar simultáneamente. Llegados a este punto, nuestros lectores y lectoras concluirán que la pregunta que nos hacemos en el título tiene una respuesta afirmativa y que las técnicas de modificación química son cosa del pasado. Sin embargo, una revisión bibliográfica de los últimos años muestra que la modificación química de proteínas es un área activa y todos los años aparecen métodos y reactivos nuevos. ¿A qué se debe su vigencia? La mutagénesis dirigida y la modificación química tienen una diferencia esencial. La primera nos permite crear una enzima mutante que podremos comparar con la enzima silvestre. La modificación química también nos da una enzima modificada, pero nos da una información adicional y que suele ser la más valiosa, la cinética de la reacción de modificación. El estudio de la reacción química en sí puede ser tanto o más interesante que el de la enzima modificada químicamente. Ésta se puede estudiar mientras transcurre la reacción y nos puede dar mucha información sobre la proteína en sí. Además, si hacemos un experimento más completo y analizamos el curso de la reacción de modificación por medio de una señal química y al mismo tiempo valoramos el cambio de la función (por ejemplo la k_{cat}), podremos correlacionar ambas cinéticas.

Vista desde esta perspectiva, la modificación química y la mutagenesis son enfoques experimentales diferentes, que exploran aspectos complementarios de las propiedades de un sitio activo. Por este motivo su uso combinado y si es posible, apoyado con buenos datos cristalográficos, puede ser la forma más completa de encarar el estudio funcional de una enzima.

Ya hemos mencionado que no suele ser posible lograr la modificación química de la cadena lateral de un aminoácido determinado. Si estudiamos una reacción para cisteínas, es altamente probable que varias cisteínas reaccionen a la vez. Esto, no es una tremenda desventaja de los métodos químicos, porque a su vez es una importante fuente de información sobre la proteína que se esta investigando. A veces encontramos, residuos hiperreactivos, residuos poco reactivos o completamente ocultos. A veces algunos grupos se ven igualmente expuestos en el modelo cristalográfico, como ocurre con las Cys118, 228 y 239 de la glucosamina 6-fosfato desaminasa de E. coli. Ésta es una proteína alostérica, y puede ser estudiada en su estado T, de baja afinidad, o en su estado R, de alta afinidad por el sustrato. Lo que se observa con respecto a la reactividad de las cisteínas, es que sólo dos, Cys118 y Cys239 son reactivas en la forma T y en la transición alostérica de la forma T hacia la forma R, estos grupos SH parecen esconderse, porque su reactividad se hace nula (9, 10). En este caso, el cambio de reactividad química, nos permite monitorear la transición alostérica (10, 5).

Una situación experimental muy común es que la reactividad de los grupos que se modifican en una reacción química cambie por la presencia de determinados ligandos. Por ejemplo, en la glucosamina 6-fosfato desaminasa de E. coli, reaccionan seis histidinas con dietilpirocarbonato (DEPC). Al mismo tiempo, la enzima se inactiva, lo que se aprecia como una disminución de la $k_{\rm cat}$ aparente. Si se repite el experimento, saturando previamente la enzima con un inhibidor competitivo, reacciona una histidina menos y la actividad no se ve modificada. Entonces podemos postular que una sola histidina es esencial para la actividad y que se localiza en un sitio donde la presencia del inhibidor competitivo la protege, o sea, el sitio activo. Pero aún más: podemos estudiar el efecto de la concentración del inhibidor competitivo sobre la velocidad de reacción de la enzima con el DEPC. El experimento consistirá en averiguar cómo varía la constante de velocidad de reacción de la enzima con el DEPC a diferentes concentraciones del inhibidor competitivo, que en nuestro ejemplo, es el 2-desoxi-2-amino-glucitol 6-fosfato (glucitolamina-6-P). Este experimento nos permite calcular la constante de disociación del complejo enzima-glucitolamina 6-fosfato. Esta constante de equilibrio calculada a partir de datos de modificación química debe coincidir con el valor de K, para la glucitolamina 6-P como inhibidor competitivo. En nuestro ejemplo, la $K_{\rm d}$ para la GlcN-ol-6P obtenida como acabamos de explicar y el valor de K para este ligando calculada cinéticamente a partir de los datos de inhibición son de 0.002 mM en ambos casos. También sucede que en este caso el ion H+ se comporta como la glucitolamina-6-fosfato, es decir, protege a la His del sitio activo de la reacción de etoxiformilación con DEPC. Podemos hacer experimentos para estudiar el efecto de la variación de [H+] sobre la velocidad de reacción de modificación química. De los datos de este experimento, podemos deducir el pK_a del grupo modificado, en este caso el p K_a del grupo imidazol de la histidina del sitio activo. Cabe destacar que este enfoque experimental permite caracterizar el p K_a de grupos funcionales del confórmero alostérico libre de ligandos, lo que no es posible con métodos cinéticos convencionales en los que se varía la concentración de ion H+ ya que la presencia del sustrato provoca la transición de T a R (Fig. 2). En nuestro caso hemos establecido un p K_a de 7.60 para este residuo, cuando la enzima está en la conformación alostérica T. En la transición a la forma R, que se acompaña de cambios importantes en la estructura del sitio activo, medimos un p K_a de 6.4 con este mismo procedimiento. El análisis de este fenómeno es complejo, pero nos ilustra cómo la modificación química complementa a la mutagénesis dirigida (Montero et al, en preparación).

UN ENFOQUE COMBINADO QUE ECHA MANO DE TODOS LOS RECURSOS

Aun cuando no contemos con la estructura cristalográfica de una enzima, podemos detectar algunos aminoácidos esenciales para su función, recurriendo a las técnicas de modificación química. Éstas se basan en el empleo crítico de una serie de reacciones químicas razonablemente específicas para cada tipo de cadena lateral del aminoácido. Existen reacciones aceptablemente específicas para las cadenas laterales de algunos aminoácidos y otras que no lo son tanto (Tabla I).

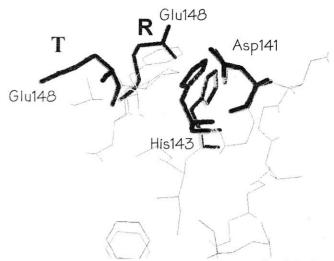


Figura 2. Transición alostérica de la Glucosamina 6-fosfato desaminasa, donde se muestran los dos confórmeros T y R. El residuo Glu148 cambia su posición con la transición alostérica acercándose al residuo de His143.

Como parecerá previsible, no existen reacciones de modificación específica para los aminoácidos cuyas cadenas laterales poseen poca o nula reactividad química, como es el caso de las cadenas alifáticas (Ala, Val, Leu, Ile, Pro). Su falta de reactividad hace que carezcan de funciones catalíticas y que su papel en las propiedades ligantes de la proteína sea menor y por lo general limitado a las interacciones hidrofóbicas. El papel funcional de estos grupos no se puede analizar por modificación química pero sí por mutagénesis dirigida. Un ejemplo de nuestro laboratorio es la modificación del anclaje de la tapa del sitio activo de la GlcN6P desaminasa de E. coli. Un residuo clave en este anclaje es la Phe174, que dirige su cadena lateral hacia el centro de la molécula y se relaciona con un nicho hidrofóbico en la estructura. No hay modificación química posible, pero la mutagénesis cambiando esta fenilalanina por una alanina permitió aumentar la movilidad conformacional del motivo que forma la tapa del sitio, lo que modificó profundamente las propiedades cinéticas (I. Bustos-Jaimes, tesis en preparación) y estructurales (E. Rudiño-Piñera, tesis en preparación) de la enzima. Este enfoque permitió reconocer el papel de la movilidad de esta tapa en la catálisis y la transición alostérica de la GlcN6P desaminasa de E. coli.

Cuando se ha establecido por medios químicos que un residuo determinado se relaciona con la función enzimática, nos enfrentamos a un nuevo problema: la identificación del residuo cuya modifica-

TABLAI

ALGUNOS DE LOS RI	EACTIVOS MÁS USADOS PARA LA MODIFICACIÓN DE RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS (3,14).	
AMINOÁCIDOS	REACCIÓN Y REACTIVO UTILIZADO	
Grupos carboxilo: Ac. Glutámico (Glu) Ac. Aspártico (Asp)	-Amidación de grupos carboxilo con carbodimidas solubles en agua: clorhidrato de etil-3-[3-(dimetilamino) propil] carbodimida (EDC), Puede reaccionar con Ser, Cys y TyrEsterificación con tetrafluoroborato de trietiloxonio, <i>N</i> -diazoacetilglicinamida.	
Grupos amino	-Guanidinación con <i>O</i> -metilisourea -Amidinación con metilacetimidato -Acilación con anhidrido acético, acetilimidazol, anhidrido maleico -Carbamilación con cianato de potasio -Alquilación con haluros de alquilo (Ej:ácido yodoacético) -Alquilación reductiva con formaldehido + borohidruro de sodio	
Arginina (Arg)	Reactivos dicarbonilicos, butanodiona y fenilglioxal. Se lleva a cabo en la oscuridad ya que puede destruir Tyr, Trp e His.	
Lisinas (Lys)	TNBS (trinitrobenceno sulfonato), cianato, fosfato de piridoxal (PLP)	
Histidina (His)	DEPC (dietilpirocarbonato)	
Grupos Tiol (SH) Cisteínas (Cys)	-Oxidación: ácido <i>p</i> -cloromercuribenzoico (PCMB) -Formación de Disulfuros mixtos: ácido 5,5 ditiobis (2-Nitrobenzoico) (DTNB) -Ditiopiridina. Adición etilénica (reacción de Michel): <i>N</i> -etilmaleimida (NEM) -Cianilación: 4-tiociano 1-nitrobenzoato (NTCB) o tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) -Oxidación: varios oxidantes, O ₂ , complejo <i>o</i> -fenantrolina-Cu ²⁺ -Agentes alquilantes como el iodoacetato, yodometano o iodoacetamida. Tambien los correspondientes bromoderivados Dinitrofluorobenceno, ácido bromo acético, <i>N</i> -etilmaleimida, DTNB 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico), anhídrido acético, 2-mercaptopiridina, <i>p</i> -cloromercuribenzoatoDisulfuros: reducción, reducción-cianilación (con CN ⁻), reacciones de intercambio tiol-disulfuro	
Tirosina (Tyr)	Nitración con tetranitrometano (TNM)	
Serina (Ser)	Agentes acilantes fuertes como el diisopropilfosfofluoridato	
Triptofano (Trp)	Oxidación con N-bromosuccinimida (NBS), Ozono, Yodo, 2-hidroxi-5-nitrobencil bromuro.	
Metionina (Met)	Iodoacetato, alquilación con yodometano (formación de sal de sulfonio).	

ción altera la función. Como ya hemos explicado, el efecto protector de los ligandos específicos del sitio que se estudia (activo o alostérico) suelen proteger a la proteína del agente modificador. Esto no sólo ayuda a localizar el grupo crítico para la función, sino que hace posible jugar con los reactivos para derivatizarlos en forma específica. Supongamos que una proteína tiene cuatro cisteínas, todas reactivas en el estado nativo de las cuales sólo una se protege con un ligando específico (sustrato o inhibidor sin salida), por lo que inferimos que puede localizarse en el sitio activo. Una forma de modificarla específicamente aprovechando la protección por ligandos es la siguiente: saturamos la enzima de ligando y ha-

cemos reaccionar las Cys restantes con un reactivo que las modifique reversiblemente, como el metilmetano tiosulfonato (MMTS). Luego quitamos el ligando protector, y modificamos la cisteína que queda accesible, con un reactivo de modificación irreversible, por ejemplo yodometano, yodoacetamida o *N*-etilmaleimida. Finalmente quitamos los grupos -S-CH₂SO₃ unidos a las cisteínas periféricas, valiéndonos de un reductor, por ejemplo ditiotreitol (o ditioeritritol). Este paso regenera los grupos SH que habían reaccionado con el MMTS pero no los que se alquilaron, por ejemplo, con yodometano y tienen un grupo -CH₃ unido al azufre de la Cys. La identificación de las Cys reactivas puede hacerse

por mapeo peptídico, aprovechando que la cianilación de los tioles hace que la cadena polipetídica sea muy sensible a la hidrólisis alcalina. La unión hidrolizada es la Xaa-CySCN, donde Xaa es un aminoácido cualquiera y CySCN es la S-cianocisteína. Todos estos recursos fueron usados por Altamirano y col. para el estudio del papel funcional de las cuatro cisteínas de la GlcN6P desaminasa de E. coli, en combinación con la construcción de mutantes (10).

El éxito de la modificación química es llegar a producir un cambio en alguna propiedad de la enzima que puede correlacionarse con el papel funcional de un residuo específico.

Una limitación de la mutagénesis dirigida consiste en que no permite modificar los grupos amino o carboxilo terminales, ya que siempre habrá extremos terminales.

La transaminación química específica proporciona un método de eliminación del grupo amino terminal. En el estudio de la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli* se aplicó la técnica de transaminación altamente selectiva, no enzimática, del grupo amino terminal, convirtiendo el amino terminal en un 2-oxoacilo el cual puede reducirse a su correspondiente alcohol (Fig. 3). El procedimiento que permite hacer la "mutación química" que reemplaza un residuo de metionina por uno de a 2-oxo-4-(metil-tio) butirilo, fue desarrollado en nuestro grupo por Lara-González y col. (11), esto ha permitido conocer el papel del grupo amino terminal en la propagación de la transición alostérica en la molécula de esta enzima.

¿SE PUEDEN USAR CONDICIONES DE RE-ACCIÓN DESNATURALIZANTES?

Actualmente es posible renaturalizar proteínas completamente desplegadas, por ejemplo en urea 8M o en cloruro de guanidinio 6M. Algunas estructuras se repliegan en forma espontánea con buenos rendimientos (por ejemplo, la triosafosfato isomerasa). Sin embargo, en muchos casos sólo se puede tener una renaturalización eficiente si se recurre a ciertas proteínas que catalizan el replegamiento, las llamadas chaperoninas o foldasas. Su función es asistir el plegamiento de proteínas recién sintetizadas o corregir los efectos de un cho-

grupo 2hidroxi4(metiltio)butirilo

Figura 3. Reacción de transaminación y reducción de la metionina N-terminal de la GlcN6P desaminasa de E. coli.

que térmico (12). Altamirano y col. desarrollaron un método de replegamiento basado en foldasas modificadas por ingeniería de proteínas e inmovilizadas en un soporte cromatográfico (*cromatografía de replegamiento*) (12, 13).

Una muestra de enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa que había estado almacenada en solución en 50% de glicerol y agua a -20°C por 5 años y había perdido toda su actividad catalítica, pudo recuperar el 100% de su actividad (13). Las técnicas de

replegamiento asistido abren una nueva perspectiva para las técnicas de modificación química de enzimas, ya que se pueden imaginar protocolos en los que se actúe sobre la proteína desnaturalizada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Mario L. Calcagno y al M. en B. Ismael Bustos por la revisión crítica de este artículo.

GMM y SLG han tenido sendas becas de CONACYT y Papiit. También han recibido recursos del programa PAEP. Se agradecen los apoyos del Papiit y Conacyt, proyectos DGAPA-UNAM IN220896, IN201297.

REFERENCIAS

- Moody P C y Wilkinson A J (1990) Protein Engineering. IRL PRESS, Oxford, pp 85.
- Souza J M, Plumbridge J A, Calcagno M L, (1997) N-Acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from Escherichia coli: Purification and molecular and kinetic characterization. Arch. Biochem. Biophys. 340:338-346.
- Eyzaguirre J. (1987) Chemical modification of enzymes: Active site studies. Ellis Horwood Limited, New York. pp 187.
- Ferreira F M, Mendoza-Hernández G, Calcagno M L, Delboniand F y Oliva G. (2000) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *N*-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia* coli. Acta Crystallographica 56:670-672.
- Oliva G, Fontes M R, Garratt R C, Altamirano M M, Calcagno M L y Horjales E (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. Structure 3:1323-1332.

- Altamirano M M y Calcagno M L (1993) Ingeniería de proteínas. En: Mensaje Bioquímico Vol XVII. Eds. Y. Saldaña de Delgadillo, S. Morales López, P. del Arenal Mena. Facultad de Medicina, UNAM pp 219-243.
- Altamirano M M, Blackburn J M, Aguayo C y Fersht A (2000) Directed evolution of new catalytic activity using the α/β-barrel scaffold. Nature 403:617-622.
- 8. Patten P A, Howard R J and Stemmer W P (1997) Aplications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. Current Opinion in Biotechnology 8:724-733.
- 9. Altamirano M M, Libreros-Minota A C, Lara-Lemus y Calcagno M L (1989) Evidence for vicinal thiols and their functional role in glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 269:555-561.
- Altamirano M M, Plumbridge A J y Calcagno L M (1992) Identification of two cysteine residues forming a pair of vicinal thiols in Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* and a study of their funtional role by site-directed mutagenesis. Biochemistry 31:1153-1158.
- Lara-González S, Dixon B F H, Mendoza-Hernández G, Altamirano M M y Calcagno M L (2000) On the role of the N-terminal group in the allosteric function of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia* coli. J. Mol. Biol. 301(1): 219-228.
- 12. Altamirano M M, Garcia C, Possani L D y Fersht A R (1999) Oxidative refolding chromatografy: folding of the scorpion toxin Cn5. Nature Biotechnology *17*: 187-191.
- 13. Altamirano M M, Golbik R, Zahn R, Buckle A y Fersht A (1997) Refolding chromatography with immobilized minichaperones. Proc. Natl. Acad. Sci. *94*: 3576-3578.
- Imoto I y Yamada H (1997) Chemical modification, Creighton TE (Ed), Protein function. A practical approach, Irl Press, New York pp 279-316.

LACTATO DESHIDROGENASAS ACOPLADAS A LAS CADENAS RESPIRATORIAS

Ricardo Jasso-Chávez^{1,2}, María Eugenia Torres Márquez¹ y Rafael Moreno Sánchez². Departamentos de Bioquímica, ¹-Facultad de Medicina, UNAM y ²-Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano No. 1, Delegación Tlalpan, C. P. 14080, México, D. F. Tel.: 5573-2911 Ext. 1422 Fax: 5573-0926. Correo electrónico: rjasso@hotmail.com

Recibido: 6 de junio de 2000. Aceptado: 19 de septiembre de 2000.

RESUMEN

Las enzimas más conocidas que oxidan al lactato son las lactato deshidrogenasas dependientes de los piridín nucleótidos. Sin embargo, en los organismos unicelulares se han encontrado enzimas que son independientes de los piridín nucleótidos (iLDH). En las bacterias las iLDH son membranales y funcionan como quinona reductasas, mientras que en las levaduras se encuentran en el espacio intermembranal de la mitocondria y funcionan como citocromo c reductasas. Las iLDH mitocondriales de Euglena gracilis comparten con las de las bacterias, la característica de reducir a las quinonas. En esta revisión se describen y se comparan las características cinéticas y estructurales de las iLDH reportadas para E. gracilis, bacterias y levaduras.

PALABRAS CLAVE: iLDH, Euglena gracilis, bacterias, levaduras, FMN, FAD.

ABSTRACT

The NAD-dependent lactate dehydrogenase are the best known enzymes that oxidize lactate. However, in unicellular organisms there have also been found pyridine nucleotide-independent forms of the enzyme (iLDH). iLDH are membrane-bound and quinone reductases in bacteria, whereas in yeast they are located within the intermembrane mitochondrial space and have as electron acceptor cytochrome c. In *E. gracilis* mitochondria, iLDH have been found, which reduce quinones. In this review, we describe and compare the kinetic and structural characteristics of the iLDH, the iLDH reported for *E. gracilis*, bacteria and yeast.

KEY WORDS: iLDH, *Euglena gracilis*, bacteria, yeast, FMN, FAD.

INTRODUCCIÓN

En eucariotes superiores la cadena respiratoria de la mitocondria puede oxidar diversos substratos como NADH + H⁺, glicerol-3-fosfato, succinato y ácidos grasos, por medio de las deshidrogenasas que son quinonas reductasas, siendo la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa las más abundantes.

En la cadena respiratoria de las bacterias existen deshidrogenasas cuya especificidad por los substratos es diferente a los que utilizan las mitocondrias de eucariotes superiores. Entre estos substratos están el formato, dihidroorotato, glicerol, mandelato, metanol, piruvato y L- y D-lactato (1). La actividad de dichas deshidrogenasas está asociada en la mayoría de los casos a la reducción de quinonas.

Lactato deshidrogenasas independientes de los piridín nucleótidos en los procariotes.

El lactato es también oxidado en una gran variedad de bacterias por una deshidrogenasa diferente a la que participa en la glucólisis; esta enzima no utiliza NAD+/NADH + H+ como coenzima, por lo que se conocen como lactato deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos (iLDH); éstas transforman al lactato en piruvato con la reducción de una flavina como cofactor, sin embargo, no hay estudios acerca de que la reacción opuesta ocurra *in vivo* o *in vitro* (2). Las iLDH pueden existir en forma soluble (3) o particulada (4) y en muchos casos el aceptor natural de los electrones se desconoce. Cuando son membranales, forman parte de la cadena respiratoria y pueden tener afinidad por los dos isómeros del lactato o ser esteroespecíficas.

La iLDH más estudiada es la D-iLDH de *Escherichia coli*. Esta enzima es constitutiva sin importar cuál fuente de carbono hay en el medio, mientras que

la L-iLDH se induce bajo condiciones aeróbicas en presencia de lactato (5); asimismo, se ha reportado el consumo de oxígeno acoplado a la oxidación de D-lactato, además de que el sitio activo de la D-iLDH se encuentra orientado hacia el citoplasma.

La D-iLDH de E. coli está asociada a la membrana y se ha utilizado para el estudio de las interacciones proteína-lípidos. La enzima purificada presenta una baja actividad en ausencia de detergentes y lípidos. Se ha reportado que la actividad enzimática se incrementa 5 veces en presencia de Tritón X-100 y 10 veces por los fosfolípidos de E. coli o por lisolecitina. La preincubación de la enzima con los lípidos de E.coli o la lisolecitina por 10 minutos a 37°C, incrementa la actividad y la K (6). En su estado nativo esta enzima se encuentra rodeada predominantemente por fosfatidilglicerol y fosfatidilserina, los cuales están presentes en baja concentración en la membrana plasmática de E. coli (7). Campbell y col. (8) clonaron el gen estructural de la D-iLDH de E. coli; el marco de lectura predijo que el polipéptido consistía de 571 aminoácidos (incluyendo el residuo de inicio, la metionina) con una masa relativa de 64,613 Da. La polaridad de la proteína (47%) es alta con respecto a algunas proteínas membranales. En la enzima hay una pequeña región de baja hidrofobicidad que contiene una repetición idéntica en la secuencia de los residuos de los aminoácidos SVIG (residuos 140-143 y 150-153), la cual es homóloga con la cadena H de la lactato deshidrogenasa de cerdo; esta secuencia se repite después de dos residuos de los cuales el segundo es una cisteína. De manera interesante, esta cisteína es esencial ya que su modificación puede impedir el cambio conformacional requerido para la catálisis. Mutaciones específicas en la D-iLDH con la incorporación del 5-fluorotriptofano indicaron que en la estructura secundaria el sitio posible de enlace de la flavina se encuentra en el carboxilo terminal de la enzima.

Las predicciones de estructura de la hechas a partir de los datos de resonancia magnética nuclear con ¹⁹F y de algunas deshidrogenasas citosólicas, han mostrado dos regiones en las iLDH comunes con las LDH citosólicas; una es el dominio de unión al substrato y la otra el dominio de unión al cofactor. En el caso de la D-iLDH de *E. coli*, el do-

minio de unión al cofactor es de 200 residuos de aminoácidos y se encuentra en el extremo del carboxilo terminal, mientras que en el extremo del amino terminal se encuentra el dominio de unión al substrato. Además, la D-iLDH parece tener una pequeña región necesaria para su fijación a la membrana y para acoplarse a los acarreadores de electrones lipofílicos, delimitada por los residuos de aminoácidos 226 al 384. Esta última región, no esta totalmente inmersa o anclada en la membrana, sugiriendo que la D-iLDH se fija a la membrana por fragmentos separados estructuralmente, como se muestra en la figura 1 (9).

Generalmente en *E. coli* como en otras bacterias, la solubilización de las iLDH se lleva a cabo con detergentes aniónicos, preferentemente el Tritón X-100. Con este detergente incluso se activan las iLDH de *E. coli* y de *Neisseria gonorrhoeae*. El pH óptimo para las iLDH varía desde 5.5 para la L-iLDH de *Lactobacillus casei*, hasta 8 y 9 en la L- y D-iLDH de *N. meningitidis* y *E.coli* (2).

Los alineamientos realizados entre las iLDH bacterianas muestran una gran similitud en la secuencia de los residuos de los aminoácidos de las D-iLDH y las L-iLDH, respectivamente. Las secuencias de las D-iLDH y de algunas mandelato deshidrogenasas que también son independientes de los piridín nucleótidos, muestran regiones homólogas entre sí. Asimismo, en las secuencias de al-

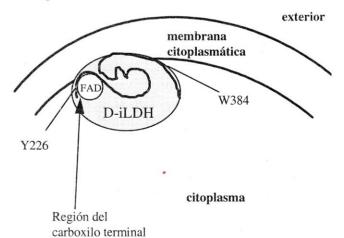


Figura 1. Modelo de la región asociada a la membrana de la D-iLDH de *E. coli*. La región necesaria para la fijación a la membrana (línea negra) y para acoplarse a los acarreadores de electrones lipofílicos, está delimitada por los residuos de aminoácidos 226 al 384. Esta región no está totalmente inmersa o anclada en la membrana (Modificado de 9).

gunas L-iLDH bacterianas se aprecia una secuencia (SNHGGRQ) muy conservada entre las α-hidroxiácido deshidrogenasas y las oxidasas que contienen mononucleótidos de flavina como la L-lactato oxidasa de *Streptococcus iniae* y de *Aerococcus viridans*.

Con respecto a la especificidad de las iLDH bacterianas, éstas pueden oxidar exclusivamente a su substrato como la L-iLDH de *Rhodopseudomonas sphaeroides* y la D-iLDH de *Megasphaera elsdenii*, o pueden oxidar al enantiómero opuesto además de otros substratos, como el α-DL-hidroxibutirato y la D-treonina para la D-iLDH de *E. coli*; y la L-treonina, la fenilalanina, el L-β-fenil lactato y el 4-hidroxifenil lactato para la L-iLDH de *Neisseria gonorrhoeae*, sin embargo, tienen muy poca afinidad y una velocidad de oxidación menor al 10 % en comparación con su verdadero substrato.

Los parámetros cinéticos de las iLDH bacterianas son variables entre especies. La Tabla I muestra que la afinidad por L- o D-lactato (K_m) es similar ya que se encuentra en concentraciones milimolares, mientras que la velocidad máxima es diferente, siendo mayor para las D-iLDH. El efecto de algunos inhibidores es distinto en cuanto al tipo de inhibición y K_n .

Las iLDH en eucariotes.

Las iLDH de los eucariotes, específicamente en levaduras, son significativamente distintas a las encontradas en las bacterias. En las levaduras éstas se localizan en el espacio intermembranal de la mitocondria. Las iLDH de Saccharomyces cerevisiae y Hansenula anomala son flavocitocromos b y fisiológicamente tienen la actividad de L-iLDH que transfiere los electrones directamente al citocromo c. Estructuralmente son tetrámeros idénticos, cada uno de los monómeros contiene dos dominios diferentes. El dominio del citocromo b, está en el extremo del amino terminal y se relaciona con el citocromo b_s de los mamíferos, mientras que el dominio que contiene al FMN y a la actividad de la deshidrogenasa se encuentran en el extremo carboxilo terminal.

Todas estas enzimas son de masa molecular muy semejante y las secuencias del amino terminal, que es donde se encuentra el dominio del citocromo ba, indican que son homólogas; el dominio del carboxilo terminal que contiene el FMN (con protoporfirina IX). pertenece a la familia de las L-2-hidroxiácido deshidrogenasas las cuales presentan un mecanismo catalítico muy similar para la oxidación del substrato, aunque varían considerablemente en la selectividad del mismo. Este tipo de enzimas se han encontrado en las plantas, los animales y las bacterias; como la glicolato oxidasa peroxisomal de las plantas, la L-mandelato deshidrogenasa de Pseudomonas putida y de Rhodotorula graminis y la lactato mono-oxigenasa de Mycobacterium smegmatis (10); las cuales tienen substratos que difieren en el tamaño, la naturaleza química y su participación metabólica. Los alineamientos de algunas L-iLDH y otras enzimas también independientes de los piridín nucleótidos de diversos organismos, forman parte de una superfamilia de flavoproteínas con la actividad de 2-hidroxiácido deshidrogenasa y oxidasa.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta una D-iLDH mitocondrial unida a la membrana. La D-iLDH consta de un solo polipéptido y no presenta ninguna homología con la L- iLDH presente en el mismo organismo (11). El alineamiento de secuencias de la iLDH entre las bacterias y las levaduras no mostró regiones de similitud. Del mismo modo, al intentar alinear secuencias entre las L- y las D-iLDH, tampoco se encontraron similitudes. Se ha sugerido que existe una familia de 2-hidroxiácido deshidrogenasas específicas para el isómero D (12).

En la Tabla II se presentan algunas características de las enzimas bacterianas y de las levaduras. Se incluyen algunas L- y D-mandelato deshidrogenasas cuya relación estructural y propiedades de purificación con las iLDH son muy similares (10). El mandelato, que es una molécula de lactato modificada, es oxidado por la mandelato deshidrogenasa a fenilglioxilato que, por medio de la vía de la 3-oxoadipato y con la salida de succinato, termina en la síntesis de acetil-CoA.

La iLDH en Euglena gracilis.

Se ha reportado en el protista *E. gracilis* una actividad de D-iLDH, que se encuentra en la fracción particulada de la mitocondria, es dependiente de zinc e independiente de los piridín nucleótidos. El L-lac-

TABLA I

	PAR	ÁMETROS	CINÉTICOS DE A	ALGUNAS ILI	DH BACT	ERIANAS	
Organismo	Enzima	P.M. ^a (KDa)	Aceptor de e	K _m ^c para lactato (mM)	$\mathbf{V}_{\mathrm{m}}^{\mathrm{d}}$	Inhibidor ^b	K _i (mM)
Escherichia coli.¹	D-iLDH (FAD)	74	DCPIP o MTT- PMS	1.4 -2.2		Oxamato (C) Oxalato (C)	0.0033 0.0009
Acinetobacter calcoaceticus ²	D-iLDH (FAD)	62.8	DCPIP-PMS	0.264		Oxalato (C) Reactivos de grupos -SH	
Neisseria meningitidis ³	D-iLDH	70	MTT-PMS	5.1	0.5	Oxamato Piruvato	
N. meningitidis	L-iLDH	-	MTT-PMS	14	0.06		
Megasphaera elsdenii ⁴	D-iLDH (FAD)	55			-	Oxalato D-lactato	
Rhodopseudo- monas sphaeroides ⁵	L-iLDH	107	DCPIP-PMS	0.5		Oxamato (NC) Oxalato (NC) D-lactato. (C)	0.96 0.03 22
Neisseria gonorrhoeae ⁶	D-iLDH	-	MTT-PMS	0.2			a
Paracoccus denitrificans ⁷	D-iLDH	54	DCPIP-PMS	0.81		Tenoiltrifluo-roacetona (NC)	2.2
Selenomonas ruminantium ⁸	D-iLDH		DCPIP	0.5	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
Clostridium cetobutylicum ⁹	D-iLDH	55	DCPIP o MTT	3.5	13 ^d		PT 1
. acetobutylicum ⁹	L-iLDH	55	DCPIP o MTT	0.7	0.3^{d}	-	F

Determinado por SDS-PAGE, ^bC inhibidor competitivo, NC inhibidor no competitivo, ^cLos valores fueron obtenidos de extractos crudos, ^dµmoles de metasulfato de tetrazolio (MTT), metasulfato de fenazina (PMS) o diclorofenolindofenol (DCPIP) reducido min⁻¹ mg proteína⁻¹. ¹(4); ²Allison N, O Donnell M J, Hoey M E y Fewson C A (1985) Biochem. J 227:753-757; ³Erwin A L y Gotschlich E C (1993) J Bacteriol *175*:6382-6391; ⁴Olson S T y Massey V (1979) Biochemistry *18*:4714-4724; ⁵Markwell J P y Lascelles J (1978) J Bacteriol *133*:593-600; ⁶Fischer R S, Martin G C, Rao P y Jensen R A (1994) FEMS Microbiol *115*:39-44; ⁷Zboril P y Wernerová V (1996) Biochem and Mol Biol Int *39*:595-605; ⁸Gilmour M, Harry J F, Wilfrid J M (1994) Microbiol *140*:2077-2084; ⁹(3).

tato también se oxida pero a velocidades más bajas (13). La oxidación del lactato se encontró acoplada a la fosforilación oxidativa, los electrones de la oxidación del D- y L-lactato entran a la cadena respiratoria de la mitocondria de *Euglena* al nivel de la ubiquinona. Además, la oxidación del L- y D-lactato presenta entre 50 y 90 % de resistencia a la antimicina, por lo que se propuso que una fracción de la oxidación del lactato procede a través de una cadena transportadora de electrones alterna e independiente al citocromo bc₁ (14).

En este protista se ha determinado cinéticamente que la oxidación del lactato se lleva a cabo por dos enzimas estereoespecíficas y, a diferencia de todos los organismos reportados que presentan a la iLDH, las dos se expresan cuando las células se cultivan en medios sin glucosa o lactato. El sitio activo de la L-iLDH está orientado hacia la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Además, ambas enzimas son resistentes a altas temperaturas cuando se encuentran en mitocondrias intactas, siendo la D-iLDH la más resistente. El pH óptimo de las iLDH de *E. gracilis* se encuentra entre 7.3-7.6 (15).

Se han utilizado varios aceptores artificiales de electrones para llevar a cabo estudios cinéticos de estas enzimas. El aceptor artificial más utilizado ha sido el diclorofenolindofenol (DCPIP) debido a su alto potencial redox. Al igual que la D-iLDH de *E. coli*, las iLDH de *E. gracilis* también pueden ceder los electrones a las quinonas (Fig. 2), lo que hace suponer que las iLDH de estos organismos tuvieron un origen común, ya que *E. gracilis* es de los eucariotes más primitivos con mitocondrias (16).

Los inhibidores clásicos de las lactato deshidrogenasas dependientes de NAD+/NADH + H+, como el oxamato y oxalato, también inhiben a las iLDH (Tablas I y III). En cuanto al mecanismo cinético de reacción, se ha reportado para *S. cerevisiae* un modelo que involucra dos estados distintos de la enzima durante la reacción (Fig. 3A). De forma similar, nosotros hemos identificado que el mecanismo de reacción para las isoenzimas mitocondriales de *E. graciiis*, es de tipo ping-pong (Fig. 3B).

Cofactores de las iLDH

Los cofactores de las iLDH son flavinas unidas o no de forma covalente. Sin importar el organismo en

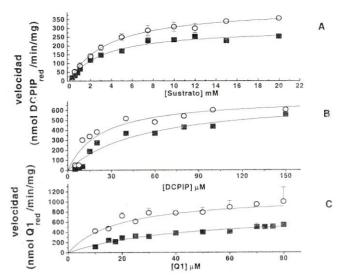


Figura 2. Cinética de la oxidación de L- y D-lactato en las mitocondrias de *Euglena. gracilis*. A, oxidación de L- y D-lactato. B, oxidación del lactato con DCPIP como aceptor de los electrones. C, oxidación del lactato con Q1 (quinona artificial con un solo grupo isoprenoide en la posición 5 del anillo) como aceptor de electrones. (■) L-lactato, (○) D-lactato (Tomado de 15).

estudio para todas las L-iLDH el cofactor es siempre FMN, mientras que para las D-iLDH el cofactor es siempre FAD. Esta diferencia entre los grupos prostéticos y en los alineamientos de las secuencias entre las L- y D-iLDH hacen suponer que son familias totalmente distintas. Sin embargo las L- y D-iLDH son muy parecidas con otras deshidrogenasas enantiémero-específicas (Tabla II).

Lactato deshidrogenasas asociadas a las membranas celulares en los mamíferos.

No se ha descrito la existencia de la lactato deshidrogenasa en las mitocondrias de los mamíferos. Se ha supuesto que las actividades de la lactato deshidrogenasa que se han encontrado en las preparaciones mitocondriales, eran contaminaciones por enzimas del citosol, ya que éstas no eran preparaciones puras. Sin embargo, recientemente se reportó una actividad de lactato deshidrogenasa dependiente de NAD+/NADH + H+ acoplada a un consumo de oxígeno, sensible a oxamato y N-etilmaleimida, lo que sugiere que el lactato se internaliza a la mitocondria para ser oxidado. Isoformas de estas enzimas se han identificado en el corazón, hígado y músculo (17).

Importancia de las iLDH en microorganismos patógenos.

Las iLDH son muy importantes en el metabolismo

A

Figura 3. A, representación lineal del ciclo catalítico del flavocitocromo b2 de *S. cerevisiae*. Los estados redox del citocromo c (cit c), el hemo (H) y la flavina (F) del flavocitocromo b₂ están indicados por los suscritos "ox" y "red" para sus formas oxidadas y reducidas respectivamente. (Modificado de 22); **B.** Esquema del mecanismo de reacción propuesto para la L-iLDH y la D-iLDH mitocondriales de *E. gracilis* (Tomado de 15).

energético de las bacterias así como de algunas levaduras y protistas. Su importancia radica principalmente en que pueden utilizar ambos isómeros del lactato durante su crecimiento y desarrollo en condiciones aeróbicas.

Algunas bacterias patógenas como *Neisseria* gonorrhoeae expresan la L- y la D-iLDH. La L-iLDH participa en el metabolismo de los amino-ácidos aromáticos de la bacteria, ya que puede convertir al fenil-lactato a fenilalanina y al 4-hidroxifenil-lactato a tirosina. Se ha asociado a esta enzima en el mecanismo de patogénesis, en donde el lactato del hospedero es oxidado por el gonococo, con el consecuente aumento en el consumo de oxígeno y transporte electrónico; de forma similar a lo que se ha sugerido para el 4-hidroxi-fenil-lactato, un metabolito disponible en el hospedero humano (18).

Neisseria meningitidis posee también a las L- y D-iLDH. El L-lactato es producido por las células del mamífero, mientras que el D-lactato puede ser detectado en la sangre humana, tal vez absorbido del intestino, aunque su concentración es sólo el 5% de la del L-lactato. El D-lactato puede ser producido en la oxidación de la glucosa por algunas bacterias lácticas, o bien por E. coli, la cual habita en la superficie de la

mucosa intestinal, que es el sitio donde también coloniza *Neisseria* (19)

En Haemophilus influenza se ha demostrado la existencia de una D-iLDH asociada a membrana. Su importancia estriba en que esta enzima puede utilizar al D-lactato que se encuentra en pequeñas cantidades en el hospedero (20). La incubación de H. influenzae en lactato incrementa su resistencia contra el suero humano. El mecanismo de este fenómeno no se conoce pero aparentemente está relacionado a la expresión de lipopolisacáridos.

CONCLUSIÓN

Los microorganismos presentan una diferencia importante en la variedad de sustratos oxidables que pueden utilizar para sintetizar ATP con respecto a organismos superiores. La presencia de las lactato deshidrogenasas acoplådas a la cadena transportadora de los electrones, puede representar una ventaja para el metabolismo de estos organismos. En sistemas bacterianos los electrones de la oxidación del lactato, que es producto de la glucólisis anaerobia, entran directamente a la cadena respiratoria que promueve la generación de un gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP y para el transporte de azúcares y aminoácidos. En el caso de algunos protis-

TABLA II

TIPOS DE LACTATO DESHIDROGENASA Y SU RELACIÓN CON ALGUNAS MANDELATO DESHIDROGENASAS (MDH) Y OTRAS 2-HIDROXIÁCIDO DESHIDROGENASAS INDEPENDIENTES DE LOS PIRIDÍN NUCLEÓTIDOS

ORGANISMO	ENZIMA	LOCALIZACIÓN
Dep	endientes de FMN, Mr≅44000. Procariot	es
Pseudomonas putida a	L-MDH	Membranal
Acinetobacter calcoaceticus ^b	L-MDH	Membranal
A. calcoaceticus c	L-LDH	Membranal
Escherichia coli d	L-LDH	Membranal
Dependiente	s de FMN (flavocitocromos), $Mr \cong 59000$.	Eucariotes
Espinaca e	Glicolato oxidasa	Peroxisoma
•		(soluble)
Mycobacterium smegmatis f	L-Lactato monooxigenasa	Soluble?
Sacharomyces cerevisiae ^g	L-LDH	Mitocondria
and the design of the control of th		(soluble)
Rhodotorula graminis a, f	L-MDH	Mitocondria
		(soluble)
Hansenula anomala a	L-LDH	Mitocondria
		(soluble)
Dep	endientes de FAD, Mr≅60000. Procariot	
A. calcoaceticus b	D-LDH	Membranal
A. calcoaceticus b	D-MDH	Membranal
E. coli h	D-LDH	Membranal
Paracoccus denitrificans i	D-LDH	Membranal
Megasphaera elsdenii ^j	D-LDH	Membranal
	dientes de FAD (flavocitocromos), Mr ≅ 64	
Sacharomyces cerevisiae k	D-LDH	Membranal

^a (10); ^b Allison N, O'Donnell M J, Hoey M E y Fewson C A (1985) Biochem. J 227:753-757; ^c (10); ^d (5); ^e Volokita M y Somerville C R (1987) J Biol Chem 262:15825-15828; ^f Illias R M, Sinclair R, Robertson D, Neu A, Chapman S K y Reid G A (1998) Biochem J 333:107-115; ^a Daum G, Böhni P C y Schatz G (1982) J Biol Chem 257:13028-13033; (10); ^b Futai M (1973) Biochemistry 12:2468-2474; (2); ^a Zboril P y Wernerová A (1996) Biochem and Mol Biol Int 39:595-605; ^a Olson S T y Massey V (1979) Biochemistry 18:4714-4724; ^b (11)

tas como *Euglena* y *Leishmania*, el gradiente de protones puede ser utilizado para la producción de ATP. Este hecho puede ser de suma importancia ya que estos organismos presentan deficiencias en el ciclo de Krebs, lo que podría tener consecuencias en la producción de ATP.

Las iLDH bacterianas y de la mitocondria de *Euglena* son membranales, acopladas a la cadena respiratoria y ceden los electrones de la oxidación del lactato a las quinonas. Estas semejanzas hacen pensar que estas enzimas pueden presentar un origen común. Además, *Euglena* que es de los organismos más primitivos con mitocondrias, es el único eucariote que posee iLDH con las mismas características que las de bacterias, hecho que apoya la teoría de la temprana adquisición de mitocondrias por *Euglena*. Las diferencias entre las iLDH encontradas en

los procariotes y las levaduras pueden deberse a un proceso evolutivo, el cual haría mas eficiente la utilización del lactato sin que sus electrones tengan que pasar por la poza de quinonas sino directamente al citocromo c.

Sin importar la forma en que se encuentren las iLDH, solubles, membranales o que se localicen en el espacio intermembranal de la mitocondria, por ser de las primeras deshidrogenasas en la cadena respiratoria son esenciales para los microorganismos que las poseen, ya sea para la producción de ATP, para el transporte de los metabolitos esenciales o para poder colonizar e invadir a un organismo hospedero. Las iLDH tienen una participación esencial en el metabolismo, por lo que es de relevancia conocer más acerca de estas enzimas y las vías metabólicas en las que están involucradas.

TABLA III

	PARÁM	ETROS CINÉ	TICOS DE LAS	LDH DE ALGUNOS	EUCARIC	TES	
ORGANISMO	ENZIMA	P.M. (KDa)	ACEPTOR DE	K _m PARA LACTATO (mM)	V _m	INHIBIDORES	K _i (mM)
Saccharomyces	L-iLDH	240	ferricianuro	0.49	0.27	Sulfito (C) D-lactato (C)	0.0014 1.4
cerevisiae ^a	flavocitocromo	tetrámero	citocromo c	0.29	0.155	Piruvato (C,NC) Oxalato (M)*	3.3 0.3
S. cerevisiae ^b	D-iLDH flavocitocromo	64 monómero	ferricianuro citocromo c				_
						Oxamato (C)	0.84
Euglena gracilis ^c	L-iLDH		DCPIP- PMS	2.6	0.28	Oxalato (M)*	0.25
E. gracilis ^c	D-iLDH		DCPIP-PMS	2.8	0.42	Oxamato (C) Oxalato (M)*	0.54 0.14

Las observaciones son las mismas que las de la Tabla I.* (M) inhibidor tipo mixto; "Gondry M y Lederer F (1996) Biochemistry 35:8587-8594; b(11); c(15).

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo fue apoyada por los donativos de CONACyT 25274M y 25465N.

REFERENCIAS

- Ingledew W J y Poole R K (1984) The respiratory chains of Escherichia coli. Microbiol Rev 48:222-271.
- Garvie E I (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiol Rev 44:106-139.
- 3. Diez-Gonzalez F, Rusell J B y Hunter J B (1997) NAD-independent lactate and butyryl-CoA dehydrogenases of *Clostridium acetobutylicum* P262. Curr Microbiol *34*:162-166.
- Kohn L D y Kaback H R (1973) Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. J Biol Chem 248:7012-7017.
- 5. Haugaard N (1959). D- and L-Lactic acid oxidases of *E. coli*. Biochim Biophys Acta *31*:66-72.
- 6. Fung L W-M, Pratt E A y Ho C (1979) Biochemical and biophysical studies on the interaction of a membrane-bound enzyme, D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* with phospholipids. Biochemistry *18*:317-324.

- 7. Kovatchev S, Vaz Winchill L C y Eibl H (1981) Lipid dependence of the membrane-bound D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. J Biol Chem 256: 10369-10374.
- 8. Campbell H D, Rogers B L y Young I G (1984) Nucleotide sequence of the respiratory D-Lactate dehydrogenase gene of *Escherichia coli*. Eur J Biochem 144:367-373.
- Sun Z-Y, Truong H-T N, Pratt E A, Sutherland D C, Kulig C E, Homer R J, Groetsch S F, Hsue P Y y Ho C (1993) A ¹⁹F-NMR study of the membrane-binding region of D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Prot Sci 2:1938-1947.
- Fewson C A, Baker D P, Chalmers R M, Keen J N, Hamilton I D, Scott A J y Yasin M (1993) Relationship amongst some bacterial and yeast lactate and mandelate dehydrogenases. J Gen Microbiol 139:1345-1352.
- 11. Lodi T y Ferrero Y (1993) Isolation of the DLD gene *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. Mol Gen Genet 238:315-324.
- 12. Taguchi H y Ohta T (1991) D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. J Biol Chem 266:12588-12594.

- Price C A (1961) A zinc-dependent lactate dehydrogenase in Euglena gracilis. Biochem J 82:61-66.
- 14. Moreno-Sánchez R, Covián R, Jasso-Chávez R, Rodríguez S, Pacheco F y Torres-Márquez M E (2000) Oxidative phosphorylation supported by alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. Biochim Biophys Acta *1457*:200-210.
- Jasso Chávez R (2000) Caracterización cinética y Termodinámica de la L- y D-Lactato deshidrogenasas mitocondriales de *Euglena gracilis*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. pp 40-69.
- Linton E W, Hittner D, Auld T, y Triemer R E (1999) A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. J Eukariot Microbiol 46:217-223.
- 17. Brooks G A, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello J P y Butz C E (1999) Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. Proc Natl Acad Sci USA 96:1129-34.

- 18. Bhatnagar R K, Hendry A T, Shanmugan K T y Jensen R A (1989) The broad-specifity, membrane-bound lactate dehydrogenase of *Neisseria gonorrhoeae*: ties to aromatic metabolism. J Gen Microbiol *135*:353-360.
- 19. Erwin A L y Gotschlich E C (1996) Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-Lactate dehydrogenase (L-LDH): Evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. J Bacteriol *178*:4807-4813.
- 20. Denicola-Seaone A y Anderson B M (1990) Purification and characterization of *Haemophilus influenza* D-lactate dehydrogenase. J Biol Chem 265:3691-3696.
- 21. Sharp R E, Chapman S K y Reid GA (1996) Modulation of flavocytochrome b2 intraprotein electron transfer via an interdomain hinge region. Biochem J *316*:507-513.

EL EOSINÓFILO: CÉLULA EFECTORA EN ENFERMEDADES PARASITARIAS

Roxana Porcel Aranibar e Ingeborg Becker Fauser. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado postal 70-641. C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico: ropowa@yahoo.com

Recibido: 30 de junio de 1999. Aceptado: 22 de agosto de 2000.

RESUMEN

Los eosinófilos son conocidos por su participación en una amplia gama de enfermedades, incluyendo reacciones alérgicas e infecciones parasitarias. La asociación entre hipereosinofilia y las infecciones helmínticas ha sido demostrada en varios modelos animales. Mas recientemente, se ha demostrado que citocinas tales como IL-3, GM-CSF e IL-5 ejercen un papel estimulante de la eosinofilopoyesis. A pesar de la fuerte evidencia *in vitro* e *in vivo* de que los eosinófilos son células efectoras importantes en la defensa del hospedero contra helmintos, se conoce muy poco acerca de su actividad efectora potencial contra protozoarios patógenos.

PALABRAS CLAVE: Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), gránulos citotóxicos, parasitosis, eosinofilia.

ABSTRACT

Eosinophils are known to participate in a wide array of disease processes, including allergic reactions and parasitic infections. The association between hypereosinophilia and helminthic infections has been demonstrated in a number of animal models. More recently, cytokines such IL-3, GM-CSF and IL-5 have been shown to stimulate eosinophilopoiesis. Despite strong *in vitro* and *in vivo* evidence that eosinophils are important effector cells in host defense against helminths, very little is known about the eosinophils potential effector activity against protozoal pathogens.

KEY WORDS: Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity (ADCC), cytotoxic granules, parasitosis, eosinophilia.

ABREVIATURAS: IL, interleucinas; TNF-alfa, factor de necrosis tumoral-alfa; GM-CSF,

factor estimulador de colonias de granulocitosmacrófagos; VLA-4, molécula de activación muy tardía; LFA-1, antígeno asociado a la función de linfocitos; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular; PAF, factor activador de plaquetas; INFgama, interferón-gama; Ig, inmunoglobulinas; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; MIP-1a, proteína inflamatoria de macrófagos; RANTES, regulador de la actividad normal de la expresión y secreción de células T.

INTRODUCCIÓN

Los eosinófilos son células sanguíneas pertenecientes a la familia de los leucocitos polimorfonucleares y se caracterizan por contener gránulos citoplasmáticos con gran avidez a tinciones ácidas como la eosina. Provienen de la médula ósea y migran a la sangre en un período de pocas horas donde se encuentran normalmente en una cantidad de 1 a 3% del total de leucocitos (correspondiente a 350 cel/mm³).

La eosinofilia se caracteriza por un aumento en la producción de eosinófilos en la médula ósea y la acumulación de estos en sangre y tejidos. Se asocia generalmente a procesos inflamatorios, reacciones alérgicas, desórdenes atópicos, asma bronquial, neoplasias y especialmente a infecciones parasitarias por helmintos.

Arbitrariamente, la eosinofilia se clasifica como:

*Leve: 351 a 1500 cel/mm³

*Moderada: >1500 a 5000 cel /mm³

*Grave: $> 5000 \text{ cel /mm}^3 (1)$

Los eosinófilos contribuyen en la respuesta inmune celular de manera eficaz por su amplio rango de actividades biológicas, tanto como célula efectora así como secretora de citocinas inmunoreguladoras. Sin embargo, la función precisa de los eosinófilos frente a parásitos protozoarios intracelulares aún no está clara. Al igual que los neutrófilos, los eosinófilos tienen una función efectora, pero a diferencia de estos poseen mayor longevidad y pueden sobrevivir por semanas en los tejidos. Además, por sus múltiples capacidades biológicas, se convierten en células con mayor diversidad funcional (2, 3).

EOSINOFILOPOYESIS

Los eosinófilos se producen en la médula ósea a partir de una célula pluripotencial. Más tarde se diferencian en precursores intermedios con características tanto de basófilos como de eosinófilos y luego se diferencian en linajes separados con características específicas. Su proliferación y diferenciación están regulados principalmente por tres citocinas: el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la interleucina-3 (IL-3) y la interleucina-5 (IL-5). De estas tres citocinas la IL-5, también conocida como factor estimulador de eosinófilos, es la más específica para su diferenciación, incrementa la adhesión hacia células endoteliales, induce un aumento en la degranulación de sus proteínas e incrementa la sobrevida de eosinófilos in vitro (4, 5). La función de la IL-5 ha sido bien estudiada y demostrada en ratones transgénicos para el gen de IL-5, encontrándose que la sobreproducción de IL-5 conlleva a la eosinofilia y una deleción del gen para IL-5 lleva a una disminución en la producción de eosinófilos (6). En pacientes con enfermedades parasitarias o en condiciones alérgicas, la sobreproducción de IL-5 está regulada por linfocitos T CD4 del subtipo TH2. La migración de los eosinófilos a los sitios de reclutamiento posiblemente se media por un reconocimiento de receptores para IL-2 de la subunidad CD25 de los eosinófilos (5) (Fig. 1)

MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD BIOLÓGI-CA DE LOS EOSINÓFILOS

Los eosinófilos miden 9 micras de diámetro, son de tamaño similar a los neutrófilos, pero se distinguen por sus gránulos citoplasmáticos, que tienen gran avidez por tinciones ácidas como la eosina. Estudios cristalográficos de la región densa y de la matriz de los gránulos eosinofílicos muestran la

EOSINOFILOPOYESIS

Médula ósea: Célula madre pluripotencial Célula progenitora mieloide IL-3, GM-CSF IL-5 Estimulan la proliferación y diferenciación de cosinófilos Eosinófilos

Figura 1. La maduración del eosinófilo esta regulada por diferentes citocinas, siendo la IL-5 la más específica para su diferenciación.

presencia de cuatro proteínas citotóxicas biológicamente activas:

- a) Proteína básica mayor (MBP)
- b) Proteína catíonica eosinofílica (ECP)
- c) Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN)
- d) Peroxidasa eosinofílica (EPO)

La región densa o "core" del gránulo está compuesta básicamente por la MBP, y la matriz del gránulo por las proteínas: ECP, EPO y por EDN. La MBP es una de las más importantes y la que se encuentra en mayor abundancia. Es una proteína rica en arginina, con un peso molecular de 14 kDa. La MBP tiene acción helmintotóxica y activa la vía clásica del complemento, provocando la degranulación de plaquetas, basófilos y mastocitos. La ECP es un polipéptido marcadamente catiónico con un peso molecular de 18 a 21 kDa, con actividad helmintotóxica y bactericida. Su toxicidad hacia células del hospedero es similar a la de la MBP, quizá debido a procesos coloido-osmóticos. Además de ser una proteína neurotóxica, se le atribuye la función de ser una proteína inhibitoria de la proliferación de linfocitos T. La ECP altera la fibrinolisis a partir de la preactivación del plasminógeno, acortando los tiempos de coagulación por mecanismos dependientes del factor XII. Esto podría explicar la predisposición a tromboembolismos asociados al síndrome de hipereosinofilia. La EDN es una proteína de aproximadamente 18 kDa. La propiedad biológica más importante que se le atribuye es la de provocar una disfunción cerebral y cerebelar en conejos y cerdos a lo que se conoce como "fenómeno de Gordon". En concentraciones pequeñas puede causar efectos inhibitorios no citotóxicos en la producción de linfocitos T, al igual que la ECP. La EPO es una enzima diferente a la mieloperoxidasa de los neutrófilos y de monocitos. Está constituida por dos cadenas, la ligera con un peso de 15 kDa y la pesada con un peso de 52-55 kDa. Su combinación con el peróxido de hidrógeno e iones haluros forman un potente sistema tóxico contra bacterias, helmintos, células tumorales y contra las propias células del hospedero (7, 8).

Además, los eosinófilos están formados por gránulos de menor tamaño que contienen arilsulfatasas. Se han identificado también gránulos de baja densidad a los que se denominan como microgránulos y cuerpos lipídicos con inclusiones ricas en lípidos. La función de estos cuerpos lipídicos no se ha establecido bien, pero parece ser que actúan en el almacenamiento y metabolismo del ácido araquidónico (9) (Tabla I).

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIO-CINAS

Los eosinófilos son predominantemente células proinflamatorias capaces de sintetizar y elaborar una variedad de citocinas y quimiocinas como TNF-alfa y beta 1, GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-2 biológicamente activa e IL-8 cuando son estimulados *in vitro* con IL-4 y GM-CSF.

Se sabe también que los eosinófilos pueden sintetizar y aumentar varios mediadores lipídicos incluyendo prostaglandinas, leucotrieno C4 y B4, factor activador de plaquetas, y péptidos mediadores como la sustancia P (2, 4).

TABLAI

_	PROTEÍNAS TÓ	ÓXICAS Y MEDIADORES INFL	AMATORIOS SECRETADOS POR EOSINÓFILOS
	PROTEÍNAS TÓXICAS		FUNCIÓN
	*Proteína básica mayor	14 kDa	Actividad helmintotóxica, activa la vía clásica del complemento; provoca degranulación de plaquetas, basófilos y mastocitos.
	*Proteína catiónica eosinofíli	ica. 18-21 kDa	Helmintotóxica y bactericida. Inhibe la proliferación de linfocitos T.
	*Neurotoxina derivada de eosinófilos	18 kDa	Neurotóxica.
	Enzimas		
	* Peroxidasa eosinofílica	cadena ligera 15 kDa y cadena pesada 52-55 kDa.	Helmintotóxica, bactericida, daña células tumorales.
	Citocinas		
	*IL-3, IL-5, GM-CSF		Amplifica la producción de eosinófilos a nivel de médula ósea, activación de eosinófilos.
	Quimiocinas		
	* IL-8		Quimiotaxis de leucocitos
	Mediadores lipídicos		
	*Leucotrienio C4 y B4 *PAF		Incrementa la permeabilidad vascular. Quimiotaxis de leucocitos.

ADHESIÓN Y MIGRACIÓN

La migración de los eosinófilos de la circulación a los tejidos se debe principalmente a la P-selectina, a diferencia del neutrófilo que es por la E-selectina. Se adhieren firmemente al endotelio vascular por dos integrinas, la VLA-4 y por LFA-1. El LFA-1(CD11a/ CD18) interacciona con moléculas de adhesión intercelulares como ICAM-1, mientras que VLA-4 (CD29/CD49d) interacciona con moléculas de adhesión vasculares como VCAM-1. Inmediatamente después, los eosinófilos migran hacia los tejidos por la acción de moléculas quimioatractantes como C5a, MIP-1α v RANTES, incluyendo derivados del ácido araquidónico como el leucotrieno B4, PAF, interleucinas (siendo la más específica la IL-6), y otras dos quimiocinas descritas recientemente como relativamente específicas para eosinófilos: la eotaxina-1 v eotaxina-2.

Estudios morfológicos, biológicos y funcionales de los eosinófilos muestran que estos se localizan y acumulan en sitios específicos de reacción inflamatoria; además, estos eosinófilos son morfológica y funcionalmente distintos a eosinófilos en estado basal. Los eosinófilos activados se caracterizan por un aumento en el tamaño y en el número de sus gránulos citotóxicos, favoreciendo su actividad helmintotóxica a diferencia de eosinófilos no activados (5).

RECEPTORES Y PROTEÍNAS DE SUPER-FICIE

Los eosinófilos expresan receptores de superficie para las diferentes fracciones de IgG, IgE e IgA. El receptor Fc-gama RII (CD32) de los eosinófilos reconoce la fracción Fc-gama de esta inmunoglobulina el cual es expresado constitutivamente. En cambio para la IgA, el receptor está dirigido contra los dominios constantes de esta molécula. Asimismo, se han identificado tres tipos de receptores para la IgE, los que fueron clasificados como receptores:

- a) de alta afinidad: Fc-épsilon RI,
- b) de baja afinidad: Fc-épsilon RII/CD23 y
- c) receptor mac-2épsilonBP

Además, se han identificado receptores para las fracciones C1q, C3b/C4b (CR1), C3bi (CR3) del

complemento, así como receptores para IL-3, IL-5, GM-CSF. También se han encontrado receptores para dos mediadores lipídicos: PAF y leucotrieno B4, ambos son quimioatractantes de eosinófilos estimulando la degranulación y la formación de metabolitos de oxígeno como el anión superóxido; sin embargo, aún no se conoce ni su localización subcelular ni su estructura. Adicionalmente, los eosinófilos expresan proteínas de adhesión involucradas en la interacción de célula con célula, como las integrinas: LFA-1 (CD11a/CD18), VLA-4 y receptores de superfi-

TABLA II

RECEPTORES DE SUPERFICIE Y MOLÉCULAS DE

RECEPTOR	FUNCIÓN
Fc-gama RII/CD32	Receptor para IgG; papel en la fagocitosis y ADCC.
Fc-Épsilon RI	Receptor de alta afinidad para IgE; función en la fagocitosis y ADCC.
Fc-Épsilon RII/CD23	Receptor de baja afinidad para IgE; función desconocida.
Fc-Alfa	Receptor para la fracción Fc de la IgA; citotoxicidad dependiente de IgA.
Mac-2ÉpsilonBP	Función desconocida.
IL-3R (CD123), IL-5R (CD125), GM-CSF Rα	Estimulan la proliferación y la di- ferenciación de eosinófilos.
C1q, C3b/C4b (CR1), C3bi (CR3)	Estimulan la fagocitosis.
CCR1 y CCR3	Receptor para eotaxina, MIP-10 y RANTES, induce activación y quimiotaxis de eosinófilos.
Singlec-8	Receptor transmembranal de eosinófilos.
MOLÉCULAS DE ADHE	ESIÓN
LFA-1 (CD11a/CD18)	Se une a ICAM-1.
VI A 4 (CD20/CD404)	C WCAM 1

Se une a VCAM-1.

VLA-4 (CD29/CD49d)

cie para eotaxina 1 y 2, MIP-1a y RANTES perteneciente a la familia de receptores de quimiocinas CCR1 y CCR3.

Recientemente se ha reportado la caracterización de una nueva lectina parecida a las inmunoglobulinas que une ácido siálico, esta lectina denominada singlec-8 parece ser que es expresada especificamente en eosinófilos, contiene 3 dominios: un dominio extracelular (parecido a las inmunoglobulinas) una región transmembranal y un tallo citoplasmático de 47 aminoácidos. El singlec-8 se encuentra en el cromosoma 19. Este es el primer ejemplo de receptor transmembranal específico de eosinófilos (3, 10) (Tabla II).

FUNCIONES DEL EOSINÓFILO

La actividad microbicida y efectora de los eosinófilos ha sido asociada principalmente al aumento y degranulación de proteínas citotóxicas como la MBP, EPO, ECP y la EDN. Los efectos citotóxicos de estas proteínas han sido observados en estudios *in vitro* tanto sobre helmintos, como sobre parásitos protozoarios intracelulares (11).

Mecanismo efector sobre helmintos.

La producción de anticuerpos específicos y eosinofília son observados frecuentemente en infecciones provocadas por helmintos como *Nippostrongilus*, filarias y esquistosomas que inducen niveles elevados de IgE.

Experimentos in vitro sugieren que la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) o de complemento mediada por eosinófilos juega un papel efectivo en la destrucción de estos parásitos. La interacción entre eosinófilos y parásitos es dependiente de una opsonización adecuada con anticuerpos específicos como IgG (especialmente IgG2), IgA e IgE, o por componentes del complemento como C3b y C3bi, facilitando de esta manera el reconocimiento de los eosinófilos por receptores específicos de membrana. Rápidamente después, el eosinófilo se adhiere al parásito formando pseudópodos y vacuolas citoplasmáticas, las cuales están formadas por la fusión de sus gránulos con la membrana plásmatica de la célula. El contenido de los gránulos es liberado en el sitio de la adhesión, dañando de esta manera el tegumento del parásito. Este mecanismo efector del eosinófilo es mediado por proteínas citotóxicas como la MBP, EPO, ECP y EDN, las cuales son secretadas sobre el parásito. Estudios de ultramicroscopía demostraron la presencia de estas proteínas en la superficie de larvas de *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Onchocerca volvulus*, *Toxocara canis*, *Fasciola hepática y Necator americano*. Las más tóxicas son la MBP y EDN causando esta última parálisis reversible sobre esquistosómulas de *Schistosoma mansoni*, disminuyendo su motilidad y provocando daño a nivel membranal hasta la muerte del mismo. Adicionalmente, la proteína EPO genera iones OH⁻ contribuyendo también con un potencial citotóxico frente al parásito (12, 13).

Mecanismos efectores sobre protozoarios intracelulares y extracelulares.

A diferencia de los estudios hechos sobre helmintos, la función de los eosinófilos frente a parásitos protozoarios intracelulares y extracelulares está menos estudiada. Sin embargo, estudios ultra-estructurales sobre *Trypanososma cruzi* y *Toxoplasma gondii* describen que los eosinófilos son capaces de fagocitar y matar parásitos opsonizados, tanto con anticuerpos específicos contra los parásitos, como también por las fracciones C3b y C3bi del complemento (14).

En co-incubaciones in vitro de Leishmania donovani con eosinófilos, se observó activación de la vía alterna del complemento en ausencia de anticuerpos específicos antiparásitos, con adhesión y posteriormente degranulación de proteínas citotóxicas como MBP, EDN, EPO, ECP, las que por su alta afinidad por cargas negativas se unen a la superficie del parásito provocando daño y la eliminación del mismo. Otro mecanismo efector de eosinófilos sobre parásitos protozoarios como Leishmanias es la fagocitosis mediante opsonización y daño del parásito por enzimas lisosomales (aril sulfatasas y peroxidasas) presentes en el fagolisosoma. Estas enzimas lisosomales también se han observado en la superficie de parásitos extracelulares. Adicionalmente, en el momento de la fagocitosis del parásito, los eosinófilos se activan liberando metabolitos de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O, -) radicales de hidrógeno (ÕH-+) y oxígeno singulete (Σg+O₂) siendo este uno de los mecanismos más efectivos en la destrucción y eliminación de parásitos intracelulares.

Otro mecanismo de actividad microbicida de los eosinófilos sobre Leishmanias intra y extracelulares es mediante la acción de metabolitos derivados de nitrógeno como el óxido nitrico (NO). Este mecanismo se observó estimulando eosinófilos peritoneales de ratas, con IL-8, INF-gama, TNF-alfa e IL-5 en asociación con Leishmanias. Esta activación permite el incremento en la producción de NO por los eosinófilos y el aumento en su actividad leishmanicida (15).

Aunque la parasitosis por protozoarios intracelulares generalmente no evoluciona con eosinofilia importante, como ocurre en las helmintiasis, su participación como célula efectora e inmunomoduladora de la respuesta inmune puede contribuir en el control y erradicación de estos parásitos. De esta manera, el eosinófilo también se convierte en una célula importante y decisiva en la evolución de la enfermedad causada por parásitos protozoarios.

REFERENCIAS

- 1. Rothenberg M (1998) Mechanisms of disease: Eosinophilia. New Engl J Med 338: 1592-1599.
- 2. Gleich GJ y Adolphson CR (1986) The eosinophilic leukocyte: struture and function. Adv Immunol *39*: 177-253.
- Weller PF (1988) Eosinophil structure and function. Mc Carty DJ, ed. Arthritis and Allied Condition. En: Textbook of Rheumatology, 11th edition. Editorial: Lea & Febiger, Philadelphia, pp 366-373.
- 4. Jones DG (1993) The Eosinophils. J Comp Path *108*: 317-335.
- Sanderson CJ (1992) Interleukin-5, eosinophils and disease. Blood 79: 3101-3109.
- Dent LA, Strath M, Mellor AL y Sanderson CJ (1990) Eosinophil in transgenic mice expressing interleukin-5. J Exp Med 172: 1425-1431.

- 7. Dvorak AM (1990) Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. En: Blood Cell Biochemistry, Megakaryocytes, platelets, macrophages and eosinophils. Vol 2. Editor: Harris Jr. Plenum Press, New York and London, pp 237-344.
- 8. Dvorak AM, Letourneau L, Login GR y Weller Pf (1988) Ultrastructural localization of the Charcotleyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. Blood 72: 150-158.
- 9. Petersen CGB, Skoog V y Venge P (1983) Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. Immunol *50*: 519-526.
- Floyd H, Ni J, Cornish AL, Zeng Z, Liu D, Carter KC, Steel J y Crocker PR (2000) Singlec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. J Biol Chem 275: 861-866.
- 11. Venge P y Petersen CGB (1989) Eosinophil biochemistry and killing mechanisms. En: Eosinophils and Asthma. Editores: Morley J. and Colditz I, Academic Press, N.Y. pp 163-177.
- Wasmoen TL, Bell MP, Loegering DA y Gleich GJ (1988) Biochemical and aminoacid sequence analysis of human eosinophils granule major basic protein. J Biol Chem 263: 12559-12563.
- 13. Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ y Loegering DA (1979) Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. J Immunol *122*: 221-229.
- 14. Thorne KJ, Glauert AM, Svuennsen RJ y Franks D (1979) Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionissi* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. Parasitol 79: 367-379.
- 15. Pimenta PFP, Dos Santos MAV y De Souza W (1987) Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. J Submicrosc Cytol. *19*: 387-395.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Oscar Juárez y Rafael Moreno Sánchez

TEMA: Cinética enzimática. Enzimas alostéricas.

La fosfofructocinasa-I (PFK-I) es la principal enzima reguladora de la glucólisis y es la enzima que controla la transición aeróbica-anaeróbica en la vía. Esto es resultado de la complejidad cinética que presenta y de la amplia variedad de ligandos que tiene. La PFK-I es una enzima alostérica cuyo sitio catalítico muestra cooperatividad positiva por la fructosa 6-fosfato, pero se comporta de manera hiperbólica con respecto al ATP. Además, presenta activación o inhibición alostérica de tipo mixta (K o V) por varios ligandos, incluyendo al segundo sustrato (ATP) y sus productos (1). La respuesta de la enzima hacia una variedad de ligandos permite que la vía se ajuste a los cambios en el ambiente y a los requerimientos celulares (2).

El ATP, además de ser un sustrato de la enzima, es uno de los dos inhibidores más potentes (el citrato es el inhibidor más potente). Se sabe que esta enzima presenta dos sitios de unión a este metabolito, uno es el sitio catalítico y otro es el sitio alostérico. Esto hace pensar que la respuesta de esta enzima hacia el ATP es paradójica al ser sustrato e inhibidor (2).

El análisis de la actividad de la enzima al variar la concentración de ambos sustratos resultó en los datos que se presentan en la tabla.

Los experimentos se realizaron en el siguiente medio: MOPS, 50 mM; KCl, 100 mM; EDTA, 100 μ M; DTT, 2 mM; Mg⁺⁺ libre, 2 mM; NADH, 100 μ M; pH 7.0 y 0.1 μ g/ ml de la enzima hepática purificada. La actividad de la enzima fue acoplada al consumo de NADH mediante las siguientes enzimas que se encontraban en exceso: aldolasa, triosa fosfato isomerasa, α -glicerol fosfato deshidrogenasa (3).

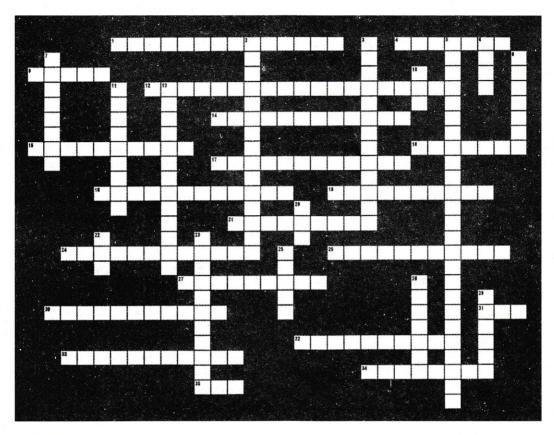
				Ve	elocidad	(v/Vm)					
Fructosa				0	ATP (r	nM)			9		
6-fosfato											
(mM)	0.005	0.025	0.05	0.2	0.25	0.5	1	1.5	2	3	5
0.025	4.2	9	5								
0.05	8.3	17	15								
0.1	14.5	35	35	2.9							
0.3	18.7	48	55	10	8	1.2	1				
0.6	20.2	55	65	19.1	14						
1	20.9			41.1	30	7.3					
1.3	21.1	58	75	54	52.6	17.66					
1.6	21.3	59	74	85		30.8	4.4				
2	21.4	57		93	88.5	69.9	18	7.1	2.4	1	
2.5		61	77	96	96.6	85.6	37.1	13.2	7.1		
3			77.3	97	95	96.9	62.5	40.5	16.4	4.7	
4				98.5	99		90.49	65.7	40.5	11.6	2.1
5				98	97	99.5	96.9	81.5	61.4	31.8	
6						98.7			77.2	51.4	11.7
7							100			57.3	
8		Nota: la	velocidad	de la				93		79.4	32.3
9			n cualquie							89.7	Acceptate
10			ntos fue cere	•			98.5	99.5	92	92.6	52
12		deshidro	actividad d genasa	e NADH							76.4
13			iente de	fructosa				100			83.8
15		1,6-bisfos							98	98.5	92.6
20											100

Determine las constantes de disociación de los sitios catalítico y alostérico del ATP.

CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori

QUÍMICA DE NUCLEÓTIDOS



HORIZONTALES

- 1. Análogo de la adenina, tiene un SH en posición 6 y se usa como agente antitumoral
- 4. En el polinucleótido ADN se une a la timina mediante dos puentes de hidrógeno.
- Número de kilocalorías que se liberan en la hidrólisis del tercer fosfato en el ATP.
- Nucleótido que en su forma cíclica actúa como segundo mensajero hormonal.
- **14.** Análogo fluorado del uracilo, es un agente quimioterápico.
- **15.** Función de algunos nucleótidos con dos o tres grupos fosfato.
- 16. Base púrica que en el ADN se encuentra en cantidades equimoleculares a la citosina.
- **17.** Función de algunos nucleótidos, realizada en presencia de las enzimas.
- **18.** Enlace mediante el cual se forman los polinucleótidos.
- 19. Inhibidor de la xantina oxidasa, se utiliza en el tratamiento de hiperuricemia y gota.

- 21. 9-beta-D-ribofuranosiladenina.
- **24.** Tipo de reacciones en las que se utiliza la energía almacenada en el ATP.
- **26.** Pueden ser transportadores de energía, coenzimas o monómeros para la síntesis de ácidos nucleicos.
- **27**. Ácido que al esterificarse a un nucleósido lo transforma en nucleótido.
- 30. Citosina, timina y uracilo.
- **31.** Monofosfato de uridina o ácido uridílico
- **32.** Ribosa o desoxirribosa unida por enlace beta-N-glucosídico a una base nitrogenada.
- **33.** Vitamina presente en el FAD, participa en la transferencia de electrones.
- **34.** Molécula que en el ADN se une a la guanina por tres puentes de hidrógeno.
- **35.** Nucleótido de adenina, es la moneda energética.

VERTICALES

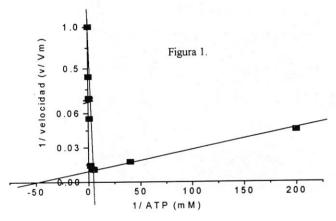
- 2. ADN y ARN.
- **3.** Azúcar participante en el polinucléotido ADN.
- 5. Coenzima de muchas deshidrogenasas.

- **6.** Se reduce en la vía del fosfogluconato y se emplea en la vía lipogenética.
- **7.** Desoxirribonucleósido de la timina.
- 2,6-dioxipurina.
- **10.** Durante la oxidación de un sustrato, acepta en su nicotinamida un hidrógeno y 2 electrones (hidruro).
- **11.** Ácidos formados por la polimerización de nucleótidos mediante enlaces fosfodiéster y N-glucosídicos.
- **13.** Participan en reacciones de oxidorreducción, por ejemplo el NADH y el FAD.
- **20.** Número de ATP que se producen en la cadena respiratoria cuando se oxida un mol de FAD reducido.
- **22.** Es el sustrato específico que capta energía durante la fosforilación oxidativa.
- **23.** Se obtiene a partir de la adenina por desaminación oxidativa.
- **25.** Ácido, último producto de la oxidación de las purinas, su acumulación es una manifestación de gota.
- **28.** Producto de la desaminación oxidativa de la citosina.
- **29.** Estructura heterocíclica formada por un anillo hexagonal de pirimidina y uno pentagonal de imidazol.

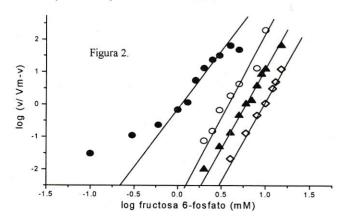
PROBLEMA BIOQUÍMICO

RESPUESTA:

Como la cinética del sitio catalítico hacia ATP es hiperbólica, la Ks de este sitio se puede obtener al graficar el inverso de la velocidad a una concentración alta de fructosa 6-fosfato (por ejemplo 2 mM) contra la concentración de ATP variable (Fig. 1). Se obtienen dos pendientes con signo diferente. La abscisa al origen de la recta con pendiente positiva indica el valor inverso negativo de la constante de disociación del sitio catalítico, el cual es 0.020 mM (1/-50). La pendiente negativa es el resultado de la inhibición por la unión del ATP al sitio alostérico.



Antes de determinar la afinidad del sitio alostérico del ATP es necesario conocer el número de sitios interactuantes. La pendiente del gráfico de Hill es un índice del número de sitios. En la figura 2 se muestra este gráfico utilizando las concentraciones de ATP de 0.2, 1, 3 y 5 mM, respectivamente de izquierda a derecha. La pendiente es cercana a cuatro, es decir, es un tetrámero.

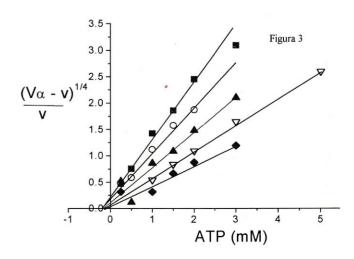


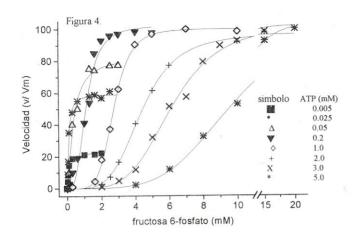
Para determinar la afinidad del sitio alostérico se usa la ecuación de Búc para inhibidores alostéricos, la cual es una linearización del Modelo de la Transición Alostérica Concertada de Monod, Wyman y Changeaux.

$$\frac{(V\alpha - v)^{1/4}}{v} = L_{\alpha}^{1/4} + [\eta] \frac{L_{\alpha}^{1/4}}{KI}$$

donde $V\alpha$ es la actividad máxima de la enzima a una concentración fija de fructosa 6-fosfato y $L\alpha$ es igual a L/(1 + s/Ks)4. La intersección en el eje de las abscisas indica la constante de disociación del sitio alostérico. En este caso la Ki fue aproximadamente 0.3 mM.

La PFK muestra un comportamiento bifásico al variar la concentración de ATP (Fig. 4). A bajas concentraciones la actividad de la enzima aumenta, debido a que el sitio catalítico se va saturando, ya que la afinidad de éste es alta hacia el ATP. Sin embargo, conforme la concentración de ATP aumenta, el sitio alostérico comienza a inhibir la actividad. Es importante señalar que a pesar de que esta enzima utiliza ATP, pertenece a una de las vías productoras de éste, por lo que la cinética de la enzima se asemeja al de las enzimas regenerantes de ATP (4). Esta capacidad de la PFK-I le permite a la célula modular la velocidad de la vía glucolítica en función de la carga energética y la relación ATP/ADP.

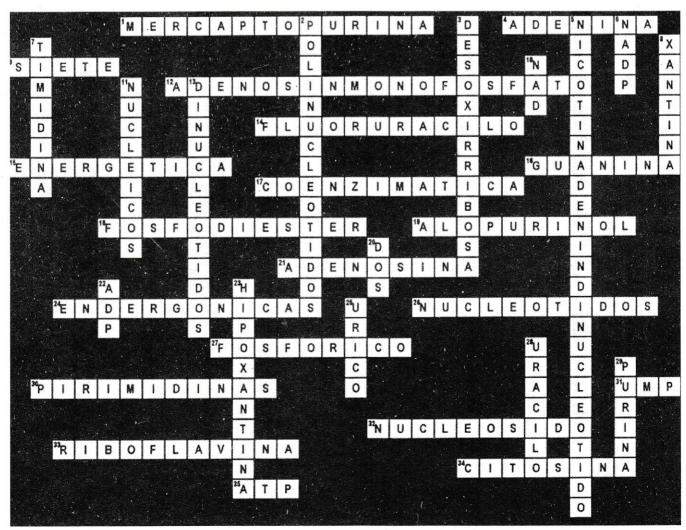




REFERENCIAS

- 1. Bloxham D P y cols. (1973) Phosphofructokinase; Group Transfer; En: The Enzymes. 3a Ed. Boyer. 239-278.
- 2. Tewjani G A (1978) The role of Phosphofructokinase in the Pasteur Effect. TIBS 3: 30-33.
- 3. Reinhart G D y cols. (1980) Rat Liver Phosphofructokinase: Kinetic Activity under Near-Physiological Conditions. Biochemistry. *19*: 1477-1484.
- 4. Ramaiah A (1974) Pasteur Effect and Phospho-fructokinase. Current Topics in Cellular Regulation 8: 297-345.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ QUÍMICA DE NUCLEÓTIDOS



IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C. Semana del 1 al 5 de octubre de 2001, programa preliminar SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2001 XXVIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

HORA	LUNES 1	MARTES 2	MIÉRCOLES 3	JUEVES 4	VIERNES 5
8:00	Inscripción				
9:00 a 10:30	Avances y retrocesos en el estudio del origen de la vida. Antonio Lazcano Facultad de Ciencias, UNAM.	Título pendiente. Alejandro Alagón Instituto de Biotecnología, UNAM.	Transporte intracelular de proteínas. José Moreno CMN Siglo XXI, IMSS.	E. coli patógena causante de enfermedad intestinal. Alejandro Cravioto y Carlos Eslava Facultad de Medicina, UNAM.	Estrategias de Docencia. Rogelio Lozano Facultad de Medicina, UNAM.
RECES0			,	Z	+
10:45 a 12:15	Genes y genomas. Víctor Valdés Facultad de Ciencias, UNAM.	Fisiología celular y molecular de canales iónicos. Marcelino Cereijido Cinvestav, IPN.	Factores de transcripción. Antonio Cerbón Facultad de Química, UNAM.	Metaloproteinasas de matriz extracelular, un delicado equilibrio Annie Pardo. Facultad de Ciencias, UNAM. Moisés Selman, INER	Estrategias de Docencia Enrique Martínez ITESM Campus Monterrey
RECESO					
a 14:00	Ponencia Pendiente	Mitocondria y Apoptosis Mauricio Montal Universidad de California La Jolla, CA, USA	Ponencia Pendiente	Diabetes Teresa Tusié Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM-INP	Estrategias de Docencia Irma Delfín y Ma. Isabel Raygoza ENEP Aragón, UNAM.
			RECESO	,	
16:00 a 19:00	Carteles Congreso de la AMPB, A.C.	TALLER: LA CONSTRUCCIÓN DE MATERI COMO HERRAMIENTA DE APOYO AL PRC APRENDIZAJE Jorge Joel Reyes Méndez. UAM-Xochimilco	TALLER: LA CONSTRUCCIÓN DE MATERIAL DIDÁCTICO HIPERTEXTUAL COMO HERRAMIENTA DE APOYO AL PROCESO DE ENSEÑANZA- APRENDIZAJE Jorge Joel Reyes Méndez. UAM-Xochimilco	O HIPERTEXTUAL JEÑANZA-	Sesión de Negocios de la AMPB, A.C. Clausura

Sede: Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UNAM.

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

X CONGRESO DE BIOENERGÉTICA Y BIOMEMBRANAS

1er. Comunicado

El Comité Organizador del XII Congreso de Bioenergética y Biomembranas invita a la reunión bienal que tendrá lugar del

18 al 22 de noviembre de 2001

Los temas que se incluirán en el programa son:

ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE MEMBRANAS ACARREADORES Y CANALES TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ATPasas CADENAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES METABOLISMO ENERGÉTICO

Como sede posible estaría el hotel **Real de Minas** de la Cd. de Querétaro. Una segunda comunicación incluirá la sede definitiva y las formas de envío de resúmenes, así como los costos de inscripción, hospedaje e instrucciones para llegar. Ésta será emitida en el segundo trimestre de 2001

COMITÉ ORGANIZADOR

Ana Cecilia Zazueta Mendizábal

Instituto de Cardiología Tel. 5573-2911 (ext.1298) FAX 55730926 e-mail:zazueta22@hotmail.com

Mauricio Díaz Muñoz

Centro de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla Tel. y FAX: 5623-4035 e-mail:mdíaz@calli.cnb.unam.mx

Edgardo Escamilla Marván

Instituto de Fisiología Celular, UNAM Tel. 5622-5627 y 28 FAX 5622-5630 e-mail:eescami@ifisiol.unam.mx

Sergio Sánchez Armass

Universidad de San Luis Potosí e-mail:armass@deimos.tc.uaslp.mx

IV SIMPOSIO ESTRÉS OXIDATIVO EN BIOMEDICINA



Julio 16-18, 2001, Ciudad de La Habana, Cuba

INVITACIÓN

El Comité Organizador del IV Simposio Internacional de Estrés Oxidativo en Biomedicina, tiene el placer de invitarle a participar en nuestro evento que tendrá lugar en el Centro de Investigaciones Biomédicas "Victoria Girón" del 16 al 18 de julio del 2001.

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) por medio de señales redox intervienen en diferentes procesos biológicos mediante la estimulación de mecanismos de transducción.

Estas especies activan segundos mensajeros intracelulares y están íntimamente relacionadas con la biosíntesis de citoquinas que se convierten en señales de comunicación intercelulares determinantes para el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

En estos días de intercambio científico se impartirán conferencias y se realizarán presentaciones orales y de carteles.

Los principales tópicos que se desarrollarán son:

- Mediadores de la comunicación intercelular y la respuesta oxidativa.
- Apoptosis.
- Respuesa inflamatoria sistémica.
- Mecanismos regulatorios de la rspuesta oxidativa.
- Estrés oxidativo y enfermedad.
- Endotelio, oxidación de LDL y ateroesclerosis.
- Antioxidantes como moduladores de la respuesta oxidativa.
- Piel: ¿Blanco o generador de estrés oxidativo?
- Estrés oxidativo y envejecimiento.

Inscripción

50.00 Médicos especialistas y otros profesionales 30.00 Médicos residentes y reserva científica

No. de cuenta: 012421110391048

CUPÓN DE INSCRIPCIÓN

Nombre y apellidos Institución		
Dirección		
Teléfono		
Fax		
Email	-	
Tipo de participació	ón:	
Conferencia	Cartel	

Mesa redonda	
Presentación oral	
Sólo participar	
Alojamiento	

El Comité Organizador estará muy gustoso de contar con su participación.

Enviar resumen y artículo antes del 31 de enero del 2001. Fecha límite de inscripción sin recargo.

Envíe tres copias del resumen en papel y una del artículo completo en soporte informático de 3.5 pulgadas utilizando Microsoft Word (Times New Roman 10).

La extensión máxima será de ocho cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y cuatro las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras.

La primera página contendrá el nombre de la institución que auspicia el trabajo, el título que no excederá las 15 palabras, nombres y apellidos completos de todos los autores ordenados según su participación, grado científico y categoría docente o investigativa más importante de cada autor.

La segunda página incluirá un resumen informativo de 150 palabras, como máximo, contentivo de los propósitos, procedimientos empleados, resultados más relevantes y principales conclusiones del trabajo al igual que cualquier aspecto novedoso.

Las referencias bibliográficas deben cumplir con las normas de Vancouver.

Los resultados y discusión deben presentarse separados. Las tablas, modelos y anexos no se intercalarán en el artículo.

Fecha límite de inscripción 31 de mayo del 2001 con recargo del 20 por ciento.

Coauspiciadores: **CIREN** CIS LA PRADERA CQF, IFAL, CENATOX, CIO, CNIC.

Para mayor información contactar a: Dra. Niurda Llópiz Janer. Sec. Comisión Científica ICBP "Victoria de Girón". 146 No. 3102, Cubanacán, Playa 11600, Ciudad La Habana, CUBA

Fax: 537337853

Email: niurka@giron.sld.cu



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CONVOCATORIA

Investigadores Estudiantes

!Envien sus contribuciones científicas a
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas
para su publicación!



REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM es una publicación periódica y con arbitraje que difunde información científica sobre temas de botánica y zoología; ecología; microbiología; bioquímica; fisicoquímica; física; matemáticas; farmacia; química general, orgánica e inorgánica.

La revista es un foro para recibir trabajos de carácter interdisciplinario escrito por investigadores científicos, pero también pretende cubrir un espacio como es el publicar los resultados de investigaciones de tesis de estudiantes de grado, debidamente asesorados, de cualquier institución, tanto nacional como internacional.

Se aceptan trabajos de investigación científica original e inédita, artículos breves, artículos de revisión, ensayos y notas científicas en español e inglés.

Las personas interesadas en la publicación de sus trabajos de investigación o que soliciten información complementaria, deberán dirigirse a:

PROGRAMA EDITORIAL

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batalla del 5 de Mayo, esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, C.P. 09230. Tel. y fax: 57.73.63.32; e-mail: revistatip@yahoo.com; terrones@fenix.ifisicacu.unam.mx (DR. HUMBERTO TERRONES, EDITOR).

FORMA DE ACTUALIZACIÓN DE MEMBRESÍA A LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Nombre completo:			
Asociado:	NUMERARIO	ESTUDIANTE	
Cuota cubierta:	\$300 pesos □	\$150 pesos □	
Nombramiento:			166.46440454544 4 4407
Profesor de Bioquímica:	SI 🗆	NO□	
Otra materia:			
ADSCRIPCIÓN			
•			
omversidad.		*	
DIRECCIÓN DE LA IN	STITUCIÓN		
Calle y número:	***************************************		
Colonia:			
Ciudad o estado:			
Código postal:	***************************************	Apartado postal:	**************************************
Teléfono : ()	, Fax: ()		
Correo electrónico:			
DOMICILIO PARTICU	LAR		
Código postal:			
Teléfono: ()			

CORRESPONSALES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor del BEB y vives fuera de la Ciudad de México, te invitamos a que seas corresponsal de nuestra revista en el sitio donde radiques.

Nos interesa contar con corresponsales adscritos a las Instituciones de Educación Superior en todos los estados de la República, así como en lugares de Centro y Sudamérica, España y otros sitios en donde el BEB sea leído.

También nos interesa conocer y publicar las noticias más significativas que en nuestro campo ocurran en los diferentes lugares, ya sean seminarios, cursos, congresos, talleres, publicaciones, etc.

En el documento Normas del Comité Editorial, que es el que nos rige, hay un apartado para esta actividad, mismo que a continuación se transcribe:

5. DE LOS CORRESPONSALES

- 5. a) Los corresponsales del BEB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. El corresponsal debe ser un miembro sobresaliente de la comunidad académica local o regional. Es deseable un corresponsal en cada una de las Instituciones de Educación Superior de la República Mexicana, Centroamérica, Sudamérica y otras regiones de habla hispana.
- 5. b) Uno de los editores se encargará de la coordinación de los corresponsales y de la comunicación con ellos para lograr que los objetivos se cumplan. El puesto será rotatorio y se cambiará cada dos o cuatro años, de acuerdo con el Comité Editorial.
- 5. c) La proposición de corresponsales se hará, mediante documento firmado por cuando menos dos de los editores, que se acompañará con el *Curriculum Vitae* del candidato propuesto.
- 5. d) La discusión del ingreso de un corresponsal deberá realizarse después de que el Coordinador de Corresponsales haya circulado la información correspondiente y con la asistencia en pleno del Comité Editorial.

- 5. e) Para ser aceptado, el candidato deberá contar con la aprobación por consenso de los miembros del Comité Editorial.
- 5. f) En caso de ser admitido, se le hará una invitación formal a la que se anexarán estas normas. Iniciará sus actividades como corresponsal, al recibir el Editor en Jefe la aceptación escrita del candidato.
- 5. g) El Comité Editorial dará el crédito correspondiente a los corresponsales en la revista en el formato que el propio Comité decida.
- 5. h) La salida de un corresponsal puede ser por renuncia voluntaria, presentada por escrito, o bien por acuerdo del Comité Editorial, después de la evaluación de sus actividades.

5.1 RESPONSABILIDADES DE LOS CORRESPONSALES

- 5.1.a) Envío a través del Coordinador de Corresponsales de al menos una contribución propia o de su comunidad al año y de las noticias relevantes de su localidad o región.
- 5.1.b) Mantenimiento del archivo de los suscriptores del BEB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.
- 5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución del BEB entre los miembros de su comunidad.
- 5.1.d) Colaboración en las promociones de financiamiento económico de la revista.
- 5.1.e) Elaboración y envío anual de un informe de sus labores que a través del Coordinador de Corresponsales se hará llegar al Comité Editorial junto con una crítica a los números correspondientes.

Por favor, dirige tu correspondencia a la Coordinadora de Corresponsales, Comité Editorial del BEB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MÉXICO, o bien a: Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.

email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori Coordinadora de Corresponsales del BEB.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

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 que revisen algunos de los últimos números de esta publicación para que vean estilo, tipos de abreviaturas, etc., así como que se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Wordperfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Éste deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.
- 2) El trabajo debe iniciarse con el título del artículo, nombre de los autores, iniciando por nombre propio completo y marcado como pie de nota, la afiliación del o los autores (por ejemplo: departamento e institución), domicilio, código postal, ciudad, estado, país, teléfono, fax y correo electrónico en caso de tenerlos. Debe incluirse cuatro renglones más abajo, un título breve con un máximo de 60 caracteres, incluyendo los espacios, para insertarlo como cabeza de página.
- Se deberá incluir un resumen en idioma español y uno en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 4) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas entre paréntesis 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 oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y últimas páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Fraga C G y Oteiza P I (1995) Vitaminas antioxidantes: Bioquímica, Nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. Bol Educ Bioq 14:12-17.

Weindruch R (1996) Caloric restriction and aging. Sci Amer 274:32-38.

Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma:

Wood K J (1992) Tolerance to alloantigens. En: The molecular biology of immunosuppression. Editor: Thomson A W. John Willey and Sons Ltd, pp 81-104.

Los libros se citarán de acuerdo con este ejemplo y podrán incluir las páginas totales o las consultadas:

Lehninger A L, Nelson D L y Cox M M (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

5) Se aceptarán como máximo seis ilustraciones, figuras más tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o bien impresiones láser 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. Las tablas se deberán presentar conforme alguna de las publicadas en los números de 1999. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá dársele el crédito correspondiente u obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse así (Fig. X) numerándolas con arábigos. Las tablas siempre llevarán la inicial a mayúscula y se numerarán con romanos.

- 6) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.
- Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- 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, comentarios o erratas de artículos publicados previamente, etcétera.
- El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- El trabajo deberá enviarse igual que como se específica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptará un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto según el inciso I-4. En caso de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla, de acuerdo con las características que se indican en el inciso I-5

Los manuscritos serán leídos por tres revisores en un lapso no mayor de dos meses. Las correcciones y sugerencias, así como las pruebas de página se enviarán al primer autor. En caso necesario se recurrirá a revisores externos al Comité Editorial.

El disco y las tres copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal del BEB en su localidad.

BEB 2001 Vol 20 Núm 1 Marzo de 2001

CONTENIDO

EDITORIAL	OTRAS COMUNICACIONES
RETOS Y PERSPECTIVAS PARA LA ACTUAL PRESIDENCIA DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.	PROBLEMA BIOQUÍMICO. CINÉTICA ENZIMÁTICA. ENZIMAS ALOSTÉRICAS Oscar Juárez y Rafael Moreno Sánchez
Marco Antonio Juárez Oropeza 4	CRUCIBIOQ.
ARTÍCULOS	QUÍMICA DE NUCLEÓTIDOS Yolanda Saldaña Balmori
LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA	RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO Oscar Juárez y Rafael Moreno Sánchez
Félix Recillas Targa	SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ Yolanda Saldaña Balmori
ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C: AVANCES Y PERSPECTIVAS	CONVOCATORIAS
Erika P. Rendón Huerta y Martha Robles Flores	SEMANA DE LA EDUCACIÓN BIOQUÍMICA Primer anuncio
LA MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS ¿UN ENFOQUE EXPERIMENTAL ANTICUADO?	X CONGRESO DE BIOENERGÉTICA Y BIOMEMBRANAS DE LA SMB Primer comunicado
Gabriela Montero Morán, Laura I. Alvarez Añorve y Samuel Lara González	IV SIMPOSIO ESTRÉS OXIDATIVO
I ACTATO DEGINDROCENIAGAG ACODI ADAG	EN BIOMEDICINA. Invitación 60
LACTATO DESHIDROGENASAS ACOPLADAS A LAS CADENAS RESPIRATORIAS	TIP REVISTA ESPECIALIZADA EN
Ricardo Jasso Chávez, María Eugenia Torres Márquez y Rafael Moreno Sánchez	CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS. FES-ZARAGOZA
	Convocatoria
EL EOSINÓFILO: CÉLULA EFECTORA EN ENFERMEDADES PARASITARIAS	CORRESPONSALES DEL BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA
Roxana Porcel Aranibar e Ingeborg Becker Fauser	DE EDUCACION BIOQUINICA
c ingesorg beeker rauser	INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETÍN
	DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA64