ISSN-1665-1995

REB 2003

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Órgano de información de la
Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina,
UNAM

Sociedad Mexicana de
Bioquímica, AC

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 22 No. 2 JUNIO 2003

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias e
Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

EDITORES

CARLOS CERVANTES VEGA
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

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

RAFAEL MORENO SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

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

YOLANDA SALDAÑA BALMORI
Facultad de Medicina
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

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

EVA IRMA VEJAR RIVERA
Facultad de Química
Universidad de Sonora

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.

MARÍA DEL CARMEN RÍOS DE MOLINA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires, Argentina

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).

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), 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: 12000; Licitud de Contenido: 8397 No. de expediente 1/432"2"/15792; Reserva al título en derecho de autor No. 04-2002-030616225500- 102. Diseño: Juan Antonio Flores de la Torre; Producción: Francisco Urtecho Ulloa. Impresa en los talleres Grupo Jolmaf, S.A. de C.V., Hopelchen, Manzana 16 Lote 43, Col. Héroes de Padierna, México, DF; tiraje 1,500 ejemplares. Distribuidor: Servicio Postal Mexicano, Reg No PP09-0403; UNAM-Depto de Bioquímica y Facultad de Medicina.

El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la del Comité Editorial.

REB 2003 Vol 22 Núm 2 Junio de 2003

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

LA BIOQUÍMICA, LAS CIENCIAS GENÓMICAS Y LA COMUNICACIÓN
Marco Antonio Juárez Oropeza..... 51

ARTÍCULOS

LAS MIOSINAS EN EL MOVIMIENTO CELULAR I, ESTRUCTURAS Y PROPIEDADES CINÉTICAS
Luiz C. Cameron, Marco Machado y Graciela Meza 53

LAS MIOSINAS EN EL MOVIMIENTO CELULAR II. DISTRIBUCIÓN E IMPLICACIONES FUNCIONALES
Dra. Graciela Meza Ruiz 60

RECEPTORES TOLL Y MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN EN LA INMUNIDAD INNATA
Cielo Ruíz-López y Gloria Gutiérrez-Venegas. 67

LA ESTRUCTURA DE LAS CATALASAS
Adelaida Díaz 76

OTRAS COMUNICACIONES

PROBLEMA BIOQUÍMICO I. BIOLOGÍA MOLECULAR. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE DNA EN BASES DE DATOS DISPONIBLES EN EL INTERNET.
Emma Saavedra 85

PROBLEMA BIOQUÍMICO II. BIOENERGÉTICA, TRANSPORTE DE CADMIO EN CLOROPLASTO
David Mendoza Cózatl y Rafael Moreno Sánchez..... 86

CRUCIBIOQ. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
Yolanda Saldaña Balmori 87

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO I
Emma Saavedra 89

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO II
David Mendoza Cózatl y Rafael Moreno Sánchez..... 92

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
Yolanda Saldaña Balmori 94

VOCABULARIO INGLÉS-ESPAÑOL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Verónoca Saladrigas Y Gonzalo Claros..... 95

CONVOCATORIAS

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 112

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....113

EDITORIAL

LA BIOQUÍMICA, LAS CIENCIAS GENÓMICAS Y LA COMUNICACIÓN

Después de 50 años de haberse identificado la estructura del ADN, en abril de 1953, el Proyecto del Genoma Humano anunció la culminación de la secuenciación completa del genoma humano, en abril de 2003. Este megaproyecto inició en octubre de 1990, en el que participaron investigadores de diversos países. La estructura del ADN fue publicada en la revista Nature, una prestigiada revista científica de amplia difusión internacional, del mismo modo, las estrategias para la secuenciación del genoma humano también fueron publicadas en esa revista; no obstante, y a diferencia de hace 50 años, la secuencia completa del genoma humano ahora se puede consultar inmediatamente y desde cualquier parte del mundo, en el siguiente portal de internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/. Es evidente que vivimos en una nueva era, en donde la información y los medios de comunicación juegan un papel importante en cualquier aspecto de la vida, para lo cual debemos estar preparados.

Lo anterior puede ejemplificarse con la relación entre el síndrome respiratorio agudo y severo (SARS, por sus siglas en inglés) y su efecto sobre la realización del Congreso de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés), programado para efectuarse en julio de 2003. El primer brote documentado de SARS ocurrió en una provincia de China, entre noviembre de 2002 y febrero de 2003, durante el cual se reportaron 300 casos con 5 fallecimientos. No obstante, fue en Hong Kong donde el agente causal se diseminó a diferentes partes del mundo. En febrero de 2003 fue reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad emergente, llamada entonces neumonía atípica. El epidemiólogo de la OMS, Carlo Urbani, además de reconocer la enfermedad, murió posteriormente al adquirirla. En abril de 2003 se identificó el agente causal del SARS, un coronavirus cuya genoma completo es de 29,727 bases de longitud. La rapidez con la que se identificó este virus fue debida a la colaboración de 13 laboratorios en 10 países. La información referente al virus causante de SARS puede ser consultada en la página web: http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html#SARS, así como en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de Norteamérica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos intensos por controlar la enfermedad, y aunque desde marzo de 2003 la OMS ha emitido alertas y restricciones para viajeros internacionales, en mayo de 2003 se había alcanzado el nivel de pandemia en 30 diferentes países, uno de ellos Canadá, en la ciudad de Toronto, sede del XIX Congreso Internacional de la IUBMB. Debido a lo anterior y a pesar de las medidas sanitarias estrictas, los organizadores del Congreso tuvieron que cancelar, a finales de mayo, la realización del evento en Toronto, en donde por cierto se presentarían también los avances más recientes con relación al SARS. La información se comunicó oportunamente en ambos casos, la respuesta fue inmediata y en junio de 2003 se tiene un mejor control mundial de la enfermedad.

En junio de 2003, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aprobó la creación de la licenciatura en Ciencias Genómicas. Este esfuerzo fue precedido por la creación, en noviembre de 2001, del Consorcio Promotor del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). En dicho Consorcio se encuentran representadas la Secretaría de Salud (SSA), la UNAM, la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD), el sector industrial y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Lo anterior refleja que nos estamos preparando para la era genómica. Sin embargo, aún tenemos problemas de comunicación, en particular con lo que se refiere a “entenderse bien dos personas”.

La IUBMB y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés)

REB *22* (2): 51-52

han formado una comisión de enlace sobre la nomenclatura bioquímica (JCBN, por sus siglas en inglés), precisamente para recomendar normas que permitan entenderse bien en el lenguaje químico-biológico. Las recomendaciones emanadas de este Comité se pueden consultar en los portales de la IUBMB y de la IUPAC. Adicionalmente, la IUBMB tiene su propio Comité de Nomenclatura, (NC-IUBMB, por sus siglas en inglés), pero en la práctica ambos cuerpos colegiados trabajan de manera conjunta.

En la presente edición de la Revista de Educación Bioquímica (REB) incluimos un glosario de terminología relacionada con la biología molecular, este vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular fue publicado en diciembre de 2002 y representa un buen esfuerzo por mejorar la comunicación entre los estudiosos de la bioquímica y de la biología molecular. Estamos seguros de la utilidad que tendrá para nuestros lectores, así como de algunas discrepancias que suscitarán, debido fundamentalmente, al uso regional del lenguaje. Esperamos que tales discrepancias nos sean enviadas para así poder establecer una mejor comunicación entre los bioquímicos.

Durante la "SEMANA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA 2003" se presentarán temas relacionados con las ciencias genómicas, incluyendo el SARS, así como los referentes a la educación, al uso de la tecnología para el aprendizaje de la ciencia y a los factores que afectan el aprendizaje de la Bioquímica, entre otros. El asimilar los avances en la bioquímica, la biología molecular, la biotecnología, la informática, y en las estrategias docentes, nos permitirá estar preparados para una mejor comunicación en la nueva era que estamos presenciando.

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

Las Miosinas en el Movimiento Celular I, Estructuras y Propiedades Cinéticas*

Luiz C. Cameron[1,2,3], Marco Machado[1,2] y Graciela Meza[4,5]

RESUMEN

La actina forma parte del citoesqueleto de todas las células eucariotas. Durante el movimiento intracelular se utiliza la energía mecánica transducida por la hidrólisis del ATP mediada por la miosina cuando se forma el complejo acto-miosina.

Las moléculas de miosina convencional o miosina muscular se asocian y forman filamentos. Otras miosinas encontradas en un gran número de células no forman filamentos y son llamadas "no convencionales". Ambos tipos de miosinas comparten propiedades estructurales, cinéticas y de regulación. Es importante su estudio porque están alteradas en un sinnúmero de enfermedades.

PALABRAS CLAVE: movimiento intracelular, complejo acto-miosina, miosinas no-convencionales, regulación ATP-ásica, miosinas.

ABSTRACT

Actin is a component of cytoskeleton in all eucariotic cells. During intracellular movement the chemical energy of ATP hydrolysis is transduced in mechanical energy by myosin when actin-myosin interaction occurs.

Conventional muscle myosin molecules associate to form filaments. Other myosins found in numerous cells do not associate to form filaments thus named "unconventional myosins".

Both types of myosins share structural, kinetic and regulatory properties. Their study is important because they present alterations in a variety of diseases.

KEY WORDS: intracellular movement, acto-myosin complex, unconventional myosins, ATPase regulation, myosins.

INTRODUCCIÓN

La capacidad más sobresaliente de un ser vivo es la de efectuar movimientos intra-citoplásmicos que le permitan movilizar componentes necesarios en diversas regiones de la célula, o desplazarse del sitio que ocupa a otro diferente.

En ambos casos, se involucra a un par de especies moleculares que constituyen un binomio indisoluble: la actina y la miosina, (a veces también llamado complejo de acto-miosina) y que están en todos los organismos.

La interacción de ambas produce indefectiblemente "movimiento" y depende muy importantemente de la utilización de la energía química que proviene de la hidrólisis de adenosintrisfosfato (ATP).

La actina puede ser de 2 tipos: la actina α presente en músculo y las actinas β y γ de las células no musculares. Existe en forma monomérica, globular o polimerizada en microfilamentos que le dan forma a las células o a sus prolongaciones, siendo por ese motivo parte del citoesqueleto que, por ser de actina ha sido llamado "citoesqueleto de actina" (en contraposición al que está formado por tubulina que forma microtúbulos y constituye el "citoesqueleto de tubulina").

Las moléculas de actina tienden a asociarse y disociarse, según el estado metabólico de la célula, como ya se describió en un artículo reciente de esta publicación [1].

Cuando se han asociado suficiente número de moléculas forman un filamento, el que a su vez se entreteje con otros formando una compleja red (semejante a un sistema de supercarreteras) a través de la cual viajan macromoléculas libres o englobadas

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

[1]Laboratorio de Bioquímica de Proteínas. Universidad do Rio Janeiro [2]Curso de Fisioterapia. Universidade Estácio de Sá [3]Laboratorio de Biociencias da Motricidade Humana Universidade Castelo Branco-Rio de Janeiro - Brasil [4]Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México [5]Autor para Correspondencia Dra. Graciela Meza Ruíz Depto Neurociencias Instituto de Fisiología Celular, UNAM Apdo. Postal 70-253 04510 México, D.F. Correo E: gmeza@ifisiol.unam.mx

en microvesículas. La molécula encargada de que esta "carga" se desplace y de transducir la energía para hacerlo es la miosina.

La interacción "acto-miosina" se reconoció por primera vez en la contracción muscular e implica "alargamientos" y "acortamientos" de los sarcómeros (acúmulos ordenados de microfibrillas en el citoplasma de la célula muscular) con producción de ATP.

Las actinas son proteínas extraordinariamente conservadas (con pocas variaciones estructurales a lo largo de la filogenia) por lo que son el producto de una fina selección, que funcionó tan perfectamente que permaneció inmutable en los seres vivos; de hecho su presencia siempre se incluye como control positivo en cualquier experimento que implique identificación de una proteína desconocida (o su gen). En cambio, las miosinas sí han sufrido diversificación genética, de tal manera que: a) aparecen con ciertos cambios estructurales dependiendo de su ubicación celular, b) son capaces o no de asociarse en fibrillas y c) se encuentran tanto en células musculares como no musculares, a lo largo y ancho de los organismos, desde las levaduras hasta células eminentemente especializadas como son las células sensoriales del oído interno.

A la primera de estas proteínas, por haber sido descubierta en el músculo, se le llamó *miosina*; las que le siguieron, por parecérsele tanto estructuralmente, recibieron el mismo nombre, pero se bautizaron con el sobrenombre de "no convencionales" pues sólo la que ocurre en el músculo (o miosina convencional o clásica) es capaz de asociarse en fibrillas, aunque también se encuentre en otros tejidos diferentes al músculo.

PROPIEDADES GENERALES DE LAS MIOSINAS

Descrita inicialmente en la década de los treintas, la miosina se caracterizó por ser la proteína que, junto con la actina, componía esencialmente al

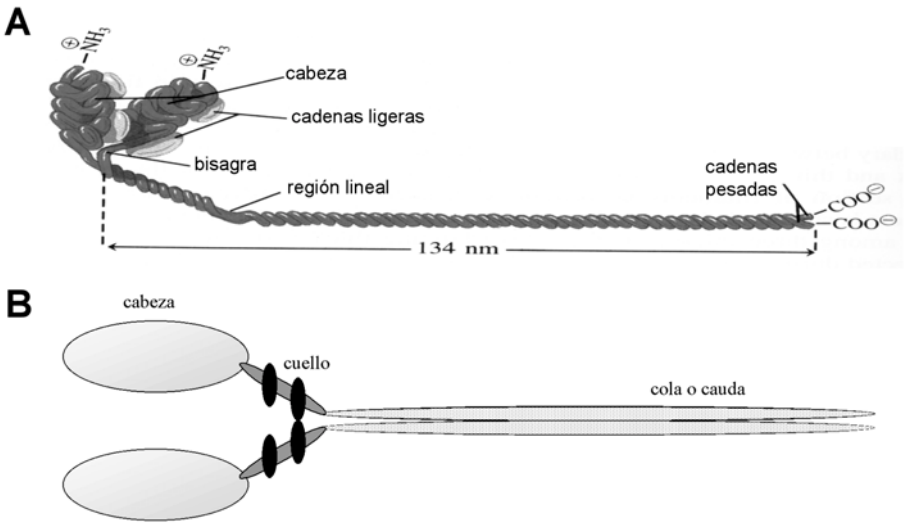


Figura 1. *Diagramas esquemáticos de una molécula hipotética de miosina.*
***A)** En la región amino terminal de las 2 cadenas pesadas se muestra la cabeza globular y las cadenas ligeras asociadas a ella. Las primeras se entrelazan para formar una doble hélice y tienen dos regiones flexibles o de bisagra.*
***B)** Simplificación de la molécula sólo para mostrar las regiones de la cabeza, el cuello y la cola.*

músculo esquelético. En esa época era difícil creer que una proteína produjera movimiento y funcionara a la vez como una enzima. Los datos mostraban que la miosina hidrolizaba al ATP y a otros nucleótidos siendo parte al mismo tiempo, de la maquinaria contráctil responsable del deslizamiento de los filamentos de actina y el acortamiento del sarcómero.

Posteriormente se describió como una característica importante que su actividad de ATP hidrolasa era muy baja pero aumentaba considerablemente cuando se asociaba a la actina. Esto lo hace promoviendo una modificación conformacional capaz de acelerar la salida de los productos de la hidrólisis del ATP, cambiando así el paso limitante del ciclo catalítico. La afinidad de la unión de la miosina con la actina disminuye entre 300 a diez mil veces en presencia de ATP y cuando este nucleótido no está presente la miosina se disocia de la actina.

Estas propiedades de la miosina muscular de hidrolizar al ATP, ejecutar movimiento de vesículas en filamentos fijos de actina o favorecer la translocación de filamentos de actina, son compartidas por las miosinas no convencionales [2]. Debido a estas características excepcionales las miosinas han sido llamadas "proteínas motoras o motrices".

ESTRUCTURA DE LAS MIOSINAS

Hasta el momento se han purificado sólo unas cuantas miosinas. Sin embargo, derivadas de estos estudios se pueden anticipar algunas características estructurales comunes.

De manera general, las miosinas son proteínas multiméricas formadas por una o varias cadenas pesadas (heavy chains, HC). La región del amino terminal de estas cadenas forma una cabeza globular a la cual se asocian dos o más cadenas ligeras diferentes entre sí. Los dominios carboxilo terminal de las HC son alfa hélices enrolladas entre ellas formando un bastón de diversas longitudes, al que se ha llamado "cola" o "cauda". La molécula de miosina contiene 2 regiones flexibles; hay una "bisagra" entre la región de la cola y la cabeza globular de la molécula y una pequeña porción lineal muy cerca de la bisagra. (Fig. 1 A y B)

La cabeza es el dominio más conservado de las moléculas de miosina y es la región con afinidad para actina y ATP, por tanto, la cabeza de las miosinas es la parte involucrada en la conversión de la energía química del ATP en energía mecánica, transducida en movimiento por el filamento de actina [3, 4].

Entre la cabeza y la cola se encuentra el dominio llamado cuello, formado a su vez por un número variable de dominios entre los que se encuentra el conocido como "IQ motif" o "motivo IQ" caracterizado por una secuencia de aproximadamente 14 aminoácidos con la repetición IQxxxRGxxxRxxY (I- isoleucina; Q-glutamina; R- arginina; G-glicina; Y-Tirosina; x- cualquier otro aminoácido). A esta región se asocian diversos tipos de cadenas ligeras, con funciones ya sea estructurales o reguladoras. Entre éstas se hallan las proteínas de la familia "EF", incluyendo a la calmodulina (CaM).

La región "EF" es un dominio que se encuentra en las proteínas que unen calcio, de todas las células eucariotas. Contiene un motivo de 29 aminoácidos rico en ácidos glutámico (GLU) y aspártico (ASP). La región intermedia o de "unión de calcio" forma un asa de 12 distintos aminoácidos que esta limitada por GLU o ASP. Los aminoácidos restantes, forman una α hélice de cada lado del asa en las que abundan los aminoácidos hidrofóbicos. Estas hélices son la E y la F de la proteína y le confieren el nombre a la región.

El dominio de la cola posee la mayor diversidad de entre todas las clases de miosinas. Sirve para anclar a la molécula y para interaccionar con: 1) otras proteínas, 2) membranas o vesículas, 3) moléculas cargadas eléctricamente o 4) para formar filamentos en el músculo.

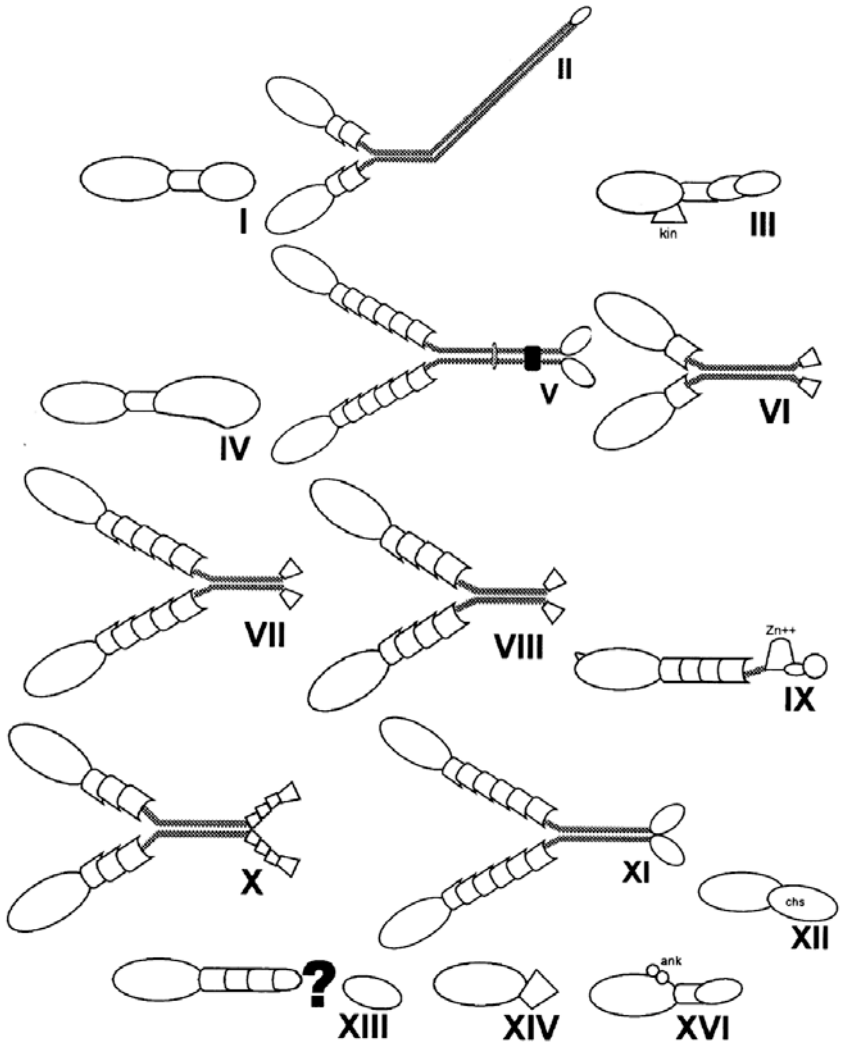


Figura 2. *Representación simplificada de la estructura de las distintas clases de miosinas en numerales romanos mostrando la cabeza, el cuello y la cola como en la Fig. 1B y algunos dominios a los que se une Zn 2+ (mio IX); el de cinasa (Kin, mio III); sitio de homología con la quitino-sintasa (chs, mio XII); sitio similar a anquirina (ank, mio XII). A la mio XIII le falta un sitio (?) que no se ha identificado. (Adaptado de Hodge y Cope, 2000; http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/trees/gifs/tree.jpg)*

LA SUPERFAMILIA DE LAS MIOSINAS

A la fecha se han descrito cerca de 18 clases en la superfamilia de las miosinas que están emparentadas entre sí. Ya que el propósito de este trabajo no incluye un análisis evolutivo, se invita al lector interesado a consultar el trabajo de Hodge y Cope, 2000 [5].

Cuando empezaron a estudiarse, sólo se conocían dos clases de miosinas: la primera clase, o miosina II, que es la miosina clásica o "convencional" con dos cadenas pesadas. La segunda clase o miosina I, se caracteriza por la presencia de solo una cadena pesada. Se ha postulado un ancestro común, que sería parecido en estructura a la de la miosina I [6]. Siguiendo la nomenclatura por el número de cadenas pesadas se asignó como miosina II a la de músculo esquelético, aunque haya sido descubierta primero.

En la actualidad no se sigue esa regla, sino que han sido asignadas con numerales romanos progresivamente según la cronología de su descubrimiento [2] y no hay correlación entre la homología y número de cadenas que posee y el número asignado (Fig. 2).

EL FUNCIONAMIENTO CINÉTICO DE LAS MIOSINAS

La mayor parte del conocimiento del funcionamiento cinético de las miosinas deriva del estudio de la miosina II de músculo esquelético. La miosina es una ATPasa capaz de transducir la energía química del ATP en movimiento valiéndose de modificaciones conformacionales en su estructura.

La miosina se une con alta afinidad a la molécula de actina; ese tipo de unión se produce entre las dos proteínas en la región denominada "puente de rigidez o rigor" (por dar lugar a algo semejante a lo que ocurre durante el "Rigor Mortis", como consecuencia de la falta de ATP). Esta unión permanece así hasta que la miosina se encuentre con una molécula de ATP. La afinidad de la miosina por el ATP es mayor que por la actina, por eso cuando la molécula de miosina se une e hidroliza al ATP se disocia de la actina [3].

Esta hidrólisis ocurre cuando la proteina está disociada de la actina, de tal manera que sólo se encuentran ligados a la miosina el ADP y el fosfato inorgánico, Pi. Esto constituye un complejo ternario *Miosina-ADP-Pi*, por lo que el sitio de alta afinidad para la actina se encuentra libre para unirse a ella, para una nueva interacción actina-miosina.

En esta unión de la miosina con la actina se encuentra una de las estrategias más interesantes de la contracción muscular [7,8]. Resulta que los productos de hidrólisis del ATP en el sitio catalítico de la miosina se quedan unidos fuertemente a la proteína, por lo que permanece en esa conformación. El ardid de la naturaleza está en que la unión de la actina a la miosina provoca una modificación conformacional en ésta que facilita la liberación de los productos. O sea que la actina permite que la miosina pueda liberarse de los productos de la hidrólisis del ATP.

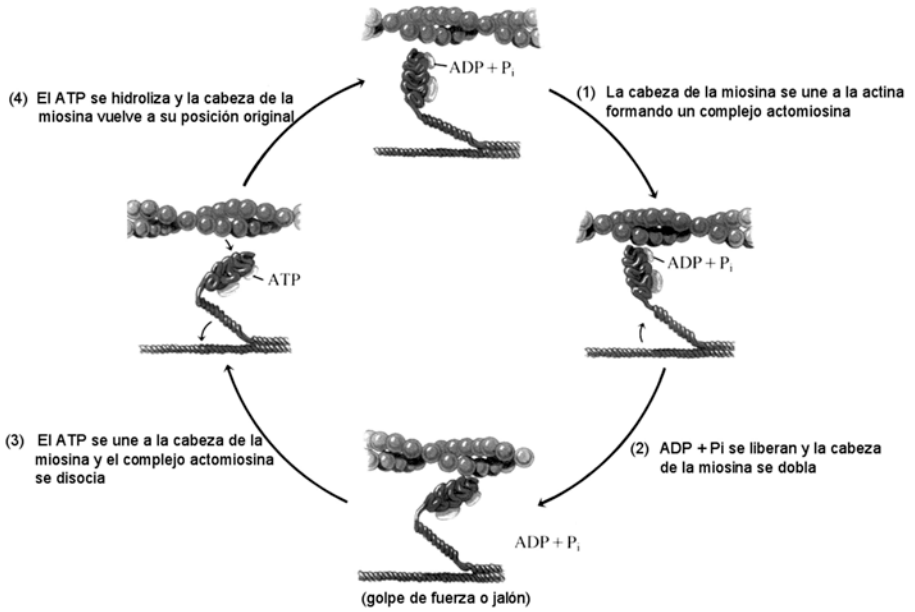


Figura 3. *Representación esquemática del ciclo de formación del complejo de acto-miosina y la hidrólisis de ATP.*
1) La cabeza de la miosina se une a la actina y forman el complejo acto-miosina.
2) Se liberan el ADP y el Pi y la cabeza de la miosina se dobla produciéndose el jalón.
3) El ATP se une a la cabeza de la miosina y el complejo acto-miosina se disocia.
4) El ATP se hidroliza y la cabeza de la miosina vuelve a su posición original. (Modificado de J.D. Rawn "Biochemistry". Niel Patterson Publishers, Burlington, N.C., USA 1989, 1105 pp).

Cuando el Pi sale de la miosina, ésta experimenta un cambio conformacional capaz de generar el "Power Stroke" (movimiento brusco o "jalón"). Es éste el gran responsable del deslizamiento del filamento de actina sobre el de miosina; después de la salida del Pi, el ADP se despega de su sitio.

La miosina entonces se queda con su sitio catalítico desocupado y está ligada a la actina para recomenzar el ciclo. Es necesario hacer notar aquí el doble efecto del ATP en la contracción muscular. El primero es el de relajamiento, en el cual el ATP es el responsable de la disociación de la miosina del filamento de actina. El otro efecto es el de suministrar la energía química necesaria para la contracción [9].

Algunas miosinas como las de la Clase V tienen un mecanismo ligeramente diferente debido a que estas miosinas tienen 2 cabezas pero sólo una de ellas participa en la actividad quedando la otra unida siempre a la actina, de forma alternada. Este hecho hace que el transporte tenga una gran eficiencia, porque la molécula no se suelta nunca del filamento.

Hasta fines de la década de los noventas los datos publicados mostraban que las miosinas eran motores que se movían en el sentido del extremo positivo (+) o de "crecimiento rápido" del filamento de actina. Sin embargo, ultimamente, se ha descrito por lo menos una clase que se mueve en el sentido del extremo negativo (-) o de "crecimiento lento" de polimerización de los monómeros de actina [9,10].

En función de que a la fecha solamente se han purificado las clases I, II y V de la miosina, muchos de los hallazgos de estructura, función y regulación son derivados de esas clases y se han extrapolado a otras miosinas cuya estructura molecular íntima aún se desconoce.

En este trabajo sólo nos referimos a estas tres clases de miosina como ejemplos de su funcionamiento molecular.

LA MIOSINA I

La miosina I fue inicialmente descrita en la amiba *Acanthamoeba* al inicio de la decada de los años setentas y también en el alga *Dictyostelium*. Este tipo de miosina fue la primera en ser llamada "no-convencional" por tener una única cadena pesada y no hacer filamentos. La miosina I posee cadenas ligeras que pueden ser homólogas a la CaM o no.

La capacidad de las miosinas I de interactuar con fosfolípidos ácidos ha sido ampliamente demostrada, por lo que la proteína puede unirse directamente a la membrana sin la participación de otra proteína.

La actividad enzimática de la miosina I de *Acanthamoeba* y *Dictyostelium* es regulada por la fosforilación de su cadena pesada. Esta fosforilación, dependiente de Ca^{2+}, es esencial para la activación inducida por actina de la actividad de ATP hidrolasa.

En la miosina I de las membranas basolaterales epiteliales (brush border membranes, BBM) la presencia de Ca^{2+} provoca la disociación parcial de la CaM y un incremento en la actividad de ATPasa lo que sugiere que la disociación de la CaM producida por Ca^{2+} pudiera ser responsable de un cambio conformacional de la cadena pesada, lo que a su vez regule a la proteína [11]. Sin embargo en otro trabajo, se demostró que cuando se agrega la CaM a las BBM el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de ATPasa no se altera, lo que pone en duda la importancia de la disociación de la CaM sobre la regulación de la miosina [12]. Son necesarios otros estudios para dilucidar esta interesante controversia.

LA MIOSINA II

La miosina II fue la primera proteína de la superfamilia de las miosinas que se describió y se encuentra tanto en el músculo esquelético como en otros tipos musculares y células no musculares. Una característica única de esta miosina es su capacidad de formar filamentos a baja fuerza iónica.

Se trata de un hexámero con dos cadenas pesadas (171 kDa – 241 kDa) y dos pares de cadenas ligeras (15 kDa – 30 kDa) [2]. La nomenclatura actual utiliza la denominación de cadena ligera esencial (ELC, de "essential light chain") y cadena ligera regulatoria (RLC, de "regulatory light chain").

La miosina II no muscular es regulada por Ca^{2+} y por fosforilación pero la del músculo esquelético no presenta esta regulación. En la miosina II de músculo, el estado activado es controlado directamente por la concentración de Ca^{2+} y requiere que este ión se una a la troponina C en el filamento delgado. La remoción de ambas, la ELC y la RLC no conduce al estado activado.

A pesar de poseer solo un sitio catalítico, la miosina II muscular se caracteriza por tener tres distintas actividades de ATP hidrolasas: 1) La Mg^{2+}-ATPasa activada por actina, 2) la ATPasa activada por Ca^{2+} y 3) la activada por K^+ y EDTA; ésta última tiene un paso cinético limitante distinto al de las otras. Se cree que la activada por Ca^{2+} y la activada por K^+ - EDTA necesitan de micro-sitios distintos, con grupos SH reactivos tales como el SH1 (Cys 707) y el SH2 (Cys 697).

LA MIOSINA V

Esta clase de miosina (Brain Myosin V o BM V) fue aislada del cerebro del conejo y fue inicialmente descrita como una proteína con actividad de ATPasa, que une CaM y es dependiente de Ca^{2+}. La alta afinidad por CaM, quedó demostrada en una columna CaM-Sepharosa 4B en presencia de Ca^{2+}, en donde para su elución, se requería añadir EGTA y urea 6M. Por el peso molecular aparente de su cadena pesada, dicha proteína fue llamada p190 [13].

La primera caracterización bioquímica de la BM V demostró que tenía una actividad de ATPasa activada por Ca^{2+} y CaM. Los datos indicaban también que era fosforilada por una cinasa dependiente de CaM (CaM-Kinase II) y que esta fosforilación era bloqueada por la adición de trifluoperazina, un conocido inhibidor de CaM. En ese estudio los autores mostraron que la CaM solamente se une a la cadena pesada de la BM V en presencia de Ca^{2+}. [14]

Actualmente se sabe que la clase V de las miosinas incluye proteínas identificadas en el material genético de insectos, levaduras, algunos roedores y también en el humano, pero solamente la BMV de vertebrados ha sido purificada.

La BMV purificada a partir de encéfalo de pollo es una proteína compleja que contiene dos cadenas pesadas a las que se asocia CaM y otros tipos de cadenas ligeras [13].

La estructura primaria de la BMV presenta una alta homología con las otras proteínas de la clase V y una menor homología con la miosina II. Por ejemplo un residuo característico de la cabeza de la miosina II, que es el SH2 (Cys 697) no existe en la BMV.

En el cuello de la BMV están localizados los sitios consenso para la unión de cadenas ligeras; inicialmente se creía que podrían unirse hasta seis pares de cadenas ligeras; cuatro CaM (16.8 kDa), una cadena ligera de 23 kDa y una de 17 kDa [13]. Actualmente se postula que para cada cadena pesada de BMV se encuentran asociadas de cuatro a cinco CaM, una cadena ligera de 23 kDa que es esencialmente idéntica a la cadena ligera de músculo liso y una cadena ligera de 17 kDa similar a la de miosina II no muscular.

La cola de la BMV es una región globular a la que se asocia una cadena ligera de 10 kDa que presenta una

alta homología (80-100%) con la cadena ligera de dineína. La dineína es una proteína con funciones de motor molecular que se asocia a microtúbulos en vez de asociarse a actina. Es posible que esta semejanza estructural permita a la BMV interactuar no sólo con filamentos de actina sino también con los de tubulina en su tarea de acarrear componentes intracelulares Datos obtenidos por Prekeris [15] indicaron que la cola es responsable de la unión de la BMV a vesículas sinápticas y se regula por Ca^{2+} y proteína cinasa C.

Cheney y su grupo [16] describieron que agregando Ca^{2+} micromolar a la BMV se observaba un incremento de cerca de 7 veces en la actividad de ATPasa dependiente de Mg^{++} y de actina, que a su vez aumenta un 50% en presencia de CaM.

Este dato sugiere que la BMV tiene asociada a la CaM, la cual se pierde durante la purificación. Estas propiedades de la BMV fueron estudiadas por Nascimiento y colaboradores [17] quienes demostraron también una dependencia de Ca^{2+} del orden micromolar, ya que se activaba hasta 12 veces en presencia de 3 μM de Ca^{2+}. La curva de activación con un coeficiente de Hill muy alto (n=13) sugiere una gran cooperactividad del efecto del Ca^{2+} en la activación de la proteína. En ese mismo trabajo, utilizando técnicas de proteólisis controlada, se describió que cuando la BMV se escindía a la altura del cuello, ésta perdía la regulación por Ca^{2+}, y quedaba sin efecto cuando la CaM se disociaba. Estos datos sugieren que el mecanismo de activación de la actividad de ATPasa de la BMV por Ca^{2+}, parece estar mediado por la unión de CaM a la proteína.

Para corroborar estos hallazgos, se han utilizado algunos ensayos de motilidad *en vitro*, basándose en la habilidad de la miosina de promover la disociación de los filamentos de actina por hidrólisis de ATP. Entre ellos, está el de Wolenski y colaboradoes [11] quienes mostraron que la motilidad de la BMV en presencia de EGTA, disminuía hasta 10 veces, utilizando una técnica muy ingeniosa, en la que se retira el citoplasma del alga *Nitella* manteniendo sólo el citoesqueleto; en estas condiciones los autores mostraron una velocidad de deslizamiento de los filamentos de actina de 29.3 ± 15.2 nm/seg mientras que si lo hacen a través de un soporte conteniendo miosina anclada, la velocidad se incrementó unas diez veces.

Cuando este mismo ensayo se realiza a concentraciones de Ca^{2+} similares a las usadas in vitro para activar a la ATPasa dependiente de actina, la motilidad se inhibe. Esta diferencia entre los hallazgos in vitro con la enzima purificada y en este modelo experimental nos sugiere que en la miosina anclada la activación po Ca-CaM es más compleja de lo que se había pensado y se realiza por intermedio de otra proteína moduladora diferente a la CaM.

La participación de la BMV en la función cerebral se adivina por su unión a vesículas sinápticas, lo que sugirió y posteriormente fue comprobado, que esta proteína podría estar involucrada en el transporte de esas vesículas.

Asimismo, la eliminación del gen *dilute*, que codifica para una proteína homóloga a la BMV, produce un ratón que al nacer presenta convulsiones y muere en las siguientes tres o cuatro semanas. Este gen defectuoso fue descubierto en ratones apigmentados en los que las melanosomas no se transferían a los queratinocitos, comprobando su importancia en el transporte de estos organelos [18].

Por otro lado, la BMV también fue encontrada por imunocitoquímica en los cuerpos celulares y conos de crecimiento de neuronas del hipocampo y en astrocitos cerebelares de la rata, colocalizando parcialmente con actina [17]. Wang et al. (1996) demostraron que la BMV es esencial para los movimientos de extensión de los conos de crecimiento en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pollo, pero no para la retracción de los *filopodia* (protuberancia en forma de dedo que forma la actina en dirección del eje mayor) [19] y también se sintetiza localmente después de daño neuronal [20] lo que sugiere que la BMV juega un papel muy importante en la neuroplasticidad.

CONCLUSIONES

La necesidad de acarrear diversos componentes de un lado a otro del citoplasma o de desplazarse a otro sitio, indujo en la célula la aparición de motores moleculares con funciones específicas y bien reguladas, la superfamilia de las miosinas. Valiéndose de un dominio motor que está evolutivamente bien conservado la miosina es capaz de transducir la energía química del ATP en movimiento. Para evitar el desperdicio de energía y su mejor utilización, el dominio cuello fue seleccionado tanto para la regulación como para la confección de una palanca molecular que otorgara a la proteína más velocidad o fuerza. Finalmente, estas proteínas han evolucionado incluyendo en su estructura diversos dominios que permiten que este motor molecular ejecute diferentes acciones como son el transporte de compuestos o vesículas a lo largo de un filamento o el dislocamiento de éste sobre un punto fijo en la membrana. Por todos esos atributos moleculares la miosina se constituye en una importante máquina para la ejecución de trabajo dentro de la célula.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Fernando Oropeza y a la I.Q. Gabriela Martínez por su apoyo computacional en la confección de las figuras y el texto, respectivamente, y al donativo 38952-M de CONACyT (México) a G.M.R.

REFERENCIAS

1. Reyes-Reyes, M, Rosales, c. Hernández, R y López Villaseñor, I. (2001) Mecanismos que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina BEB (Méx) *20*:175-183.

2. Sellers JR, Goodson HV (1995) Motor proteins 2: myosin. Prot. Profile *2*:1323-1423.

3. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R. Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. Science *261*:58-65.

4. Mooseker MS. (1994) Bement WM Molecular motors. Keepingout the rain Nature *365*:785-786.

5. Hodge T, Cope MJTV (2000) A Myosin Family Tree. J. Cell Sci *113*:3353-3354.

6. Pollard TD, Doberstein SD, Zot HG (1991) Myosin-I. Annual Review Physiol. *53*:633-681.

7. Szent-Györgi, A. (1951) in Chemistry of Muscular Contraction pp. 31-37, Academic Press, New York.

8. Goldman YE, Brenner B (1987) Special Topic: Molecular Mechanism of Muscle Contraction: General Introduction. Annual Review Physiol. *49*:637-654.

9. Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, CarragherBO, Milligan RA, Sweeney HL. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. Nature *401*:505-508.

10. Rodriguez OC, Cheney RE (2000) A new direction for myosin. Trends Cell Biol *10*:307-311.

11. Wolenski JS, Cheney RE, Toscher P., Mooseker MS (1993). In vitro motilities of the un conventional myosins brush-border myosin I and chick brain myosin V exhibit assay-dependent differences in velocity. J Exp 2001 *267*: 33-39.

12. Wolenski JS, Hayden SM, Forscher P, Mooseker MS (1993) Calcium-calmodulin and regulation of brush-border myosin-I MgATPase and mechanochemistry J Cell Biol. *122*:613-621.

13. Larson RE, Pitta DE, Ferro JA A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. (1988) Braz. J Med Biol Res. *21*:213-217.

14. Larson R.E., Espíndola FS, Espreafico EM (1990). Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. J Neurochem *54*: 1288-1294.

15. Prekeris R, Terrian DM. (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca2+-dependent interaction with the synaptobrevin- synaptophysin complex. J Cell Biol *137*:1589-1601.

16. Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. Cell *75*:13-23.

17. Nascimento AAC, Cheney RE, Tauhata SBF, Larson RE, Mooseker MS (1996) Enzymatic Characterization and Functional Domain Mapping of Brain Myosin-V. J Biol Chem *271*:17561-17569.

18. Silvers, W.K. (1979) in The coat colors of mice – A model for mammalian gene action and interaction (Silvers, W.K., ed) pp. 83-108, Springer-Verlag, New York.

19. Wang F, Wolenski JS, Cheney RE, Mooseker MS, Jay DG (1996) Function of Myosin-V in filopodial Extension of Neuronal Growth Cone. Science 273:660-663.

20. Calliari A, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun A, Sotelo-Silveira J, Vence J. and Sotelo, JR. (2002). Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. Cell Motility and Cytoskel 51:169-176.

REB *22* (2): 60-66

Las Miosinas en el Movimiento Celular II. Distribución e Implicaciones Funcionales*

Graciela Meza Ruiz.

RESUMEN

Datos obtenidos con técnicas bioquímicas, genéticas y citológicas han asociado a miembros de la super familia de motores moleculares de miosina que interactúan con actina, con una variedad de funciones celulares incluyendo el tráfico de membranas, los movimientos celulares o la transducción de señales. La importancia de las miosinas reside en que se han identificado mutaciones en las que sus genes estructurales se asocian a diversas patologías, lo que subraya su participación en la función normal celular.

PALABRAS CLAVE: Miosinas, motores moleculares, movimientos celulares, tráfico de membranas, transducción de señales.

ABSTRACT

Biochemical, genetic and cytolocalization findings have associated the superfamily of myosin molecular motors of myosin interacting with actin with numerous cellular functions including membrane traffic, cellular movements and cell signal transduction. The importance of these myosins lies in that their structural gene mutations have been related to a number of pathologies.

KEY WORDS: Myosins, molecular motors, cellular movements, membrane traffic, signal transduction

INTRODUCCIÓN

En el trabajo que acompaña al presente se mencionó la existencia de una gran super familia de miosinas que comparten propiedades estructurales con la miosina II o muscular, pero cuya distribución es fundamentalmente no muscular [1].

En todos los casos, para ejercer su función la miosina se asocia a fibras de actina desplazándose a lo largo de ella. En los dominios motores de las miosinas, la fuerza motriz se genera por la hidrólisis de ATP [1]. La nomenclatura convencional agrupa a las miosinas en clases identificadas con números romanos y a los subtipos con números arábigos y letras (Tablas I y II).

Aunque la clasificación está definida por diferencias en la estructura de la cabeza, los dominios que constituyen la cola o cauda son también características de una clase dada de miosina. La composición de la cola de un subconjunto de miosinas puede llevar a predecir la presencia de estructuras que pueden formar α- hélices, sugiriendo que estas miosinas, como en el caso de la M2, tienen dos cabezas, mientras que otras pueden ser de una sola cabeza, como la M1. Algunas miosinas contienen en su cauda motivos estructurales encontrados en otras proteínas. Aunque la función de estos dominios no se conoce con certeza, se supone que la cola dirige la interacción de una miosina dada con su entorno molecular.

En esta revisión se describirá la evidencia reciente con respecto a la ubicación celular de las miosinas, en especial las llamadas miosinas "no convencionales" y de acuerdo a ello, las funciones para las cuales han sido postuladas.

UBICUIDAD DE LAS MIOSINAS

Algunos tipos de miosina muestran una amplia distribución filogenética, mientras que otros han sido identificados en un solo organismo. Las levaduras que presentan gemación tienen solo cinco genes que codifican para miosinas del tipo I, II y V mientras que en ratones han sido identificados hasta 26 genes que codifican para 7 clases distintas de miosinas

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

[1]Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM,. Apartado Postal 70-253, 04510 México, D.F.
Correo E: gmeza@ifisiol.unam.mx

[2]. Es más, dentro de un solo tipo celular de vertebrado, se ha descrito la expresión de por lo menos una docena de miosinas [3], sugiriendo que éstas puedan participar en una amplia gama de funciones de proteínas motrices asociadas a actina dentro de la célula (Tabla I).

Tabla I

Posibles funciones de miosinas no convencionales y organismos donde se han encontrado

Función postulada	Organismo	Miosina Implicada y clase a la que pertenece	
Crecimiento celular	Dictyostelium	myo A, B, C	I
	Levadura	Myo3p, 5p	I
Desarrollo	Aspergillus	MYOA	I
Movimiento celular	Dictyostelium	Myo A, B	I
Transporte de RNA	Levadura	Myo4p	V
Movimiento	Cerebro del pollo	M5a	V
de Partículas	Ratón	Proteína dilute	V
u	Levadura	Myo2p	V
Organelos	Drosophila	95F	VI
Localización de quitina	Levadura	Myo2p	V
Herencia vacuolar	Levadura	Myo2p	V
	Dictyostelium	Myo A,B,C,D,	I
Endocitosis	Levadura	Myo3p, 5p	I
	Dictyostelium	Myo A, B	I
Exocitosis	Levadura	Myo3p, 5p	I
	Aspergillus	MYOA	I

MIOSINAS INVOLUCRADAS EN EL TRÁFICO DE MEMBRANA Y MOVIMIENTOS DE LOS ORGANELOS

Los ejemplos más sobresalientes de miosinas dependientes de actina involucradas en movimientos de organelos ocurren en las plantas. Esto incluye el sorprendente flujo citoplásmico observado en algunas especies de algas y el que ocurre en los estambres y en tubos de polen en los que existe un sistema de acto-miosina implicado en el transporte unitario del germen masculino [4]. Aunque ya hay varios genes de miosina clonados en las plantas, las miosinas específicas implicadas en estos fenómenos, permanecen sin identificar. Los anticuerpos heterólogos producidos contra varias miosinas reaccionan con pequeñas partículas y organelos en tubos de polen de *Lilium longiflorum;* en éste se purificó una miosina morfológicamente similar a la M5 de vertebrados [4].

La evidencia directa que implique a miosinas específicas en movimientos de organelos es escasa. La miosina 95F (clase VI) ha sido involucrada en funciones de transporte muy tempranamente en la embriogénesis de Drosophila [5].

En conos de crecimiento neuronales, la M5a está asociada con las terminales nerviosas y con pequeños organelos que colocalizan con microtúbulos [6]. Que la M5a participa en movimientos de vesículas sinápticas, se sugiere por la demostración que esta miosina está presente en vesículas sinápticas purificadas [7]. La M5a participa en el movimiento de retículo endoplásmico liso (SER) en neuronas y en gránulos de pigmento en medanocitos. En los ratones o ratas con la mutación "diluída" el SER no se extiende hacia las dendritas de células de Purkinje, lo que puede resultar en una alteración en la regulación intracelular de Ca^{2+} y la aparición de convulsiones [8]. También se ha implicado a la M5a en la extensión de las *filopodias* de los conos de crecimiento axonal [9].

En la mutación "dilute" también se presenta una pigmentación anormal como resultado de defectos en la transferencia de gránulos de pigmento en los procesos dendríticos de los melanocitos hacia los queratinocitos de la raíz capilar, en donde se acumulan en la región perinuclear de los melanocitos. Con estudios de inmunofluorescencia se ha encontrado que la M5 se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico de los melanosomas [10].

IMPLICACIONES DE LAS MIOSINAS CLASE I EN LA ENDO Y EXOCITOSIS, EN EL TRÁFICO DE MEMBRANAS Y EN EL MOVIMIENTO CELULAR

Estudios recientes sugieren que las miosinas I (M1) participan en el tráfico membranal de partículas endo y exocíticas. Las M1 son de una sola cabeza y poseen una cola de longitud variable. Mucho de nuestro conocimiento de las propiedades bioquímicas y funcionales de estas miosinas se derivan de estudios de las *algas Dictyostelium*. En estos organismos, se expresan múltiples tipos de M1 y en estudios genéticos se ha demostrado que estas miosinas pueden actuar en conjunto o tener funciones superpuestas. Por ejemplo, dos formas de endocitosis como son la macropinocitosis y la fagocitosis se dañan en células que no expresan a las M1 [11].

Igualmente en levaduras, la supresión de una de las M1 resulta en un defecto en la endocitosis mediada por receptores, mientras que la supresión de ambas daña la pinocitosis [12]. Poco se sabe en vertebrados sobre el papel de estas M1 en la endocitosis, aunque la localización de M1 en macrófagos sugiere una participación en este fenómeno [13].

La clase I de miosinas también está implicada en el transporte o la regulación de la exocitosis. En *Dictyos-*

telium, tanto la Myo A como la Myo B pueden participar en la secreción de enzimas lisosomales. Las mismas estrategias para implicar a la M1 se usaron en la trayectoria endocítica de vesículas en *Dictyostelium*, y también revelan un papel para M1 en la locomoción de este organismo. Las células que no expresan myoA o myoB muestran defectos en la extensión de sus psendópodos [14], por lo que ambas parecen necesarias en los movimientos de los pseudópodos hacia el sustrato.

Los ejemplos anteriormente descritos proporcionan clara evidencia que implica a las miosinas en un sinnúmero de fenómenos membranales, incluyendo movimientos de organelos y movimiento celular; sin embargo, el mecanismo fundamental permanece en gran parte desconocido.

LA M5A Y EL SISTEMA INMUNE

Además de las posibles implicaciones funcionales de la miosina V descritas anteriormente, la M5a puede tener también funciones esenciales en células del sistema inmune. Estudios recientes han identificado mutaciones en M5a en la enfermedad humana de Griscelli. En este padecimiento, similar a lo que ocurre en ratones con la mutación "diluida", pacientes con la enfermedad de Griscelli tienen albinismo parcial y una serie de defectos neurológicos, además de mostrar defectos inmunológicos incluyendo hipogammaglobulinemia y producción deficiente de anticuerpos [15].

LAS MIOSINAS Y LA FUNCIÓN SENSORIAL

Las miosinas son esenciales en el funcionamiento de células receptoras de sistemas sensoriales, como las de la visión o las del oído, incluyendo en éste las que tienen que ver con el equilibrio o la audición. Una de las miosinas más divergentes conocidas y que juega un papel en la función sensorial, es la miosina clase III, codificada en Drosophila por el gen de nina C. Las proteínas *Nina* C son rarísimas, porque contienen una región de cinasa en la parte del NH_2-terminal del dominio motriz [16]; mutantes del gen *Nina C* en estas moscas presentan 2 fenotipos con aberraciones electrofisiológicas en la fototransducción y exhiben una degeneración de los fotorreceptores conforme avanza la edad y la exposición a la luz.

El gen *nina C* codifica para dos isoformas alternativas de la proteína, la p174 y la p132. La miosina y los dominios de la cinasa de miosina en la isoforma p174 tienen funciones diferenciables. La supresión del dominio de cinasa produce defectos en la respuesta electrofisiológica a la luz y la del dominio de miosinas resulta en una degeneración retiniana y pérdida de localización de la p174 en las microvellosidades de los rhabdomeros (sitio de fototransducción en los Artrópodos) (Fig. 1). La expresión del dominio de cinasa fosforila a varios sustratos, incluyendo la p132; sin embargo, la actividad de cinasa que se expresa por M3 endógena se desconoce. Las dos isoformas se unen a cadenas ligeras de calmodulina y la localización de ésta es dependiente en estas proteínas; además, una mutación de la nina C que se une a calmodulina da como resultado una fotorrespuesta anormal. La estructura de los microvellos de los rhabdomeros se daña en ausencia de p174 y en mutantes de la región de unión de la calmodulina. Estos resultados sugieren que se requiere la M3 para la localización de calmodulina y de M3 cinasa en el fotorreceptor, sin las cuales la fototransducción normal no puede ocurrir. Además, el dominio de miosina de M3 es importante en la integridad estructural del rhabdomero. Aunque la pérdida de p132 de la nina C no afecta la fotorespuesta o la integridad del rhabdomero, estudios ultraestructurales sugieren que la p132 parece funcionar en el transporte de membrana de la célula fotorreceptora. En ésta, hay un continuo recambio de la membrana de sus microvellos, una pérdida en p132 produce una acumulación de cuerpos multivesiculares en el citoplasma, lo que sugiere que la p132 participa en el recambio de la membrana fotorreceptora.

En cuanto a la audición, recientemente se han relacionado las modificaciones de los genes para las clases VI y VII de miosinas con la sordera [2], aunque la expresión de ambas M6 y M7a no está limitada a las células y tejidos afectados [17]. M6 es producto del gen Waltzer Snell en el ratón, en el cual los epitelios neurosensoriales coclear y vestibular degeneran rápidamente un poco después del nacimiento [18]. Según experimentos de inmunofluorescencia, la M6 se concentra en las células pilosas del oído interno. Las células sensoriales son ricas en actina y como son células mecanoreceptoras se espera que contengan moléculas asociadas al movimiento. Así, la M6 se encuentra concentrada en la lámina rica en actina presente en la placa cuticular, estructura que ancla la base de los pelos sensorios al citoplasma, y también a lo largo de los filamentos de actina que recorren al esterocilio hasta que se ancla en la placa cuticular (Fig. 1). Estos hallazgos sugieren que la M6 puede jugar un papel muy importante en la estabilización de la unión basal de los estereocilios confiriéndole una resistencia a la dislocación mecánica. La M6 humana ha sido recientemente clonada [19], sin embargo, su papel en la sordera no ha sido aún verificado.

Al contrario de lo que sucede con la M6, en las miosinas de la clase VII, las mutaciones en la M7a cursan con sordera tanto en humanos como en roedores. Así, las mutaciones en

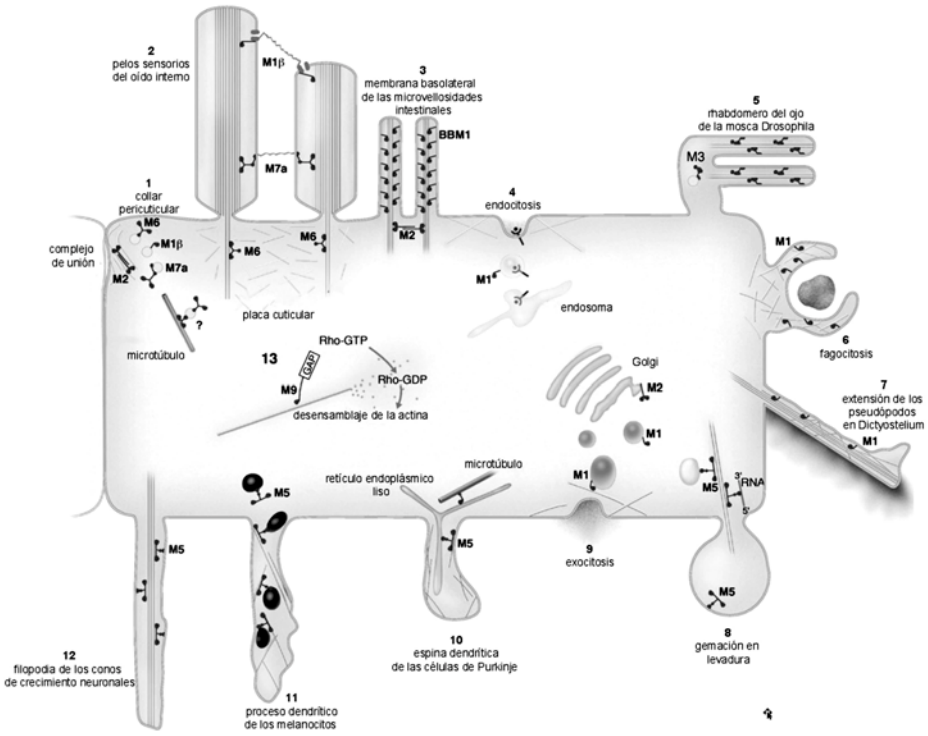


Figura 1. *En este esquema de una célula hipotética se muestra la localización celular de las miosinas y las posibles funciones en las que pueden estar implicadas. Las M1B, M6 y M7 existen en la base del lazo pericuticular, una estructura entre la banda cuticular rica en actina y la actina circunferencial asociada con el complejo funcional en células pilosas del oído interno (1). M1B se muestra como motor de adaptación de los estereocilios de estas células (2), en el que M6 y M7 amplían o estabilizan a estos. El borde de la escobilla de M1 une el centro de las microvellosidades de la membrana plasmática intestinal. (3). La M2 está en la red terminal (3) y puede servir para él entre cruzamiento con actina. Las M1 puede auxiliar a la endocitosis (4) en levadura, en Dictyostelium, y células de vertebrados, NinaC (M3) se requiere para la integridad del rhabdomero (5) y la fototransducción en el ojo de Drosophila. La M1 juegan un papel en la fagocitosis en macrófagos (6) en Dictyostelium y detiene la extensión de pseudópodos (7). En levadura, las M5 pueden mantener el transporte de RNA (8) la M2 puede auxiliar el transporte de la vesícula desde el Golgi (9); la M1 puede participar en fenómenos de secreción en la levadura y en la exocitosis en Dictyostelium (9). La M5 puede transportar vesículas del retículo endoplásmico (ER) a las espinas dendríticas de células de Purkinje (10); también puede transportar melanosomas a través de procesos dendríticos de melanocitos (11) y también puede auxiliar la extensión de los filopodios del cono de crecimiento axónico (12). La M9b es un rhoGAP, el cual inactiva a la rho y modula posiblemente la organización de la actina (13). Estas estructuras no se muestran a escala. (Modificada de Mermall y Asoc., 1998 Science 279:527-533, con permiso expreso de la revista).*

los genes de la M7a son responsables de la mutación shaker-1 en el ratón y en humanos constituye el síndrome de Usher tipo 1B, produce sordera no-sindrómica recesiva (DFNB2) y también la sordera dominante autosómica no-sindrómica en humanos. En Shaker-1, así como el waltzer Snell, los ratones son sordos y también tienen defectos vestibulares. En órganos auditivos y vestibulares, la M7a está concentrada tanto en el cuerpo celular de las células sensoriales como en los pelos sensoriales. En las células pilosas del sáculo de la rana, la M7a está concentrada en los enlaces basales que unen a los estereocilios, pero en mamíferos está en los enlaces de la parte apical de éstos (Fig. 1). Estos datos y los de la degeneración de células pilosas en shaker-1 en ratones sugieren que la M7a es importante para la integridad de los pelos sensorios en las células sensoriales vestibulo-auditivas [2].

En contraste con el Shaker-1 de ratones, los pacientes con síndrome de Usher son ciegos a causa de retinitis pigmentosa. La M7a se expresa tanto en el epitelio pigmentado (EP) como en las células fotorreceptoras. La M7a puede jugar un papel importante en la fagocitosis de los discos de membrana de los fotorreceptores por el EP. La M7 puede asociarse con vesículas sinápticas en los fotorreceptores o mantener una barrera de difusión entre los segmentos externos y los internos de estos [20].

Algunas miosinas pueden participar más directamente en la transducción sensorial. Así, la transducción auditiva y la vestibular son dependientes de la acción de un canal sensible a cationes con una compuerta mecánica que es adaptada o modulada para mantener la sensibilidad a cambios en el estímulo mecánico. Este proceso de adaptación puede ser facilitado por un motor de miosina que reestablece la relajación de la tensión basal. La M1β es probablemente este motor de adaptación que se localiza en la parte apical de los pelos sensorios. Esta acción es bloqueada por los antagonistas de calmodulina debido a que la M1β contiene cadenas ligeras de calmodulina y es regulada por Ca^2 [21]. Ésta es una característica común de las miosinas no convencionales hasta ahora caracterizadas en vertebrados.

Además de la localización descrita arriba, las miosinas M1β, M6 y M7 todas se encuentran en el collar pericuticular, una estructura encontrada entre la placa cuticular rica en actina de las células sensoriales y al derredor de la banda de actina asociada con el complejo de unión entre la célula sensorial y la de soporte [2] (Fig. 1). Esta estructura es rica en vesículas membranosas que rodea a los

microtúbulos y puede representar una zona de transición en el transporte mediado por microtúbulos y el mediado por actina. El lazo pericuticular puede servir como un depósito de miosina, o las miosinas pueden interconectar circunferencialmente a la banda de actina localizada en la placa cuticular [2].

Prácticamente todas las miosinas de las clases I, III, VI, y VII tienen un papel muy importante en la función sensorial, (Tabla II). La M3 y la M7 se requieren para la visión, mientras que las M6 y M7, y quizás la M1 son necesarias para la audición. Estos estudios han sugerido que las miosinas no sólo participan en el acarreo de iones, sino que pueden actuar como reguladores de los canales iónicos y asociarse con otras moléculas importantes en la célula incluyendo la calmodulina.

Tabla II

Implicaciones de las miosinas no convencionales en la función sensorial, en la diferenciación y en la transducción de señales.

Función postulada	Organismo	Miosina Implicada y clase a la que pertenece	
Tráfico de la membrana	Drosophila	nina C,	III
Fotorreceptora	Humanos	M7a,	VII
Fototransducción e Integridad Rhabdomérica	Drosophila	nina C,	III
Estabilización o anclaje de los esterocilios de las células auditivas	Ratón waltzer de Snell y humanos	M7a,	VII
Adaptación de célula pilosa Sensorial	Rana	M1b,	I
Diferenciación en leucocitos	Humanos	M9b,	IX
Transducción de señales	Humanos	M9a, b,	IX
	Rata	myr5,	IX

LAS MIOSINAS Y LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Con excepción del papel de *ninaC* en la fototransducción, poco se sabe acerca de la participación de las miosinas en la transducción de señales celulares. Sin embargo, tal participación se anticipa para algunas de ellas dada la presencia de dominios implicados en la regulación enzimática o como efectores de interacciones proteína-proteína en un sinnúmero de cascadas de señales.

La clase IX de miosinas de humanos (M9b) y de rata (myr5) se han postulado como miosinas de una sola cabeza que contienen un dominio de proteína activada por GTPasa (GAP) asociada a sus caudas, que estimula la actividad intrínseca de la subunidad rho de la GTPasa apresurando la conversión del estado rho – GTP (guanosina trifosfato)al inactivo rho - GDP (guanosina difosfato) [22]. La M9b es un motor activo, aunque es uno de los más lentos de miosinas caracterizados a la fecha con velocidad de 15 nm/s. La familia de proteínas que unen a GTP ha sido implicada en la regulación de los procesos de motilidad asociados a actina [23]. En la célula, la M9b puede servir para inactivar a rho, lo que permite que ocurra la reestructuración de la actina.

La sobreexpresión de M9b en células NRK y HeLa provoca que las células pierdan su forma y desaparezcan los filamentos de actina y los contactos celulares. La expresión de M9b ha sido también examinada en células que expresan M9b endógenamente. Durante la diferenciación inducida de células HL-60 (células parecidas a los macrófagos) la expresión de M9b está sobrerregulada y se reubica en el citoplasma, donde se concentra en la región perinuclear [24]. Sería interesante determinar si se requiere la M9b para una remodelación exhaustiva del citoesqueleto de actina que acompaña esta diferenciación.

En algunos tipos de amibas, la cadena pesada de la MI con actividad de cinasa la asocia a la familia de proteínas rho transductoras de señales. En ellas, el dominio motriz de las miosinas clase I es activado al máximo por fosforilación de una serina o una treonina dentro del sitio de unión de actina, o sitio TEDS [25]. En *Acanthamoeba y Dictyostelium* la M1HCK comparte una secuencia parecida a la cinasa activada por p21, familia de proteínas de mamíferos y de levadura, que es activada por cdc42 y rac y la PAK1 fosforila y activa a la M1 de *Acanthamoeba* como lo hace la M1HCK [25]. De manera similar, la rac 1 incrementa la autofosforilación de la M1HCK de *Dictyostelium*, lo que a su vez aumenta la actividad de cinasa de M1D en este organismo [26]. Lo que está por verse es si las miosinas que tienen una serina o una treonina fosforilables en el sitio TEDS son también reguladas por fosforilación y son sustratos para la familia PAK/STE20 de cinasas. En fibroblastos de ratón, la microinyección de PAK1 activada induce formación de filopodia y también de pliegues en la membrana, sugiriendo que ésta regula la organización del citoesqueleto de actina.

En el dominio src (SH3) de las miosinas tipo I de algunos tipos de amibas existe una homología con la miosina M4, lo que media las interacciones proteína-proteína en la casca-

da de transducción de señales, probablemente por unirse a regiones estructurales ricas en prolina (PXXP) [27]. La M1HCK de *Dictyostelium* tiene regiones con múltiples secuencias de prolina, por lo que sería interesante saber si éstas facilitan la unión al dominio SH3 de la M1. Recientemente, una proteína de *Acanthamoeba* (la Acan 125) se encontró asociada al dominio SH3 de la MIC con la que colocaliza en varios organelos. Se desconoce si esta proteína se une al dominio SH3 de otras miosinas. Cuando se estudiaron los efectos de la sobreexpresión de la MyoB de *Dictyostelium* (una M1 que contiene un dominio SH3 y un residuo fosforilable) se sugirió que ambos sitios son cruciales para la función de M1.

Las miosinas clase I y la IX son los candidatos más fuertes implicados en la transducción de señales mediadas por rho. Otras miosinas como la M10 de bovino contienen regiones estructurales de transducción de señales, pero no se sabe si estos dominios son funcionales.

CONCLUSIONES

En la actualidad se tienen descritas un buen número de miosinas y las células que las contienen. Sin embargo, los mecanismos íntimos de cómo transducen fuerza mecánica y participan en las funciones celulares no se entiende aún. Aunque los análisis mutacionales y bioquímicos han situado algunas miosinas dentro de una función específica, la mayoría de las miosinas todavía no se caracterizan estructural o bioquímicamente. Hasta que no se efectúen dichos estudios, no puede decirse con certeza si se trata de un motor molecular real y funciona igual que la de músculo o no. Estos estudios podrían también conducir a entender las propiedades singulares de unir actina o los cambios estructurales que induce el ATP. Asimismo, se podrá entender la regulación exquisita de las diversas partes que conforman a las miosinas. Finalmente es importante evaluar correctamente la función de las miosinas en el contexto de la integridad de un organismo lo que nos llevará a comprender cómo es que existen tantos y tan variados tipos de miosinas que difieren muy poco en su estructura química.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Fernando Oropeza y a la I.Q. Gabriela Martínez por su apoyo computacional en la confección de la figura y el texto, respectivamente, y al CONACyT (México) Donativo 38952M.

REFERENCIAS

1. Cameron L C, Machado M y Meza G (2003).Las miosinas en el movimiento celular I. Estructura y propiedades cinéticas. Rev. Ed. Bioq. 22(2): 53-59

2. Hasson T (1997). Uncoventional myosins, the basis of deafness in mouse and man. Am J Hum Genet *61*:801-805.

3. Bement WM, Hasson JA, Wirth RE, Cheney MS y Mooseker MS (1994).Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. Proc Natl Acad Sci USA *91*:6549.

4. Miller DD, Scordilid SP y Hepler PK (1995). Identification and localization of three classes of myosins in pollen tube of Lilium longiflorum J Cell Sci *108*:2549-2563.

5. Mermall V. Mc Nally JG y Miller KG (1994).Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living Drosophila embryos. Nature *369*:560-562.

6. Evans LL, Hammer J y Bridgman PC (1997). Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons J Cell Sci *110*:439-449.

7. Prekeris R y Terrian DM (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca 2+-dependent interaction. J Cell Biol *137*:1589-1601.

8. Dekker-Ohno K, Haysaka S, Takagishi Y, Oda S, Wakasugi N, Mikoshiba K, Inouye M y Yamamura H (1996).Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. Brain Res *714*:226-230.

9. Wang FS, Wolenski JS, Cheney RE, Mouseker MS y Jay DG (1996).Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones. Science *273*:660-663.

10. Provance DW Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA (1996).Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. Proc Natl Acad Sci USA *93*:14554-14558.

11. Jung G, Wu X, Hammer JA 3rd (1996).Dictyostelium mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reval combinations of shared and distinct functions. J Cell Biol *133*:305-323.

12. Geli MI, Riezman H (1996).Role of type I myosins in receptor-mediated endocitosis in yeast Science *272*:533-535.

13. Allen LA H, Anderem A (1996).Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and FC-receptor-mediated phagocytosis. J Exp Med *184*:627-637.

14. Wessels D, titus M, Soll Dr (1996). A Dictyostelium myosinI plays a crucial role in regulating the frecuency of pseudopods formed in the substratum. Cell Motil Cytoskeleton *33*:64-79

15. Griscelli C, Durandy A, Guy-Grand D, Daguillard F, Herzog G, Prunieras M (1978).A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency Am J Med *65*:691-702.

16. Montell C, Rubin GM (1988).The Drosophila nina C locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin head heavy chain Cell *52*:757-772.

17. Hasson, T, Walsh J, Cable J, Mooseker MS, Brown SD, Steel KP (1997). Effects of shaker-1 mutations on myosin-VII a protein and mRNA expression. Cell Motil Cytoskeleton *37*:127-138.

18. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Rusell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jekins NA (1995).The mouse Snell's waltzer deafness gene encondes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. Nat Genet *11*:369-375.

19. Avraham KB, Hasson T, Sobe T, Balsara B, Testa JR, Skvorak AB, Morton CC, Copeland NG Jenkins NA (1997). Characterization of unconventional M6 the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice Hum Mol Genet *6*:1225-1231.

20. Liu X, Vansant G, Udovichenko IP, Wolfrum U, Williams DS (1997). Myosin VII a, the product of the Usher IB syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. Cell Motil Cytoskeleton *37*:240-252.

21. Metcalf AB, Chelliah Y, Hudspeth AJ, (1994). Molecular cloning of a myosin I beta isoenzyme that may mediate adaptation by hair cells. Proc Nat Acad Sci USA *91*:11821-11825.

22. Post PL, Bokoch GM, Mooseker MS (1998). Human myosin-IX b is a mechanochemically active motor and a GAP for rho. J Cell Sci *111*:2055-2066.

23. Hall A (1998). Rho GTPases and the actin skeleton Science *279*:509-514.

24. Mermall V, Post PH., Mooseker MS (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. Science *279*:527-533.

25. Xu P, Zot AS, Zot HG (1995). Identification of Acan 125 as a myosin –I binding protein present with myosin-I on cellular organelles of Acanthamoeba. J Biol Chem *270*:25316-25319.

26. Lee SF, Egelhoff TT, Mahasneh P. Cote GP (1996). Cloning and characterization of a Dictyostelium myosin I heavy chain kinase activated by Cdc 42 and Rac. J Biol Chem *271*:27044-27048.

27. Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3 – ligand interactions Science *266*: 1241-1247.

RECEPTORES TOLL Y MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN EN LA INMUNIDAD INNATA*

CIELO RUÍZ-LÓPEZ Y GLORIA GUTIÉRREZ-VENEGAS.

RESUMEN

El gen toll de *Drosophilla* es fundamental para la resistencia anti-microbiana. Desde la identificación del primer homólogo de la proteína Toll, hasta este momento se han caracterizado nueve moléculas relacionadas a Toll en humanos y otros mamíferos. Los receptores toll (TLR) representan una familia conservada que funcionan para el reconocimiento de la respuesta inmunológica innata. Los TLR comparten la vía de transducción del receptor a IL-1β pero se distinguen de este receptor porque presentan una región rica en leucina. Los TLR están acoplados a vías de transducción que son similares en *Drosophila*, plantas y humanos. Activan a la cinasa asociada al receptor de interleucina-1β/ MyD88 (IRAK).

La activación de TLR no solo obedece a la repuesta inmunológica innata sino que participa también en regular la homeostasis celular mediante la interacción con ligandos endógenos.

PALABRAS CLAVE: receptores Toll, señales de transducción y localización.

ABSTRACT

Toll is a *Drosophilla* fundamental gene for antimicrobial resistance. Since to identification of the first human homologue of the *Drosophila* protein Toll, nine related molecules have been identified in human and other mammals. The Toll-like receptors (TLR) proteins represent a conserved family of the innate immune recognition receptors. TLR proteins share the cytoplasmic signaling cascade of interleukin 1β receptor but they are distinguished by their extracellular receptor because they present leucine-rich repeat organization. These receptors are used in signaling pathways that are conserved in *Drosophila*, plants and humans. The TLRs characterized activate the MyD88/interleukin-1β receptor associated kinase (IRAK) signaling pathway.

While TLR signaling is likely to be a key characteristic of innate immune responses, these proteins are also involved in regulating cellular homeostasis through the interaction with endogenous protein ligands.

KEY WORDS: Toll like receptors, signal transduction pathways, tissue distribution.

INTRODUCCIÓN.

Los insectos y los vertebrados requieren de una rápida respuesta inmunológica para asegurar su supervivencia. Esta operación está coordinada por el sistema inmunológico innato, que permite el reconocimiento de microbios y la activación de transducción de señales que culminan en la síntesis de citoquinas inflamatorias, quimoquinas y moléculas coestimulatorias.

En vertebrados, la activación del sistema inmunológico innato incluye la expresión de citocinas que estimulan a los macrófagos y a las células asesinas con lo que de forma directa eliminan a los patógenos y también modulan la respuesta inmunológica adaptativa mediante la secreción de citocinas y algunas otras moléculas que activan e incrementan la respuesta de linfocitos T y B. En conjunto la inmunidad innata y adquirida proporcionan a los vertebrados elementos efectivos para la defensa y por otra parte hacen posible responder con un reconocimiento específico potente, veloz y capaz de presentar memoria contra los patógenos. Esta combinación de características de la respuesta inmunológica asegurará su supervivencia (Fig. 1).

Hasta hace algunos años se tenía un conocimiento deficiente de los mecanismos bioquímicos involucra-

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM. C.P. 04510, México D.F.
Tel/Fax: 56 22 55 54, Correo E: gloria@fo.odonto.unam.mx

dos en la activación del sistema inmunológico innato por patógenos. Pero estos procesos se han comenzado a esclarecer gracias al extenso trabajo que se ha realizado con la caracterización de las proteínas Toll en *Drosophilla* y sus homólogos en mamíferos a los que se les denomina receptores similares a Toll (Toll-like receptors: TLR). Estos receptores se caracterizan por contener dos dominios que consisten en una región rica en leucina ubicada en el dominio extracelular y un dominio intracelular homólogo al receptor para interleucina-1β.

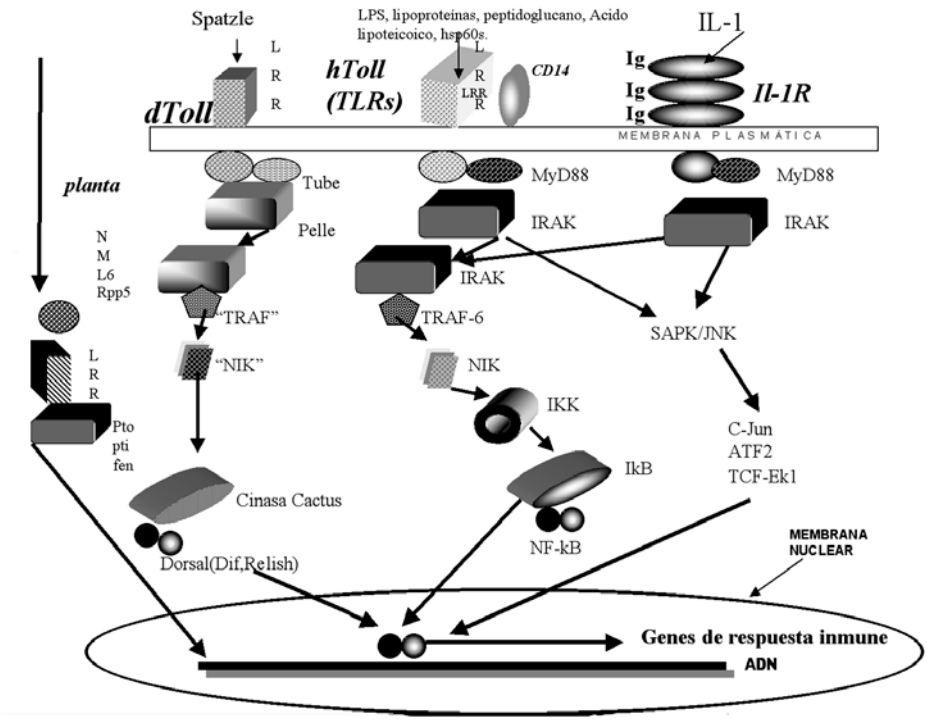


Figura 1. *Activación de la inmunidad adaptativa a través de TLRs. Primero. Las células dendríticas inmaduras en los tejidos periféricos son sensibilizadas por patógenos invasores. Los patógenos son reconocidos por TLRs o capturados por endocitosis. La señal de los TLRs permite la maduración de las células dendríticas (DCs). Las DCs maduras muestran una baja expresión de CCR5 y una alta expresión de CCR7, el cual puede proveer cooperativamente DCs con la habilidad de salir de los tejidos y migrar dentro de los tejidos linfoides. Simultáneamente, los patógenos capturados son procesados. Los productos procesados son entonces presentados a las células T como complejos antígeno-MHC. Las señales de los TLRs juegan un papel importante en la activación de células T clonales por el aumento de la expresión de moléculas MHC y moléculas coestimulatorias. Los TLRs pueden también regular la diferenciación de células T mediante la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-12. IL-12 puede instruir a las células T a diferenciarse en células TH1. En consecuencia, el establecimiento de la inmunidad adaptativa es influenciada por DCs estimuladas por TLRs.*

ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES TOLL

Dominio extracelular

La superfamilia de proteínas ricas en leucina (LRR) presentan diversas funciones y localización celular y han sido aisladas de una gran variedad de organismos. Los miembros de LRR están asociados a la membrana celular, por ejemplo la familia de Trk de receptores de neurotrofina, también están anclados a la membrana celular por medio de la unión a glicofosfatidilinosítol (GPI), como la proteína conectina en *Drosophila* y finalmente se encuentran también en el citoplasma de la célula, ejemplo el inhibidor de ribonucleasa.

El dominio extracelular en los receptores Toll es una región rica de repetición de leucina (LRR), esta región está conformada por módulos cortos de proteína formados de entre 20 a 29 aminoácidos, que se caracterizan por una porción de residuos hidrofóbicos en las regiones extracelular, membranal y citoplásmica.

Un subgrupo de la superfamilia de LRR colinda con residuos de cisteína, esta organización es una propiedad de proteínas adhesivas y de algunos receptores entre los que se incluyen a la proteína activadora RP105 presente en células B, que es una glicoproteína rica en leucina, así mismo el antígeno oncofetal asociado a la metástasis 5T4, componentes de la glicoproteína en plaqueta denominada complejo I6-V-IX, los receptores Toll presentes en *Drosophila* y la familia de TLRs en mamíferos (1).

Muchos miembros de la familia de LRR están involucrados en el proceso de embriogénesis y desarrollo. Toll fue identificado por mutagénesis en *Drosophila* y reveló ser un mediador crítico de la embrio-ventralización de *Drosophila,* y se caracteriza porque contiene dominios LRR y participa en el desarrollo de la glia media y rutas del axón comisural en el sistema nervioso (2).

Recientemente, muchos miembros de la familia LRR han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento de la región neural en humanos entre los que incluyen a homólogos Slit (2). Por otra parte se ha observado que alteraciones en el patrón de expresión de LRR conduce al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

La función precisa de los LRR no ha sido completamente esclarecida aunque hay algunas evidencias que los asocian al establecimiento del contacto célula-célula y a la interac-

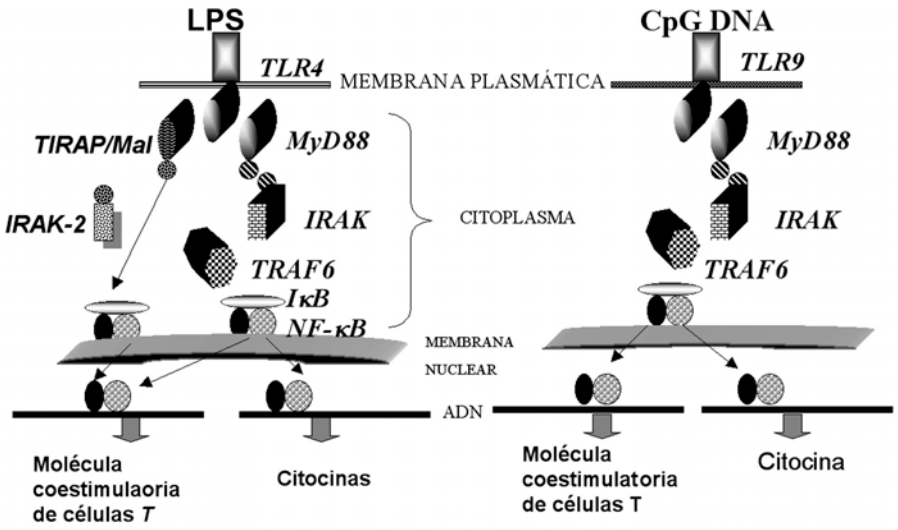


Figura 2. *Representación esquemática de PAMPs.*
Las bacterias Gram positivas muestran una capa espesa de peptidoglicanos (PGN) en la pared celular. Los ácidos lipoteicóicos, ácidos teicóicos, y lipoproteínas son también incluidas en esta pared celular. Las bacterias Gram negativas tienen una delgada capa de PGN en su pared celular comparadas con las bacterias Gram-positivas. La pared celular de la bacteria Gram-negativa se caracteriza por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en la superficie externa. Los LPS constan de un componente activo, la porción del lípido A, y polisacáridos-O(antígeno O). Este último está expuesto fuera de la superficie celular. Las porinas están implicadas en la formación de poros a través de los cuales pasan pequeñas moléculas. En Micoplasma las capas de una pared celular están al exterior pero las lipoproteínas y los lipopéptidos están dentro en su membrana citoplasmática. Mycobacterium tuberculosis presenta, una espesa capa hidrofóbica que contiene micolilarabinogalactano y trealosa-dimicolato, en adicción a una membrana citoplasmática y una capa de PGN. El lipoarabinomanano es un componente de la pared celular asociado a glicolípidos. Algunos de esos PAMPs muestran una fuerte actividad inmunológica al actuar como ligandos de diferentes miembros de la familia TLR.

ción con ligandos. Por ejemplo, la proteína caoptina presente en *Drosophila* está compuesta casi exclusivamente por LRR y se ha caracterizado como un mediador de la adhesión de células heterotrópicas y en sitios de interacción celular (3,4).

Las moléculas Toll participan en la adhesión celular mediante la modulación de señales extracelulares que conducen a la activación de otras moléculas de adhesión en la superficie celular. Por otra parte se ha demostrado que mutaciones en el dominio LRR, particularmente en el sitio que interactúa con la membrana y en la que se encuentran los residuos de cisteína conduce a la activación permanente de estos receptores (5).

La deleción completa de la porción extracelular de LRR de los receptores Toll conduce a un aumento de la función de los mismos, lo que sugiere normalmente que la activación de transducción de señales de estos receptores está regulada negativamente por el dominio extracelular. La cascada de señales de transducción activada por la interacción de un ligando con su receptor Toll también activa el sistema de defensa antimicrobial no específico (5).

En insectos y plantas el reconocimiento de los patógenos es mediado por un grupo de receptores denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), que identifican estructuras moleculares conservadas (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP) (Fig. 2), comunes a diferentes grupos de microorganismos (6).

En respuesta a la activación de los receptores PRR las células sintetizan péptidos antimicrobianos y citoquinas efectoras que activan componentes adicionales del sistema inmunitario del huésped. Este sistema de inmunidad innata también existe en los vertebrados.

Los PRR celulares se localizan en las células efectoras del sistema inmunológico innato, como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células asesinas naturales, células epiteliales y células que presentan antígenos en la superficie de las mucosas. Estos receptores estimulan la activación y diferenciación de linfocitos específicos. Por lo tanto una señal recibida e interpretada por un mecanismo de defensa no específico y no clonal es directamente mejorada por la respuesta inmunológica adaptativa.

Las células dendríticas (DCs) funcionan como centinelas en la primera línea de defensa del huésped y juegan un papel importante como células que presentan antígenos (APCs) en la formación de las respuestas inmunológicas. Las células dendríticas inmaduras residen en los tejidos no linfoides como la piel. El estímulo bacteriano puede inducir a las DCs a liberar citoquinas como el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) o la interleucina 12 (IL-12), las cuales son importantes para la diferenciación de células T en células Th1. La habilidad inductora de las citoquinas depende del tipo de estímulo en las células dendríticas. Por ejemplo, el dinucleótido guanosina-fosfato –citocina de DNA (CpG DNA) encontrado con mayor frecuencia en procariotos que en DNA de vertebrados puede estimular a las DCs a producir más IL-12, en comparación que con el estímulo mediado por lipopolisacárido (LPS), aunque ambos estímulos poseen la habilidad de inducir Th1. Esos estímulos inducen a la sobreregulación de moléculas coesti-

mulatorias en DCs incluyendo CD40, CD80 y CD86. Este paso llamado maduración de las DCs es crucial para la activación de las células T. En respuesta al estímulo patogénico las Dcs migran hacia áreas de células T en órganos linfoides secundarios. Esta activación genera respuestas inmunológicas tipo 1 (innatas) contra los patógenos. Aunque todavía no se conoce cómo, se ha implicado la participación de los TLRs en las funciones de las DCs.

DOMINIO CITOPLASMÁTICO DEL IL-1B R

Existe una gran homología entre el dominio citoplasmático de los receptores Toll de *Drosophila* y el receptor de interleucina-1β (IL1-R) de mamíferos. Se ha demostrado así mismo que las moléculas que participan en las vías de transducción de los receptores Toll es similar a la que utilizan cuando se activa al IL1-R. Estas similitudes se extienden a los sistemas de defensa de aves, mamíferos y plantas cuando se exponen a diferentes patógenos (7) (Fig. 3).

Como es bien sabido, la IL-1β es un regulador de las respuestas inflamatoria e inmunológica y tiene efectos en casi todas las células del cuerpo. Más de 90 genes están regulados por IL-1β, incluyendo a genes para citoquinas, receptores de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, componentes de la matriz celular y moléculas reactivas de la fase aguda de infección. Un gran número de investigaciones se han enfocado en la caracterización de la vía de transducción involucrada desde la activación del receptor a IL-1β hasta la translocación del factor de transcripción NF-κB, el cual es muy importante en las respuestas inmunológica e inflamatoria.

Se ha caracterizado que el sistema prototípico de IL-1βR/NF-κB consta de múltiples intermediarios que culminan en la translocación de NF-κB al núcleo y la subsecuente activación transcripcional de genes efectores. La ruta de señalización de IL1-R involucra el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, la cual une a IRAK e IRAK-2 que son dos cinasas de residuos de serina y treonina, estas cinasas posteriomente se asocian y activan a la proteína adaptadora TRAF6, que a su vez se asocia con la proteína cinasa NIK. NIK activa el complejo cinasa de I-κB (IKK-α y β), permitiendo la fosforilación y la degradación de IκB y la liberación y translocación de NF-κB (7)

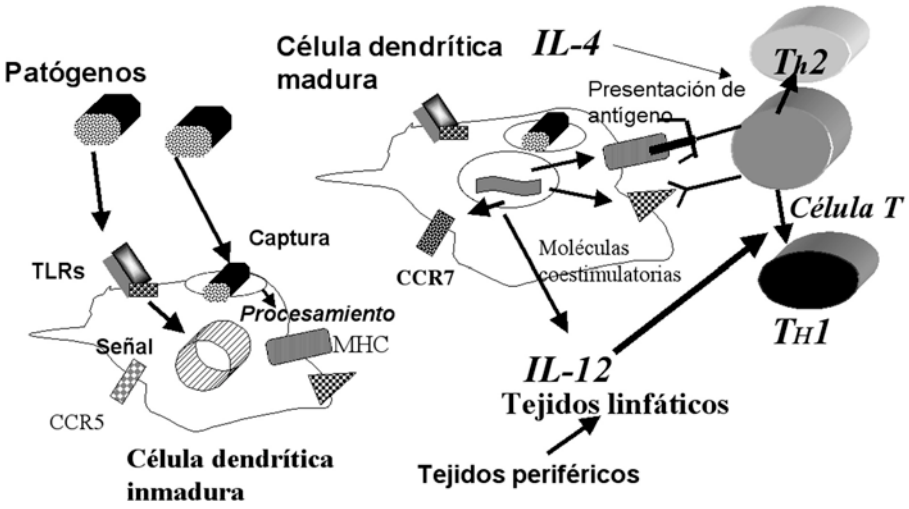


Figura 3. *Representación esquemática de las rutas homólogas de los factores de resistencia de la planta/dToll/hToll/IL-1R*
Abreviaturas: ATF2, factor2 de transcripción activada; fen, pti.pto, elementos representativos de la cascada de transducción de señal de resistencia en plantas; IKK, cinasa de I-kB-; IL-1b, interleucina-1b; IRAK cinasa asociada al receptor de IL-1b; JNK, cinasa NH2 terminal de jun; L6, M, N, Rpp5, receptores homólogos a Toll/Il-1 en plantas; LRR, repetición rica de leucina, NK-kB, factor nuclear-kB; NIK, cinasa inductora de NF-kB; SAPK, proteína cinasa activada por estress; TCF/Elk1, factor complejo ternary, TRAF6, factor asociado al receptor de TNF tipo 6.

Las señales a través de los receptores Toll de *Drosophil*a emplean una cascada de señalización homóloga a la que utilizan los mamíferos.

RECEPTOR TOLL DE DROSOPHILA (DTOLL)

El gen toll de *Drosophila* codifica para una proteína con características de un receptor que activa vías de transducción. Como ya se mencionó Toll y los genes relacionados a esta proteína tienen muchas funciones en *Drosophila* relacionadas a la estabilidad del eje dorso-ventral durante su desarrollo embrionario, la regulación de la respuesta inmunológica ante el tratamiento con patógenos y otros procesos del ciclo de vida de *Drosophila*, incluyendo el control de la forma del cuerpo y la regulación del desarrollo muscular. Las actividades en la embriogénesis y la respuesta inmunológica son controladas a través de rutas que muestran una gran similitud funcional y estructural con la cascada de transducción de señales de IL-1R.

Estudios de mutagénesis de IL-1R muestran que los aminoácidos esenciales para su funcionamiento se encuentran conservados en la proteína Toll y de igual manera los mediadores de la vía de transducción de Toll, las proteínas Pelle, Cactus y Dorsal han resultado ser los homólogos a IRAK, IκB y NF-κB de mamíferos.

Una serie de reacciones proteolí-

ticas genera la forma activada de Spätzle, molécula que funciona como un ligando para el receptor Toll en *Drosophila* tanto en el desarrollo como en inmunidad.

Spätzle es miembro de la superfamilia del grupo de cisteína (similar a los factores de crecimiento neuronal en humanos) y se cree es activado por diferentes cascadas de serin-proteasas tanto en la embriogénesis como en la respuesta inmunológica. La activación del receptor Toll también requiere la participación de la proteína intracelular Tube (homólogo a MyD88), la cual subsecuentemente activa a Pelle una cinasa de residuos de serina y treonina. Tube tiene un dominio de muerte (una región involucrada de interacción proteica en las interacciones homofílicas proteína-proteína), homólogo a MyD88 (requerida para la activación de Toll y Il-1R en humanos) que podría tener una función similar. Así como en las interacciones de IRAK/Iκ-B/NF-κB, Pelle controla la degradación de Cactus la cuál está unida a la proteína Dorsal en el citoplasma. La degradación de Cactus permite a Dorsal translocarse al núcleo y regular la trascripción de genes (8,9).

Hay tres genes de *Drosophila* que son homólogos a dToll con un dominio intracelular similar al IL-1R y uno extracelular a los LRR, que también están implicados en su desarrollo:

- 18- Wheeler: es requerido para la morfogénesis de *Drosophila* y se considera tiene una función en la adhesión celular y que participa en el movimiento celular.
- TLR de *Drosophila* (receptor Toll-like): que participa en la embriogénesis y en las interacciones célula-célula en límites críticos durante el desarrollo.
- Mst-prox: que es el menos caracterizado.

Tanto el receptor Toll de *Drosophila* como 18-Wheeler inducen la expresión de genes que codifican a proteínas antibacterianas y antifúngicas en la respuesta inmunológica de *Drosophila* (9).

Se han encontrado diferentes rutas para la respuestas inmunológicas ante los patógenos, las señales del receptor Toll para el péptido antifúngico, drosomicina actúan por la ruta previamente descrita para la diferenciación dorsal-ventral (incluyendo el ligando Spätzle) pero en está se ha involucrado a otro miembro de la familia Rel (Dif o Relish).

Además mutaciones en las rutas de las señales de Toll reducen la supervivencia de *Drosophila* adulta después de la infección por hongos. Toll es también requerido en la inducción de proteínas bactericidas como cecropina, atacina y defensina. Así mismo 18-Wheeler está involucrado en la expresión de atacina, cecropina y diptericina a través de la proteína similar a Rel denominada Dif. Por otra parte, mutaciones en el gen 18-Wheeler ocasionan que la larva de *Drosophila* sea más susceptible a la infección de patógenos. Todos estos componentes de la respuesta humoral de *Drosophila* son producidos en el cuerpo graso de este organismo que realiza funciones similares al hígado de los vertebrados.

TRL EN MAMÍFEROS

Se han descrito nueve distintos TLR en humanos y mamíferos pero se considera que existen muchos más miembros de acuerdo a los análisis de bancos genómicos. Cada TLR tiene una estructura característica: un dominio extracelular con analogía a los LRR y un dominio intracelular análogo al IL-1R (10).

Estas proteínas están involucradas en la respuesta inmunológica innata en humanos y vinculan a los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. También se ha demostrado estos receptores intervienen en el desarrollo embrionario en mamíferos.

Medzhitov (11) fue el primero en demostrar un gen Toll humano al que se le denominó hToll o TLR-4. La transfección de está proteína puede inducir la activación del factor de transcripción NF-κB, que a su vez controla genes para las citoquinas inflamatorias IL-1β, IL-6 y IL-8, así como la expresión de la molécula coestimulatoria B7.1, la cual es requerida para la activación de células T. Subsecuentemente, se mostró que el TLR4 puede activar la trascripción de genes mediadores de la inflamación a través de NF-κB y de la cinasa terminal jun-NH2 (JNK), incluyendo rutas que divergen de TRAF6. Asi pues, la JNK (cinasa activada por el estrés, SAPK), suministra un mecanismo alternativo para generar factores proinflamatorios a través de TLRs (TLR4, TLR6), IL-1R y TNFR-1 (receptor del factor de necrosis tumoral) (Tabla I).

Chaudhary y colaboradores (12) describieron dos Toll humanos TIL3(TLR5) y TIL4 (TLR2) incluyendo su localización cromosómica y la distribución en los tejidos. Ambas proteínas son capaces de activar NF-κB pero en un tipo específico de célula. La clonación y caracterización de 5 receptores Toll muestran que TLR1 es homólogo a TIL, TLR2 es homólogo a TIL4, TLR5 es homólogo a TIL3 y TLR4 es homólogo a hToll (13) .

TLR6 ha sido recientemente descrito y es homólogo a TLR1 (69% de homología en aminoácidos) con una localización cromosomal similar. La activación de TLR6 induce NF-κB y a la c-Jun NH2 cinasa terminal (JNK) en un modo similar a TLR4. La distribución en tejidos ha sido demostrada únicamente por RT-PCR, lo que sugiere que estas moléculas tienen un bajo nivel de expresión.

El papel de los receptores Toll en

la respuesta de células de insectos y mamíferos ha sido extensamente estudiada. Un mejor entendimiento de cómo responden los mamíferos a la bacteremia es de gran importancia porque una infección de bacterias gram-positivas, gram-negativas y otros organismos microbianos resulta en aproximadamente 70,000 muertes por año en los Estados Unidos.

Dentro de las toxinas presentes en las bacterias gram-negativas se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) que requieren de la glicoproteína CD14 que es una molécula de anclaje del glicosilfosfatidilinositol (GPI) la cual es preferencialmente expresada en los monocitos/macrófagos y neutrófilos y se asume que se une a LPS por medio del factor sérico de asociación a LPS (LBP).

Debido a que los receptores Toll están involucrados en respuestas inmunológicas primitivas, los receptores similares a Toll fueron los candidatos idóneos como receptores a la respuesta a LPS en mamíferos. Algunos estudios mostraron que las células de riñón no sensibles a LPS responden cuando se transfectan con el ADN complementario de TLR-2.

Así mismo las células HEK293 son capaces de mostrar un incremento a la sensibilidad a LPS al transfectar los ADN complementarios del TLR2 o del TLR4.

Sin embargo, los fibroblastos de ovario de ratón que no expresan TLR-2, pero que presentan CD-14, responden al tratamiento con LPS. Por lo que Heine (14) postuló que TLR2 es suficiente pero no necesario para la respuesta de los mamíferos a la endotoxina, lo que sugería que TLR4 era el receptor principal en la respuesta a LPS. Esta propuesta se confirmó con la generación de un ratón deficiente en TLR-4 que no respondía al tratamiento con LPS (5, 7).

Con relación a las infecciones por microorganismos como bacterias gram-positivas, se ha confirmado que el receptor TLR2 es requerido para la respuesta a peptidoglicanos y ácido lipoteico en células HEK 293. Sin embargo, la expresión de TLR1 o TLR4 no da respuestas similares. La independencia de este sistema de LPS se demuestra gracias a que el efecto en células que expresan TLR2 no es bloqueado por polimixina B, proteína que se une e inactiva al LPS. Por otra parte, la respuesta a estos componentes de las bacterias gram-positivas involucran también a CD14 (similar a la respuesta a LPS mediada por TLR-4), sin embargo, esta no requiere de factores presentes en el suero como en la respuesta a LPS.

Yoshimura (15) mostró resultados similares en donde la proteína TLR-2 es la involucrada cuando se tratan los fibroblastos con *Staphylococcus aureus* y antígenos de *Streptococcus pneumonía*. Las lipoproteínas y sus derivados son conocidos como potentes activadores inflamatorios de neutrófilos, macrófagos y células B y han sido implicados en la infección crónica.

Las lipoproteínas asociadas con las especies de *Mycobacterium*, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, son potentes estimuladores de IL-12 en macrófagos. IL-12 es un mediador clave de la respuesta inmunológica innata y los resultados en la generación de linfocitos T-ayudadores tipo 1, los cuales son requeridos para la eliminación de patógenos intracelulares tales como *M. tuberculosis*. Brightbill mostró que el TLR2 se requiere para la activación de monocitos humanos (con producción de IL-12) por lipoproteínas. Underhill mostró que los macrófagos sintetizan TNF- α (importante en la formación de granuloma y en la respuesta del huésped) a través de TLR2 cuando se tratan con tres fracciones estructurales de la pared celular de *M. tuberculosis*. De la misma manera las lipoproteínas de *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme, han sido identificadas en promover la translocación nuclear de NF-κB con la producción de citoquina y de óxido nítrico/superóxido (existen resulta-

Tabla I

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DE RECEPTORES TLR

Receptor	Nombre alternativo	Localización cromosomal	Distribución por tejido	Activación
TLR1	TIL, rsc 786	4p14	ovario, bazo	Activa NF-kB
TLR2	TIL4	4q32(4q.3-32[8])	leucocitos, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo, fibroblastos gingivales	Activa NF-kB
TLR3	———	4q35	leucocitos, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo	Activa NF-kB y cinasa NH2 terminal de jun
TLR4	hToll	9q32-33	leucocitos, corazón y placenta	Activa NF-kB
TLR5	TIL3	1q33.3[9](1q41-42[8])	leucocitos, ovarios, próstata, testículos	Activa NF-kB y cinasa
TLR6	———	4p	timo, bazo, ovario, pulmón	NH2 terminal de jun
TLR7	———	———	cerebro y pulmón	———
TLR8	———	———	corazón, hígado y pulmón	———
TLR9	———	———	hígado y pulmón	———

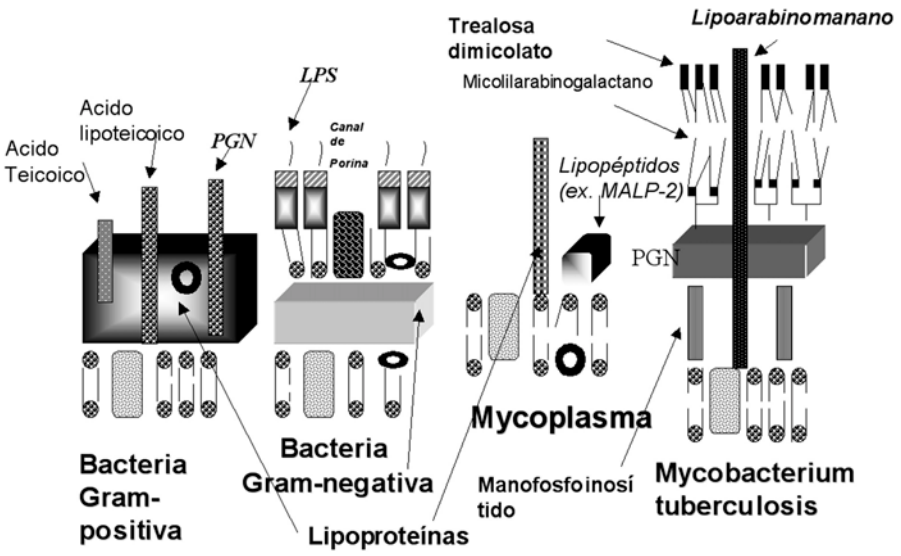


Figura 4. *TLR4 y TLR9 pueden ejercer efectos biológicos similares a través de distintas rutas de señales.*
Ambos TLR4 Y TLR9 pueden activar rutas de señales procedentes de MyD88. Esta ruta de forma secuencial activa a IRAK y a TRAF6 y permite la activación de NF-kB y de las MAPKs (no se muestran). Notablemente, TLR4 pero no TLR9, puede activar a NF-kB y las MAPKs en una forma independiente de MyD88 y TIRAP/Mal de manera dependiente. La inducción de citoquina en respuesta a los ligandos de TLR4 Y TLR9 es completamente dependiente de MyD88. Ambas señales de TLR4 y TLR9 pueden inducir la regulación de moléculas coestimulatorias y la actividad estimulatoria de células T. Sin embargo, estos efectos difieren en sus requerimientos para MyD88; esto es, los efectos biológicos de TLR4 son independientes de MyD88 mientras que los efectos de TLR9 son dependientes de MyD88.

dos similares en respuesta al tratamiento con *Mycobacterium*).

Hirschfield confirmó que la señalización a travez del TLR2 se incrementa en presencia de CD14 en células del glioma humano U373 que expresan TLR1, TLR3 y TLR4 pero no TLR2. Estas células pueden responder vigorosamente al LPS pero no a la lipoproteína OspA de *B. burgdorferi*. Sin embargo, la transfección de ADN complementario de TLR2 en estas células las hace sensibles a la lipoproteína Osp A.

Aunque los estudios demuestran un requerimiento para TLRs en la respuesta a patógenos microbianos, las funciones de cada uno de estos receptores no ha sido completamente caracterizada.

Muchos de los estudios publicados involucran la transfección de líneas celulares para que expresen diferentes TLRs, sin embargo, esto podría no reflejar lo que ocurre *in vivo*. También se ha sugerido que quizá el complejo de señales involucra a un conjunto de proteínas heterodiméricas (i.e. TLR múltiples) similares al complejo IL-1R/IL-1βAcp (proteína accesoria de IL-1β). Otros mediadores han sido implicados, incluyendo MD-2 (similar a la interacción de MD-1 con el activador de células B RP105) el cuál podría estar involucrado en la señal de LPS a través de TLR4.

La molécula adaptadora celular del TLR/IL-1R es MyD88 la cual es requerida para la respuesta celular tanto de los componentes de paredes celulares de bacterias gram-positivas como gram-negativas, existen reportes que señalan que los receptores TLR4 y TLR9 activados por distintos ligandos comparten la misma vía de transducción, se ha descubierto que el receptor TLR4 a través de una vía distinta puede desencadenar la misma respuesta biológica (Fig. 4).

La células efectoras inmunológicas poseen diferentes combinaciones de TLRs y posiblemente diferentes TLR son capaces de proveer un mecanismo para la discriminación patógena. El TLR-2 se requiere para la identificación de bacterias gram-postivas y levaduras. El TLR4 es necesario para el reconocimiento de las bacterias gram-negativas (16). Estas conclusiones se obtuvieron a partir del tratamiento con distintos glicolípidos LAM (lipoarabinomanano) y LPS. La unión a estos ligandos a CD14 no es discriminatoria pero la subsecuente activación celular se encontró específica para el TLR. El TLR2 es necesario para el reconocimiento y respuesta a LAM y el TLR4 para la activación por LPS. Se ha encontrado que zymosan de levaduras induce la activación del TLR2, y que los fosfolípidos glicosilfosfatidilinositol y glicoinositol de parásitos protozoarios desencadenan la activación de NF-κB en fibroblastos de óvario de ratón (CHO) que ectópicamente sobreexpresan CD14 y TLR2, pero no en el tipo silvestre de células CHO (17).

Defectos en la función del receptor Toll han demostrado incrementar la susceptibilidad a la infección en *Drosophila* y ratones. Es posible que la alteración de TLR en su función o expresión jueguen un papel importante en la enfermedad humana. La variabilidad en la composición y función del receptor confiere el incremento o decremento de la susceptibilidad a la infección.

Una mejor comprensión de la cascada de transducción de los TLR podría proporcionar información para nuevas terapias antimicrobiales.

Tanto los TLR como las proteínas involucradas en la transducción de señales mediada por estos receptores podrían ser importantes en el desarrollo humano y en el mantenimiento de las funciones normales de los or-

ganismos. Por ejemplo, miocitos cardiacos normales y disfuncionales expresan diferentes variantes del TLR4. En ausencia de la infección el sistema mediador del TLR podría estar involucrado en la fagocitosis de restos de células apoptóticas.

Esos descubrimientos fueron sustentados por un reporte que describe la habilidad de la proteína de choque térmico de corazón humano (Hsp60) para actuar como un ligando endógeno para el complejo TLR4 (18). Hsp60 es usualmente retirado del interior celular donde funciona como una molécula acompañante o chaperona. Sin embargo, Hsp60 es liberada durante un daño celular y necrosis o cuando se transporta a la membrana plasmática durante las respuestas de los diferentes tipos de células. Por lo que se sugiere que Hsp60 funciona a través de TLR para activar la respuesta inflamatoria en el daño celular. Hay evidencias que sugieren que la expresión alterada de TLR o de LRR podrían estar involucradas en la patología cardiaca, en enfermedades neurodegenerativas o en malignización celular. Se ha propuesto que la notable conservación de las rutas de señales de Toll ha sido una presión evolutiva para conservar y adaptar de forma eficiente sistemas de reconocimiento y transmisión de señales acoplados a una rápida respuesta celular.

REFERENCIAS

1. Jeans TK, Golenbock DT y Fenton MJ (2000) Structure and function of Toll-like receptor proteins. Life Sci *68*: 241-258.

2. Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS y Artavanis-Tsakonas S (1990) Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. Genes Dev *4*: 2169-2187.

3. Krantz DE y Zipursky SL (1990) Drosophila chaoptin a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. Eur Mol Biol Org H *9*: 1969-1977.

4. Keith FJ y Gray NJ (1990) The Drosophilla membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. Eur Mol Biol Org J *9*: 4299-4306.

5. Schnieder DS, Hudson KL, Lin TY y Anderson KV (1991) Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. Genes Dev *5*: 797-807.

6. Kopp EB, Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr Opin Immunol *11*: 13-18.

7. O´Neil LA y Greene C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants. J Leukoc Biol *63*: 650-657.

8. Belvin MP, Anderson KV (1996) A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. Annu Rev Cell Dev Biol *12*: 393-416.

9. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffman JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophilla adults. Cell *86*: 973-983.

10. Munzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M y Mantovani A (1998) The human toll signalilng pathway: divergente of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumos necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6). J Exp Med *187*: 2097-2101

11. Medzhitov R , Preston-Hurlburt P y Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptative immunity. Nature *388*: 394-397.

12. Chaudhary PM, Feguson C, Nguyen V, Nguyen O, Massa HF, Eby M, Jasmin A, Trask BJ, Hood L y Nelson PS (1998) Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. Blood *91*: 4020-4027

13. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA y Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci USA *95*: 588-593

14. Heine H, Kirschining CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT (1999) Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. J Immunnol *162*: 6971-6975.

15. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R y Golenbock D (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll like receptor-2. J Immunol *163*: 1-5.

16. Ulevitch RJ, Tobias PS (1999) Recognition of gram negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr Opin Immunol *11*: 19-22.

17. Beutler B, Wagner H (2002). Toll like Receptor Family Members and their ligands. Curr topics Mycrobiol Inmunol *270*: 133-135.

18. Ohashi K, Burkat V, Flohe S, Kolb H (2000). Cutting edge; heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol *164*: 558-561.

REB *22* (2): 76-84

La Estructura de las Catalasas*

Adelaida Díaz

RESUMEN

La catalasa es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. La mayoría de estas enzimas son homotetrámeros con un grupo hemo en cada subunidad. Se ha determinado la estructura cristalográfica de nueve catalasas. Algunas catalasas tienen subunidades pequeñas (masa molecular ≈ 60 kDa) y otras grandes (masa molecular > 80 kDa). Entre estos dos tipos de catalasas existen diferencias estructurales importantes. Las catalasas pequeñas son menos resistentes a la desnaturalización, unen NADPH, tienen hemo *b* y se inhiben e inactivan por sustrato. En cambio, las catalasas grandes tienen un dominio extra en el C-terminal que es semejante a la flavodoxina, son muy resistentes a la desnaturalización, tienen hemo *d*, presentan enlaces covalentes inusuales cercanos al sitio activo y son resistentes a concentraciones molares de H_2O_2. Aquí revisamos los aspectos estructurales de las catalasas y sus posibles implicaciones funcionales.

PALABRAS CLAVE: catalasa, hemo *b*, hemo *d*, enlaces covalentes inusuales, dominio semejante a la flavodoxina.

ABSTRACT

Catalase, an antioxidant enzyme present in most aerobic organisms, dismutates hydrogen peroxide into water and oxygen. Most of these enzymes are homotetramers with one heme per subunit. The structure of nine catalases has been determined. Catalases have either small subunits (molecular mass ≈ 60 kDa); or large ones (molecular mass > 80 kDa). There are important structural differences between small and large catalases. Small catalases are less resistant to denaturation, they bind NADPH, have heme *b* and are inhibited and inactivated by substrate. Large catalases are very resistant to denaturation, they have a C-terminal flavodoxin-like domain, contain heme *d*, present unusual covalent bonds near the active site and are resistant to molar H_2O_2 concentrations. Here we review structural aspects of catalases and their possible functional implications.

KEY WORDS: catalase, heme *b*, heme *d*, unusual covalent bonds, flavodoxin-like domain.

INTRODUCCIÓN

a) La función de la catalasa

Las especies de oxígeno reactivas como el radical superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forman durante la reducción del dioxígeno en agua. Estas especies pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, por lo que se requieren sistemas antioxidantes eficientes, entre los que se incluyen ciertas enzimas. El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. Hay varias enzimas capaces de degradar el peróxido de hidrógeno: las catalasas, las peroxidasas y las peroxirredoxinas (1, 2). Las peroxidasas eliminan el H_2O_2 usándolo para oxidar otros sustratos. A diferencia de las otras enzimas, que requieren de un sustrato reducido, las catalasas dismutan el peróxido de hidrógeno. Se han identificado tres grupos de catalasas: i) las catalasas monofuncionales, que contienen hemo y están presentes tanto en los organismos procariotos como en los eucariotos, ii) las Mn-catalasas, que son enzimas hexaméricas que no tienen hemo, tienen Mn en el sitio activo y sólo están presentes en algunos organismos

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México, D. F. C. P. 04510. Teléfono: 5622 5655, Fax: 5622 5630. Correo E: adiaz@ifisiol.unam.mx.

procariotos anaerobios y iii) las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa, contienen hemo y sólo están presentes en las bacterias y los hongos (3).

La mayoría de los organismos aerobios tienen catalasas monofuncionales. Las catalasas catalizan la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y dioxígeno evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas. En el hombre, la catalasa protege la hemoglobina del peróxido de hidrógeno que se genera en los eritrocitos. También tiene un papel de protección en la inflamación, en la prevención de mutaciones, evita el envejecimiento y cierto tipo de cáncer. Las mutaciones en el gen de la catalasa pueden resultar en la enfermedad hereditaria denominada acatalasemia que entre otros síntomas se reconoce por un incremento en la incidencia de ulceraciones bucales (3, 4).

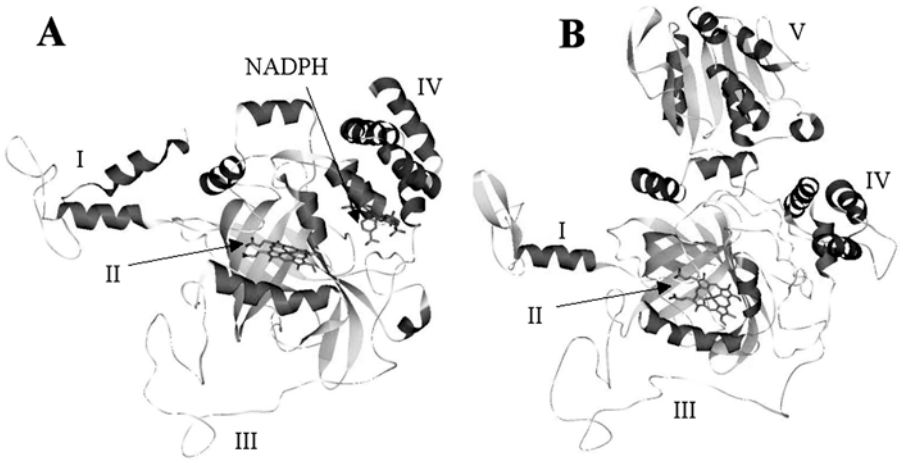


Figura 1. *A. El monómero de la catalasa de eritrocitos humanos (HEC), una catalasa pequeña. B. El monómero de la catalasa-1 de N. crassa (CAT-1), una catalasa grande. El dominio I corresponde al N-terminal, II es el barril β que contiene el hemo, III es el asa envolvente, IV es el dominio de hélices y V es el C-terminal con topología semejante a la flavodoxina. También se muestra la molécula de NADPH unida a la catalasa pequeña.*

b) El mecanismo de reacción

En la reacción de la catalasa ocurre la transferencia de dos electrones entre dos moléculas de peróxido de hidrógeno en la cual una funciona como donador y otra como aceptor de electrones. El mecanismo de reacción se lleva a cabo en dos pasos. En el primero la catalasa se oxida por una molécula de peróxido formando un intermediario llamado compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo con FeIV y un radical catiónico de porfirina. En esta reacción se produce una molécula de agua (Reacción 1). En el segundo paso de la reacción, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido regresando la catalasa a su estado inicial y produciendo agua y dioxígeno (Reacción 2).

En ciertas condiciones el compuesto I puede captar un electrón originando el compuesto II. El compuesto II tiene un estado de oxidación intermedio a los observados en el compuesto I y la catalasa en reposo. Al reaccionar con una molécula de H_2O_2 forma el compuesto III, que tiene un estado de oxidación FeVI. El compuesto II y el compuesto III son inactivos cataliticamente.

La catalasa también puede catalizar ciertas reacciones como peroxidasa. En la reacción de peroxidasa de la catalasa, el compuesto I puede oxidar el metanol, el etanol, el formato o el nitrato utilizando una molécula de H_2O_2 como oxidante (5). En el cerebro, la reacción de la catalasa con el etanol forma acetaldehído (Reacción 3), que explica algunos de los efectos neurológicos del alcohol en humanos (4).

c) Antecedentes

Las catalasas monofuncionales son de dos tipos: las catalasas con subunidades pequeñas (masa molecular ≈ 60 kDa) y las catalasas con subunidades grandes (masa molecular > 80 kDa). Las primeras (Fig. 1A) se encuentran en los mamíferos, las plantas, los hongos y la mayoría de las bacterias y tienen la característica de unir NADPH y de ser inhibidas e inactivadas por sustrato. La unión del NADPH es para prevenir la acumulación del compuesto II y III (4, 5). Las catalasas grandes sólo están presentes en los hongos y en las bacterias, no unen NADPH, tienen un dominio en el C-terminal semejante a la flavodoxina y son resistentes al H_2O_2 (Fig. 1B) (5-7).

Un estudio cinético muestra que la catalasa de hígado de bovino (BLC: "bovine liver catalase"), que es una catalasa pequeña, se inhibe reversiblemente y se inactiva irreversiblemente a partir de 200 mM de H_2O_2, mientras que la catalasa R de *Aspergillus niger*, que es una catalasa grande, no muestra inhibición reversible e inactivación irreversible con 2 M de sustrato. La inhibición reversi-

$$\textbf{Enz (Por-Fe}^{\textbf{III}}\textbf{)} + H_2O_2 \rightarrow \textbf{Compuesto I (Por}^{+\bullet}\textbf{-Fe}^{\textbf{IV}}\textbf{-O)} + H_2O \quad (1)$$

$$\textbf{Compuesto I (Por}^{+\bullet}\textbf{-Fe}^{\textbf{IV}}\textbf{-O)} + H_2O_2 \rightarrow \textbf{Enz (Por-Fe}^{\textbf{III}}\textbf{)} + H_2O + O_2 \quad (2)$$

$$\textbf{Compuesto I (Por}^{+\bullet}\textbf{-Fe}^{\textbf{IV}}\textbf{-O)} + CH_3CH_2OH \rightarrow \textbf{Enz (Por-Fe}^{\textbf{III}}\textbf{)} + CH_3CHO + H_2O \quad (3)$$

ble de la BLC se debe a la acumulación del compuesto III (5). Otra catalasa grande que no se inhibe reversiblemente y no se inactiva irreversiblemente con altas concentraciones de H_2O_2 (3 M) es la Catalasa-1 de *Neurospora crassa* (CAT-1). Además de su resistencia al H_2O_2, la CAT-1 presenta cooperatividad en altas concentraciones de sustrato (> 200 mM) (Díaz A, Muñoz-Clares R A y Hansberg W. Manuscrito en preparación).

Para poder entender estas diferencias funcionales es importante conocer la estructura tridimensional de las distintas catalasas. Estableciendo correlaciones estructura-función se podrá desentrañar el mecanismo íntimo de la reacción.

Se ha determinado la estructura tridimensional de nueve catalasas. Cuatro de estas catalasas son de procariotos: de *Micrococcus lysodeikticus* (MLC) (3,8), de *Proteus mirabilis* (PMC) (9), la HPII de *Escherichia coli* (HPII) (10, 11) y la de *Pseudomonas syringae* (CatF) (12), y cinco catalasas son de eucariotos: la catalasa de bovino (BLC) (13, 14), la de *Penicillium vitale* (PVC) (15), la catalasa A de *Saccharomyces cerevisiae* (SCCA) (1), la catalasa de eritrocitos humanos (HEC) (4) y la CAT-1 de *N. crassa* (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación). Las catalasas anteriores son catalasas pequeñas excepto la HPII, la PVC y la CAT-1. Estas catalasas son homotetrámeros, tienen un grupo hemo por subunidad y una simetría molecular 222. La simetría molecular 222 está presente en varias enzimas y se caracteriza por tener tres ejes de rotación de orden dos (180º) que son perpendiculares entre sí. Esta simetría describe un tetrámero de subunidades idénticas. Si a una subunidad se le aplica una rotación de 180º en el eje X, otra de 180º en Y y otra de 180º en Z se puede generar el tetrámero. Lo anterior indica que las catalasas son tetrámeros con subunidades simétricas ó idénticas (15).

DESCRIPCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE LAS CATALASAS

Las catalasas monofuncionales están formadas por los siguientes dominios: 1) el amino terminal, 2) un barril β con ocho hebras antiparalelas, 3) el asa envolvente, 4) un dominio de hélices (Fig. 1A) (4) y, en el caso de las catalasas grandes, el dominio tipo flavodoxina del carboxilo terminal (Fig. 1B).

El amino terminal comprende desde el primer aminoácido hasta el residuo de histidina esencial catalítico. Esta región de aproximadamente 60 aminoácidos tiene poca similitud entre las secuencias de las catalasas y se observa como un brazo torcido que se entierra en las subunidades vecinas. Contiene a la hélice α2 que es el primer elemento de estructura secundaria común en las catalasas. La HPII tiene el amino terminal más largo, con 90 aminoácidos (16). En tres estructuras de catalasa los primeros aminoácidos del amino terminal están desordenados, en la SCCA son los primeros 14 aminoácidos (1), en la HPII de *E. coli* son los primeros 26 aminoácidos (10-11) y en la CAT-1 de *N. crassa* son los primeros 17 aminoácidos (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación), por lo que no se observan en los mapas de densidad electrónica y no se incluyen en los modelos moleculares.

El barril β con ocho hebras antiparalelas es el dominio más conservado de las catalasas; se clasifica como estructura α+β y abarca aproximadamente 260 aminoácidos (15). Las primeras cuatro hebras (β1-4) son consecutivas y están separadas por tres hélices (α3-5) del segundo grupo de cuatro hebras (β5-8). La primera mitad del barril β contiene la histidina y la asparagina esenciales del sitio activo. La continuidad de los puentes de hidrógeno entre las hebras del barril β se pierde entre las hebras β4 y β5 dónde hay sólo dos puentes de hidrógeno con la asparagina esencial. La hebra β5 es irregular porque tiene tres aminoácidos (Ser196, His197 y Thr198 en PMC) que no participan en la hoja β. Lo anterior permite que el amino terminal de la hebra β5 se una a las hebras β4 y β6 para cerrar el barril β. Entre las hebras β6 y β7 hay dos hélices (α6 y α7) (16). La segunda mitad del barril funciona para unir el NADPH en las catalasas BLC (13, 14), PMC (9), MLC (3, 8), SCCA (1) y HEC (4). La última hélice (α8) es una hélice tipo π en BLC (14), PVC (15), CAT-1 y posiblemente en todas las otras estructuras de catalasa.

El asa envolvente abarca alrededor de 110 aminoácidos que unen el barril β con el dominio de las hélices. Esta región tiene poco contenido de estructura secundaria repetitiva, contiene una hélice (α9) con la tirosina esencial que coordina el Fe.

El dominio de las hélices, con aproximadamente 60 aminoácidos, está formado por cuatro hélices contiguas (α10-13), bien definidas que son parecidas a las encontradas en las globinas (Fig. 1A y 1B) (15).

La principal diferencia estructural entre las catalasas pequeñas y las grandes es la presencia, en estas últimas de un dominio extra en el carboxilo terminal de aproximadamente 150 aminoácidos. Éste es un dominio del tipo α/β formado por cuatro hélices alfa (α15-18) y ocho hebras β (β9-16) cuya topología es semejante a la flavodoxina (Fig. 1B). Se desconoce la función de este dominio y no hay evidencia experimental de que pueda unir nucleótidos (16).

Las catalasas que carecen del dominio C-terminal unen una molécula de NADPH. En las catalasas grandes, los aminoácidos entre el domi-

nio de las hélices y el C-terminal cubren el sitio de unión del NADPH, impidiendo la unión del cofactor en las catalasas PVC, HPII y CAT-1.

La dimerización en las catalasas pequeñas y grandes se da por el entrelazamiento mutuo de los monómeros. El amino terminal de un monómero se entrelaza con el asa envolvente del otro monómero (Fig. 2A). El tetrámero es un dímero de dímeros unidos fuertemente, que tiene una estructura muy compacta con dimensiones de 150 x 100 x 80 Å en las catalasas grandes (Fig. 2B) (16).

Las catalasas son enzimas muy resistentes y estables. Sin embargo, las catalasas grandes son más resistentes que las pequeñas. La HPII y la CAT-1 son más resistentes a altas temperaturas que la BLC. Así, la BLC se inactiva completamente al incubarla por 30 min a 64ºC, mientras que la HPII lo hace en 20 min a 86ºC y la CAT-1 pierde sólo el 50% de su actividad después de 70 min a 93ºC. La HPII y la CAT-1 también son resistentes a detergentes (1% SDS) y agentes desnaturalizantes como urea (9 M) o guanidina-HCl (4 M). En cambio, en estas condiciones la BLC se inactiva completamente (17, 18). Se ha visto que la alta resistencia de las catalasas al calor y los desnaturalizantes se debe en parte al entrelazamiento de los monómeros para formar dímeros activos muy estables. El dominio C-terminal en las catalasas grandes como la HPII y la CAT-1, así como los carbohidratos unidos a la CAT-1 podrían contribuir también a su estabilidad. La glicosilación también se ha reportado en otras catalasas grandes de hongos como la CatR de *A. niger* y la CatB de *Aspergillus nidulans* (11, 18).

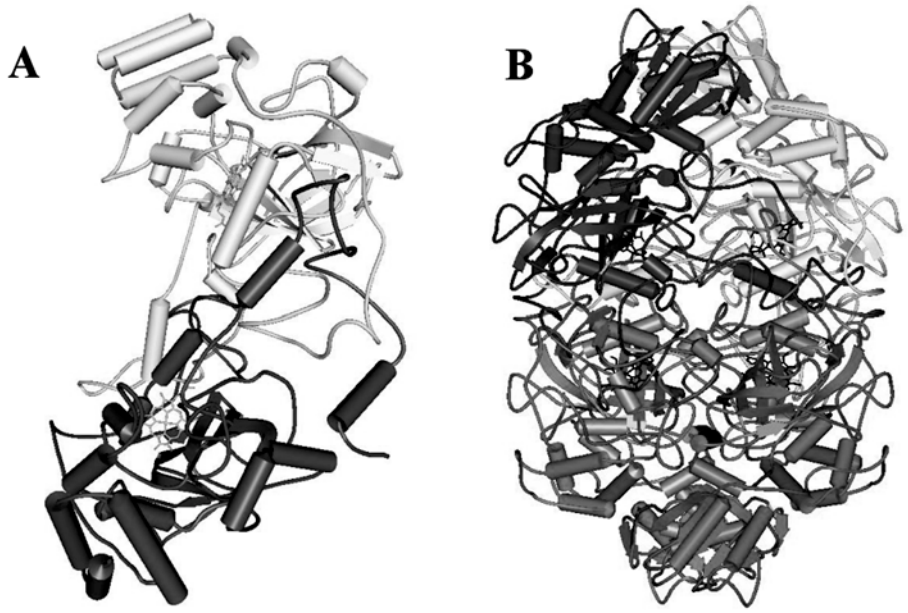


Figura 2. *A. El dímero de una catalasa pequeña (BLC). Se muestra como están entrelazados los monómeros. B. El tetrámero de una catalasa grande (HPII).*

EL GRUPO HEMO Y SU FUNCIÓN

La localización del hemo y su ambiente están muy conservados en las catalasas. El hemo no está unido covalentemente y se encuentra enterrado entre el barril β y dos hélices (α4 y α12). La distancia del hemo a la superficie del tetrámero es de aproximadamente 20 Å (15, 16, 19). Los grupos propionato del hemo están enterrados y estabilizados por puentes salinos con tres argininas conservadas.

En la PVC, la HPII, la CAT- 1 y la CatF el hemo está invertido, esto es, está rotado 180° con respecto al hemo de las catalasas BLC, PMC, MLC, SSCA y HEC (Fig. 3A) (8-19, Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación), de tal manera que los grupos metilo y vinilo de los anillos I y II cambian sus posiciones (Fig. 3B). La CatF de *P. syringae* es la única catalasa pequeña en donde se describe la inversión del hemo

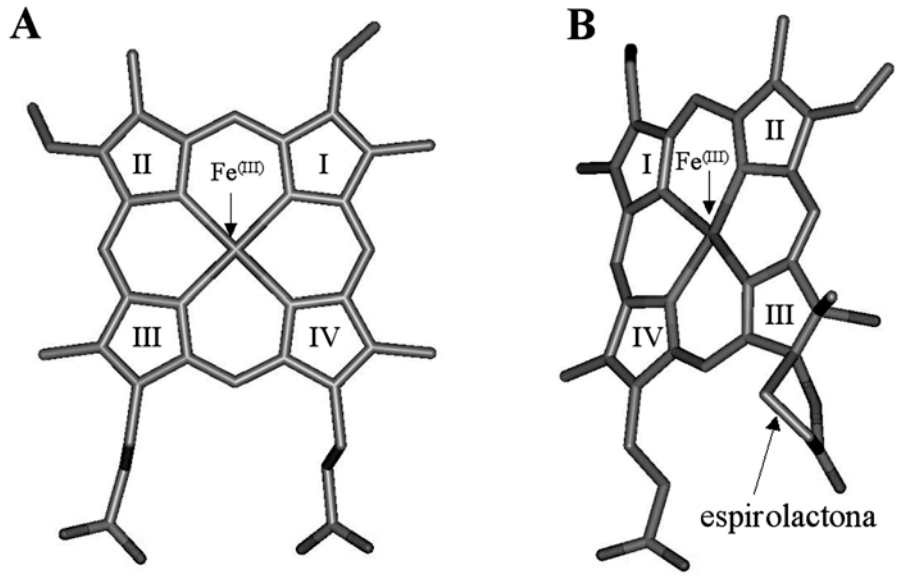


Figura 3. *A. El hemo b (Fe protoporfirina IX) en la catalasa humana (HEC). B. El hemo d de la CAT-1 donde se muestra el anillo de la espirolactona. El hemo d tiene una rotación de 180º respecto al hemo b de la HEC.*

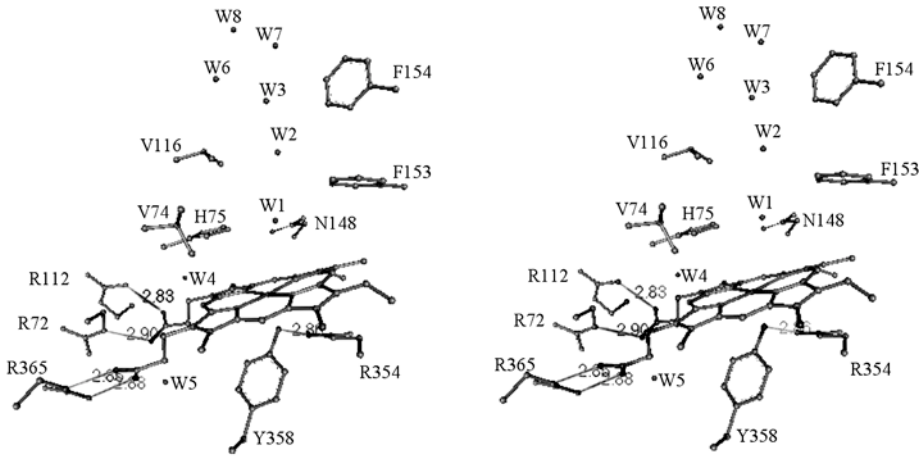


Figura 4. *Sitio activo en estéreo de la catalasa humana (HEC). Se muestran los aminoácidos esenciales Y358, H75 y N148, las argininas R112, R72 y R365 que hacen puentes salinos con los propionatos del hemo, las moléculas de agua W1-W8 y algunos de los aminoácidos hidrofóbicos que forman el canal principal V74, V116, F153 y F154.*

(12). La inversión del hemo también se ha descrito en otras hemoproteínas como la mioglobina y el citocromo *b*5 (19). Se desconoce si la inversión del hemo en las catalasas tiene un efecto funcional (16).

El hemo divide la cavidad donde se encuentra en dos: la parte proximal está más cerca de los ejes de simetría de la molécula y la distal más alejada del centro y más próxima a la superficie. Hay tres aminoácidos esenciales involucrados en la catálisis: una His y una Asn en el lado distal y una Tyr en el lado proximal del hemo. El oxígeno de la Tyr esencial se coordina con el FeIII del hemo. El lado distal de la cavidad del hemo es muy hidrofóbico y tiene varias Phe conservadas (Fig. 4) (15, 16). Otro aminoácido hidrofóbico importante en el lado distal del hemo es el que precede a la His esencial, el cual es una valina en PVC, BLC, HPII, SCCA, HEC y CAT-1, una Met en PMC y una *cis*-Pro en MLC. Este aminoácido está en contacto directo con el anillo del hemo y en la PMC la metionina está oxidada formando una metionina sulfona. La sulfona impide el acceso de algunos compuestos grandes al sitio activo (9). Al cambiar la valina 111 por una alanina en la SCCA, la enzima tiene una actividad de catalasa reducida pero la actividad de peroxidasa aumenta para los sustratos grandes (1).

En la cavidad distal del hemo de todas las estructuras de catalasas existen moléculas de agua que están relativamente fijas (3). El sustrato llega al sitio activo a través de un canal hidrofóbico de 25 Å de largo que está lleno de moléculas de agua. En la HEC se propone un mecanismo denominado “la regla molecular” para seleccionar al H_2O_2. En dicho mecanismo participan cuatro moléculas de agua localizadas en el lado distal del sitio activo. Las cuatro moléculas de agua están confinadas por las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos Val74, Val116, Pro129, Phe153, Phe154 y Trp168 que conforman un canal muy estrecho (2-3 Å), permitiendo que sólo el agua, el H_2O_2 y moléculas pequeñas (como metanol, etanol, ácido nítrico y fórmico) lleguen al hemo. En la Fig. 4 se observan las moléculas de agua W1-W3 y W6-W8 que forman parte del canal principal, W4 y W5 están cercanas a los propionatos del hemo. W1-W3 y W6 son las cuatro moléculas de agua propuestas en el mecanismo de “la regla molecular”. También se muestran algunos aminoácidos del canal hidrofóbico en la HEC (4). En las catalasas está descrito un segundo canal que llega al sitio activo, denominado canal menor (30 Å de largo). El canal principal y el canal menor sugieren un modelo en el cual un canal sería usado para la llegada del sustrato y el otro para la salida de los productos (11). Dichos canales evitarían la interferencia del sustrato y los productos y podría explicar el número de recambio tan elevado en las catalasas de 10^5 a 10^6 por segundo.

Las catalasas BLC, PMC, MLC, SCCA y HEC tienen como grupo prostético un hemo *b* (Fe protoporfirina IX) (Fig. 3A) (1, 4, 8, 9, 13, 14). En cambio las catalasas PVC y HPII tienen la configuración de un hemo modificado, llamado hemo *d*, con una cis-hidroxi-γ-espirolactona en el anillo pirrólico III (Fig. 3B). El hemo *d* es el resultado de la dihidroxilación en el anillo III del hemo *b* donde uno de los hidroxilos forma el ciclo de la lactona con uno de los propionatos. No hay cambios importantes en el volumen entre las estructuras del hemo *b* y *d* (15, 16, 19). La PVC y la HPII tienen casi exclusivamente hemo *d* y en ciertos casos una pequeña fracción de hemo *b*. En el caso de la CAT-1 se encontró una mezcla de hemo *b* (57%) y hemo *d* (43%) (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación). La BLC nativa aislada tiene 50% de su hemo como biliverdina y bilirrubina, que son productos de la degradación oxidativa del hemo (19).

La mutante N201H de la HPII tiene hemo *b* con la misma orientación que en la enzima nativa. Lo anterior indica que el hemo *b* no se modifica a hemo *d in vivo* por un sistema especializado previo a la inserción del hemo en la enzima. El hemo *b* se une al sitio activo de la enzima en donde se convierte en hemo *d* en los primeros ciclos catalíticos. Se ha observado la conversión del hemo *b* en hemo *d* en presencia del

H_2O_2 en la mutante N201H (7). Existen otras mutantes (V169C, H392Q, H392A) de la HPII que tienen hemo *b*. La mutante H392E tiene una mezcla de hemo *b* e isómeros *cis* y *trans* de hemo *d*, lo cual sugiere un papel para esta histidina en la conversión del hemo. La substitución de los aminoácidos que interactúan con el hemo, la Gln 419 y la Ser 414, también afecta a la proporción *cis*:*trans* de la espirolactona en el hemo *d* (6).

Se ha reportado que la CAT-1 se modifica durante su almacenamiento aumentando su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Actualmente se sabe que dicha modificación se debe al oxígeno en singulete. La oxidación tiene lugar en el hemo y también ocurre durante la diferenciación del hongo y en condiciones de tensión metabólica. No se sabe exactamente en qué consiste la modificación de la CAT-1 por el oxígeno, pero posiblemente el oxígeno sea el responsable de la dihidroxilación del hemo que da origen al hemo *d* (2). El hemo de la CAT-1 totalmente modificada (CAT-1e), analizado en una cromatografía en fase reversa con una columna hidrofóbica, da un pico ligeramente más hidrofóbico que el de la CAT-1 no modificada (CAT-1a). El espectro de absorción del hemo de la CAT-1e es más asimétrico que el de la CAT-1a (2). La modificación por el oxígeno no afecta a la actividad de la enzima. La CAT-1e tiene una k_{cat} y una eficiencia catalítica $k_{cat}/K_{m\ (H2O2)}$ similares a la CAT-1a. Sin embargo, comparada con la CAT-1a, la CAT-1e es más susceptible a la inhibición reversible por cianuro, es más susceptible a la degradación por subtilisina y la reacción catalizada tiene una mayor energía de activación (Díaz A, Muñoz-Clares R A y Hansberg W; Díaz A, Muñoz-Clares R A, Rangel, P y Hansberg W. Manuscritos en preparación). Es probable que la modificación de la CAT-1 por el oxígeno sea una señal para su degradación.

La diferencia importante en el grupo hemo de las catalasas grandes respecto de las pequeñas es que las grandes tienen un hemo modificado ó hemo *d*. El oxígeno podría ser la especie que dihidroxila el anillo III del hemo de la HPII, de la PVC y de la CAT-1 para formar el hemo *d* con la espirolactona, lo cual no se ha observado en ninguna catalasa pequeña. La modificación del hemo en las catalasas grandes no afecta a su actividad, pero probablemente sí a su recambio (2). Posiblemente no exista una relación entre la modificación del hemo y la resistencia a la inhibición e inactivación por sustrato.

EL NADPH

Las catalasas pequeñas SCCA, BLC, MLC, PMC y HEC tienen un sitio de unión para el NADPH por cada subunidad que está localizado a 19 Å del Fe del hemo. El NADPH se une a las catalasas con un plegamiento único entre las oxidorreductasas. Los aminoácidos de la cavidad que une el NADPH están muy conservados en las catalasas que unen ese dinucleótido (4, 9). El anillo de la adenina del NADPH está en una pequeña cavidad conformada por varios aminoácidos hidrofóbicos (Ile177, Leu428 y Leu429 en PMC). El grupo 2' fosfato de la adenina ribosa interactúa con la cadena lateral de una arginina conservada (Arg182 en PMC). Una histidina (His284 en PMC) interactúa con el grupo pirofosfato y la nicotidamina (9). La unión del nucleótido en la BLC y en la PMC es muy fuerte (constante de disociación, K_D, < 5 nM). La SCCA no une al NADPH tan fuertemente (K_D < 2 μM), ya que tiene una Gln301 en lugar de la histidina que interactúa con el dinucleótido. Otras catalasas con baja afinidad por el NADPH son las de plantas, que presentan un ácido glutámico en la posición de la histidina (1, 4). En la estructura de la CatF, que está relacionada filogenéticamente con las catalasas de las plantas, no se encontró la molécula de NADPH y los aminoácidos que participan en la unión del nucleótido están cambiados (12).

En la HEC se ha observado que sólo dos subunidades tienen el NADPH y dos carecen del dinucleótido, lo cual permite examinar la conformación del sitio de unión sin el NADPH. La Phe198, la Val450 y la His305, que interacciona con el pirofosfato, son los aminoácidos que tienen cambios conformacionales al unirse el NADPH. Los cambios conformacionales en la HEC son mayores que los observados en la PMC, otra catalasa para la cual se cuenta con las estructuras con y sin el NADPH (4, 9).

Los resultados bioquímicos muestran que el NADPH está implicado en una reacción redox con el hemo. Las catalasas podrían utilizar el NADPH como una molécula donadora de electrones para evitar la formación de los compuestos II y III que inactivan a la enzima. Las catalasas grandes no unen al NADPH pero tampoco tienden a formar los compuestos II y III, aunque no se conoce la razón por la cual no se inactivan por sustrato. Se han propuesto dos rutas de transferencia de electrones del NADPH al hemo en la PMC. En la ruta más corta el movimiento del electrón sería nicotinamida (C4)-→-Pro130-→-Ser196. El hecho de que este último aminoácido tenga ángulos dihedros desfavorables en la cadena principal podría tener que ver con la transferencia de electrones (16).

En un estudio con dos mutantes de PMC, la F194Y y la F215Y, se muestra que en las catalasas existen dos mecanismos en la reacción con nucleótidos: uno "directo", por el cual el nucleótido reduce el compuesto I en una reacción de dos electrones, y un segundo mecanismo "disparado por un radical", el cual involucra un radical tirosilo en un proceso de transferencia de un electrón (ó dos reacciones secuenciales de un electrón) (20).

ENLACES COVALENTES INUSUALES

En la estructura cristalográfica de la catalasa HPII de *E. coli* a una resolución de 1.9 Å se encontró un enlace covalente inusual entre la His392 y la Tyr415 que se coordina con el FeIII del hemo (11). El enlace es entre el Nδ del imidazol de la His392 y el Cβ de la Tyr415 (Fig. 5A). La distancia de este enlace es de 1.6 Å y está conservado en las cuatro subunidades de la HPII. Esta distancia es la que se espera para un enlace C-N (1.48 Å). Los mapas de densidad electrónica muestran una clara conexión entre la His y la Tyr y tienen una densidad electrónica tan marcada como la encontrada en los enlaces covalentes de la cadena principal. Dicho enlace covalente se confirmó por un análisis de espectrometría de masas de los péptidos obtenidos con una digestión con tripsina. En contraste, las dos mutantes inactivas H128A y H128N no presentan el enlace covalente His-Tyr y el hemo *d*, por lo cual se propuso inicialmente que la reacción de la formación del enlace His-Tyr y la modificación del hemo están acopladas (21). Si embargo, la mutante N201H presenta el enlace His-Tyr y el hemo *b*, lo que sugiere que las dos reacciones están desacopladas. Tanto la modificación del hemo *b* como la formación del enlace covalente His-Tyr parecen necesitar de la actividad catalítica. Se ha propuesto que el compuesto I actúa como iniciador de estas reacciones (7). En particular, para la formación del enlace covalente, además del compuesto I, se propone que también se forman radicales libres que dan lugar a un reacomodo de electrones (21).

La CAT-1 de *N. crassa* a una resolución de 1.75 Å presenta un enlace covalente equivalente al de la HPII. En este caso, el enlace es entre el azufre de la Cys356 y el Cβ de la Tyr379 que coordina el Fe del hemo (Fig. 5B). La densidad electrónica y la distancia de enlace de 1.9 Å apoyan la existencia de este enlace covalente Cys-Tyr (Díaz A, Rudiño-Piñera E, Arreola R, Horjales E y Hansberg W. Manuscrito en preparación).

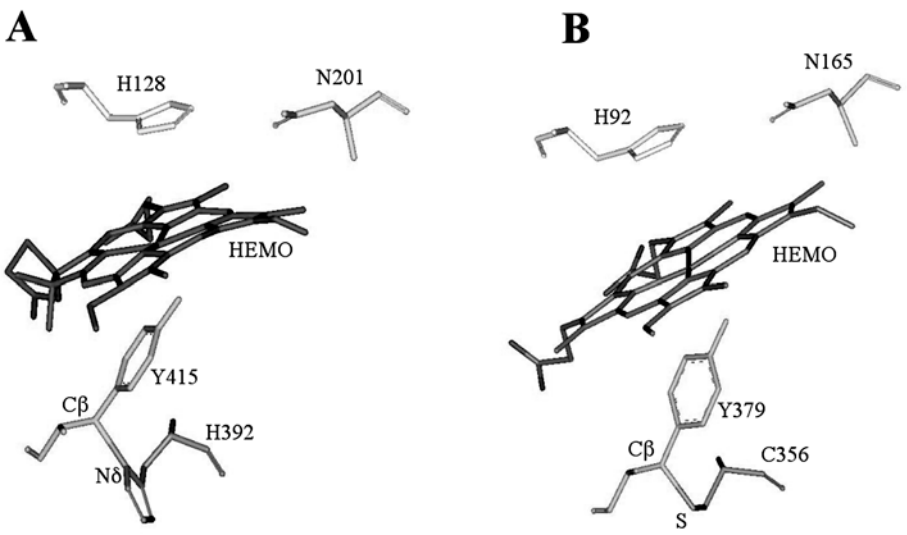


Figura 5. *A. El enlace covalente inusual en la catalasa HPII de E. coli entre el Nd de la H392 y el Cβ de la Y415 que coordina al Fe del hemo. B. El enlace covalente inusual en la CAT-1 de N. crassa entre el S de la C356 y el Cβ de la Y379 esencial.*

En la mutante V169C de la HPII se ha descrito un enlace covalente inusual entre el azufre de la Cys169 y el Cε del anillo imidazol de la His128 esencial. La distancia del enlace es de 1.87 Å, consistente con un enlace covalente, y tiene la densidad electrónica adecuada. El péptido resultante se detectó con un análisis de espectrometría de masas de una digestión con tripsina. Este enlace Cys-His no es equivalente al de la HPII nativa o al de la CAT-1, ya que se encuentra en el lado distal del hemo y la tirosina esencial no participa en él (6).

La presencia de los enlaces covalentes inusuales parecen ser exclusivos de las catalasas grandes, pues no se ha observado en las estructuras de las catalasas pequeñas. El enlace His-Tyr en la HPII no participa en la resistencia de la enzima a la desnaturalización, ya que una mutante sin el enlace covalente es igual de resistente a la desnaturalización que la enzima nativa (17). La presencia del enlace His-Tyr en la HPII debe introducir cierta rigidez en el sitio activo de la HPII y podría facilitar el movimiento de electrones en una región grande (21). Las catalasas grandes no unen NADPH pero difícilmente forman los compuestos II y III inactivos (5). Los enlaces covalentes inusuales de la HPII y de la CAT-1 podrían proporcionar un mecanismo alternativo para evitar la formación de los compuestos II y III. Sin embargo, no hay evidencia experimental de cuál es la función de dichos enlaces covalentes.

Las catalasas no son las únicas hemoproteínas que tienen enlaces covalentes inusuales. La citocromo *c* oxidasa bovina, determinada a 2.3 Å de resolución, presenta un enlace covalente en el sitio activo entre el Nε del grupo imidazol de la His240 y el Cε del grupo fenol de la Tyr244. La Tyr244 acidificada por el enlace covalente del nitrógeno del imidazol es un posible donador de protones para la reducción del O_2 por la enzima (22).

La catalasa-peroxidasa de *Haloarcula marismortui*, determinada a 2.0 Å de resolución, es otro ejemplo de enlaces covalentes inusuales. Esta enzima tiene dos enlaces covalentes entre las cadenas laterales de tres aminoácidos que están cercanos al sitio activo. En este caso el enlace es entre el Cε1 de la Tyr218 y el

Cη2 del Trp95, y entre el Cε2 de la Tyr218 y el Sδ de la Met244. Las distancias entre los átomos unidos son 1.68 Å en Tyr218-Trp95 y 1.72 Å en Trp95-Met244. Los enlaces covalentes fijan dos asas grandes en la superficie de la enzima que cubre el canal de acceso del sustrato al sitio activo. Estos enlaces covalentes pueden ser importantes para la actividad de catalasa de esta catalasa-peroxidasa. Sólo la actividad de catalasa y no la de peroxidasa se pierde cuando se muta el Trp95. Se está investigando el papel funcional de estos enlaces covalentes (23).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las catalasas tienen una organización tridimensional única y muy conservada. Los monómeros se entrelazan para formar dímeros unidos fuertemente en el tetrámero, lo cual hace que las catalasas sean enzimas muy resistentes y estables. Sin embargo, existen diferencias estructurales y funcionales entre ellas. Una diferencia es la presencia en las catalasas grandes del dominio C-terminal semejante a la flavodoxina, cuya función se desconoce. En cambio, las catalasas pequeñas tienen un sitio de unión para el NADPH que funcionaría como una molécula donadora de electrones evitando la formación de los compuestos inactivos II y III. Las catalasas grandes son más resistentes a la desnaturalización y a la inhibición e inactivación por sustrato que las catalasas pequeñas. Otra diferencia es que las catalasas grandes como la HPII, PVC y la CAT-1 tienen un hemo modificado o hemo *d* y las catalasas pequeñas presentan hemo *b*. El hemo *d* aunque está oxidado no pierde su función. Finalmente las catalasas grandes como la HPII y la CAT-1 presentan enlaces covalentes inusuales que involucran la Tyr que coordina al Fe del hemo y cuya función se desconoce. Las catalasas grandes difícilmente forman los compuestos II y III inactivos a pesar de que no unen NADPH, por lo cual se propone que una posible función de los enlaces covalentes inusuales, sería evitar la formación de los compuestos inactivos.

Finalmente, es necesario obtener información estructural y cinética de proteínas con mutaciones específicas para contestar las preguntas pendientes sobre las catalasas, tales como: ¿Cuál es la función del dominio C-terminal en las catalasas grandes? ¿Por qué las catalasas grandes no forman los compuestos II y III inactivos? ¿Cuál es la función de los enlaces covalentes inusuales en las catalasas grandes? ¿Cuál es el papel funcional de la inversión del hemo?

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Wilhelm Hansberg la revisión de este artículo.

REFERENCIAS

1. Maté MJ, Zamocky M, Nyquirí LM, Herzog C, Alzari PM, Betzel C, Koller F y Fita I (1999) Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol *286*:135-149.

2. Lledías F, Rangel P y Hansberg W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. J Biol Chem *273*:10630-10637.

3. Murshudov GN, Grebenko AI, Brannigan JA, Anston AA, Barynin VV, Dodson GG, Dauter Z, Wilson KS y Melik-Adamyan WR. (2002) The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. Acta Cryst *D58*:1972-1082.

4. Putman CD, Arvail AS, Bourne Y y Tainer JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. J Mol Biol *296*:295-309.

5. Lardinois OM, Mestdagh M y Rouxhet PG (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta *1295*:222-238.

6. Maté MJ, Servinc MS, Hu B, Bujons J, Bravo J, Switala J, Ens W, Loewen PC y Fita I (1999) Mutants that alter the covalent structure of catalase hydroperoxidase II from *Escherichia coli.* J Biol Chem *274*:27717-27725.

7. Melik-Adamyan W, Bravo J, Carpena X, Switala J, Maté MJ, Fita I y Loewen PC (2001) Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. Proteins *44*:270-281.

8. Murshudov GN, Melik-Adamyan WR, Grebenko AI, Barynin VV, Vagin AA, Vainshtein BK, Dauter Z y Wilson KS (1992) Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution. FEBS Letters *312*:127-131.

9. Gouet P, Jouve HM y Dideberg O (1995) Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. J Mol Biol *249*:933-954.

10. Bravo J, Verdaguer N, Tormo J, Betzel C, Switala J, Loewen PC y Fita I (1995) Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*. Structure *3*:491-502.

11. Bravo J, Maté MJ, Scheneider T, Switala J, Wilson K, Loewen PC y Fita I (1999) Structure of catalase HPII from E*scherichia coli* at 1.9 Å resolution. Proteins *34*:155-166.

12. Carpena X, Soriano M, Klotz MG, Duckworth HW, Donald LJ, Melik-Adamyan W, Fita I y Loewen PC (2003) Structure of the Clade I Catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. Proteins *50*:423-436.

13. Murthy MRN, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N y Rossmann MG (1981) Structure of beef liver catalase. J Mol Biol *152*:465-499.

14. Fita I, Silva AM, Murthy MRN y Rossmann MG (1986) The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. Acta Crystallogr D *42*:497-515.

15. Vainshtein BK, Melik-Adamyan WR, Barynin VV, Vagin AA, Grebenko AI, Borisov VV, Bartels KS, Fita I y Rossmann MG (1986) Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. J Mol Biol *188*:49-61.

16. Bravo J, Fita I, Gouet P, Jouve HM, Melik-Adamyan W y Murshudov GN (1997) Structure of catalases. En: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Editor: Scandalios J G. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 407-445.

17. Switala J, O'Neil JO y Loewen PC (1999) Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. Biochemistry *38*:3895-3901.

18. Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, Lledías F y Hansberg W (2001) Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. Free Radic Biol Med *31*:1323-1333.

19. Murshudov GN, Grebenko AI, Barynin V, Dauter Z, Wilson KS, Vainshtein VK, Melik-Adamyan WR, Bravo J, Ferran JM, Ferrer JC, Switala J, Loewen PC y Fita I (1996) Structure of the heme *d* of *Penicillium vitale* and *Escherichia coli* catalases. J Biol Chem *271*:8863-8868.

20. Andreoletti P, Gambarelli S, Sainz G, Stojanoff V, White C, Desfonds G, Gagnon J, Gaillard J y Jouve MH (2001) Formation of a tyrosyl radical intermediate in *Proteus mirabilis* catalase by directed mutagenesis and consequences for nucleotide reactivity. Biochemistry *40*:13734-13743.

21. Bravo J, Fita I, Ferrer JC, Ens W, Hillar A, Switala J y Loewen PC (1997) Identification of a novel bond between a histidine and the essential tyrosine in catalase HPII of *Escherichia co*li. Protein Sci *6*:1016-1023.

22. Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Fei MJ, Libeu CP, Mizushima T, Yamaguchi H, Tomizaki T y Tsukihara T (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. Science *280*:1723-1729.

23. Yamada Y, Fujiwara T, Sato T, Igarashi N y Tanaka N (2002) The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. Nature Structural Biology *9*:691-695.

Problema Bioquímico I

Emma Saavedra
Correo E: emma_saavedra2002@yahoo.com

Biología Molecular. Análisis de secuencias de DNA en bases de datos disponibles en el internet.

La clonación y secuenciación del DNA y de genes se ha facilitado en gran medida por la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una técnica que involucra ciclos de desnaturalización de un DNA templado, seguidos por alineamiento de oligonucleótidos en los extremos 5'y 3' del DNA blanco y extensión con una DNA polimerasa termoestable. Este procedimiento permite amplificar el número de copias de un DNA blanco por 10^6 veces. Una vez amplificado y secuenciado un fragmento de DNA, es necesario establecer la identidad del mismo utilizando las bases de datos disponibles en el internet.

Durante una reacción de PCR utilizando como templado DNA genómico del parásito *Trypanosoma brucei*, se amplificó un fragmento de 300 pares de bases con la siguiente secuencia de nucleótidos:

5´CCATGGGGAAAGCTTGGTGTGGAGTATGTGATTGAGTCAACTGGCCTCTTCACAGT
GAAATCTGCTGCCGAGGGTCACCTCCGTGGTGGTGCTCGCAAGGTTGTCATCAGTGCC
CCCGCCTCTGGTGGCGCCAAGACGTTCGTGATGGGCGTGAACCACAACGACTACAACC
CTCGTGAACACCATGTGGTGTCGAACGCCTCATGCACAACTAATTGCCTCGCCCCACT
CGTGCACGTGTTGGTGAAGGAGGGCTTCGGCATCTCCACTGGCCTCATGACCACTGTT
CACTCGTACACA 3´.

Preguntas

1) ¿Cuál es la identidad del gen al que pertenece la secuencia?
2) ¿Cuál es el marco de lectura completo del gen?
3) ¿Cuáles son los porcentajes de similitud de la proteína codificada por el gen con las respectivas secuencias de proteínas de *Escherichia coli* y de humano?

PROBLEMA BIOQUÍMICO II

David Mendoza Cózatl y Rafael Moreno Sánchez
Correo E: davidmendozac@netscape.net

Bioenergética
Transporte de cadmio en cloroplasto

El cadmio es un metal pesado *no esencial*, el cual es tóxico para la mayoría de los organismos. *Euglena gracilis* es un protista fotosintético con una elevada capacidad de tolerancia y acumulación de cadmio, y la mayor parte del metal es acumulado en el cloroplasto. Para determinar la cinética de captación, y el mecanismo por el cual el cadmio es acumulado en el cloroplasto, se obtuvieron las velocidades iniciales de captación de cadmio en cloroplastos intactos de *Euglena gracilis.* Además, se evaluó el efecto de la temperatura y de diferentes inhibidores (CCCP, desacoplante y DCMU, inhibidor del Fotosistema II) sobre la velocidad de captación, para determinar a que tipo de energía está acoplado el transporte.

Tabla 1 Velocidades iniciales de transporte de cadmio en cloroplastos intactos de *Euglena gracilis* a diferentes temperaturas.

$CdCl_2$ (µM)	25 ºC	4 ºC
	nmol Cd min^{-1} mg^{-1}	
0	0	0
5	3.61	2.9
7.5	4.43	n.d.
10	6.62	4.12
15	7.73	n.d.
20	8.8	5.21
50	15.69	6.86
75	19.59	8.1
100	24.72	10.3
150	29.74	13.1
200	36.88	16.41

n.d. no determinada

Tabla 2 Efecto de inhibidores sobre el transporte de cadmio en cloroplastos de *Euglena gracilis*

Cloroplastos control (100 µM)	(100 µM $CdCl_2$) + DCMU	+ CCCP (50 µM)
nmol Cd min^{-1} mg^{-1}		
21.4 ± 4.6 (8)	19.4 ± 3 (3)	19 ± 4.2 (4)

promedio ± DE (n)

1.- Determinar los parámetros cinéticos (*Km* y *Vm*) de el o los componentes involucrados en el transporte de cadmio.

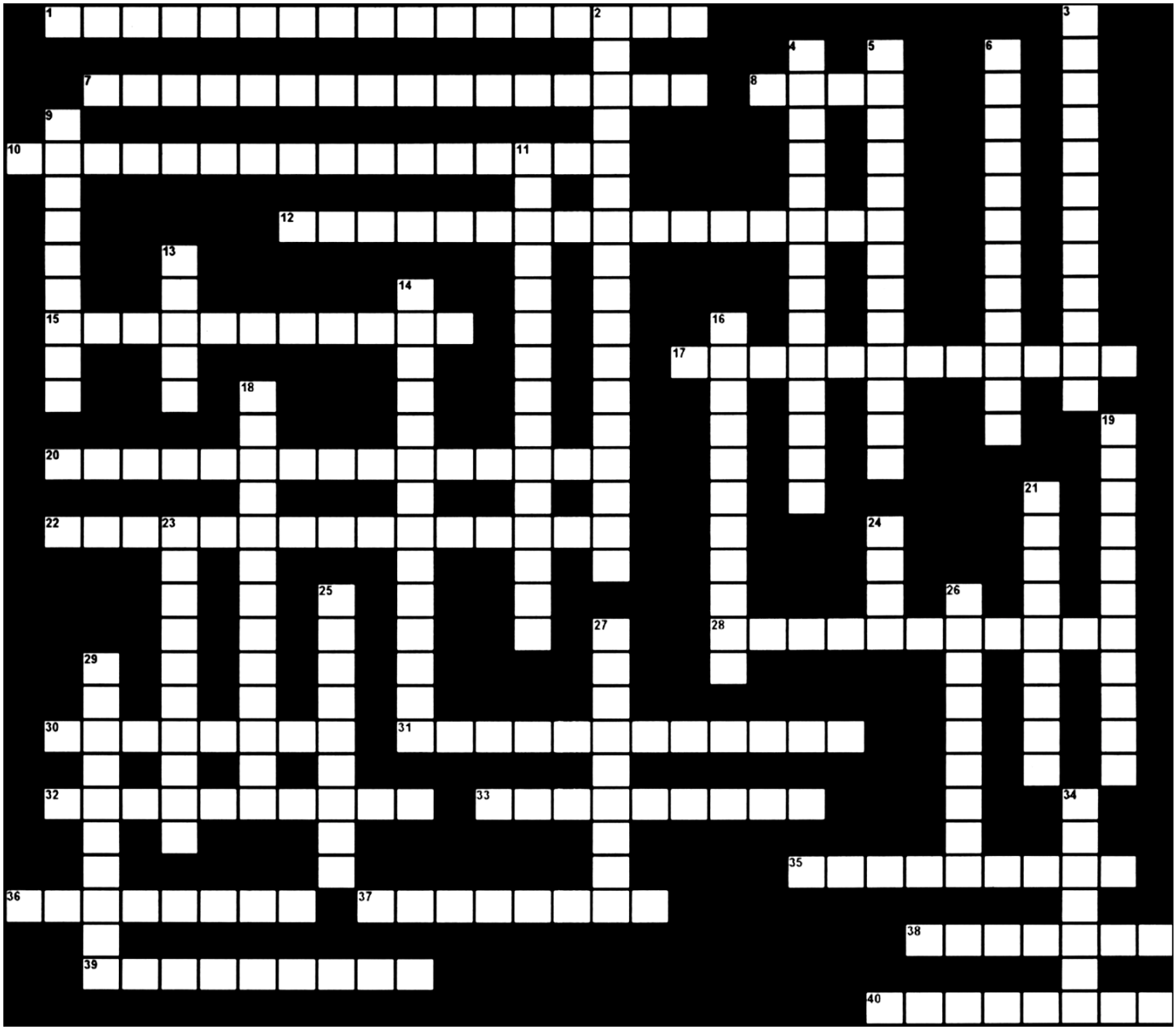
2.- ¿A que tipo de energía esta acoplado el transporte?

3.- Si la concentración máxima de cadmio libre en el citosol es de 10 µM y la de el cloroplasto es 5 µM, y durante la fotofosforilación se establece una diferencia de potencial eléctrico transmembranal ($\Delta\Psi$) entre el citosol y el estroma de –100 mV (interior negativo), calcule el cambio de energía libre (ΔG_{Cd}) para el transporte de cadmio del citosol al cloroplasto a 25 ºC. ¿Es termodinámicamente favorable este proceso?

CRUCIBIOQ

Yolanda Saldaña Balmori

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS



HORIZONTALES

1 Metabolito que proviene de la reacción de citrulina y aspartato en ella interviene ATP.

7 Proceso de pérdida de CO_2, en ocasiones depende de fosfato de piridoxal.

8 Producto de excreción final del NH_4^+ en vertebrados terrestres.

10 Procede de la piridoxina y es el grupo prostético de todas las transaminasas.

12 Interviene en la transferencia entre aminoácidos de grupos monocarbonados con estado de oxidación intermedia, en su composición intervienen: pteridina, *p*-aminobenzoato y glutamato.

15 Acción alostérica del GTP y ATP sobre la glutamato deshidrogenasa, aunado a que GDP y ADP son activadores alostéricos.

17 Reacción oxidativa que catalizada por la glutamato deshidrogenasa y con NAD^+ o $NADP^+$ libera del glutamato al ion amonio.

REB *22* (2): 87-88

20 Hormona liberada por la presencia de aminoácidos en el duodeno y que a su vez estimula la secreción de enzimas pancreáticas.

22 Enzima proteolítica que en el intestino delgado convierte al tripsinógeno en su forma activa.

28 Metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxilicos, aquí se incorporan la asparagina y el aspartato para su posterior oxidación.

30 Molécula formada a partir de glicina, arginina y metionina, si se fosforila constituye un importante reservorio de energía en el músculo.

31 Así se designan a los animales acuáticos que excretan el nitrógeno en forma de amoniaco.

32 Hormona que se produce en las células neuronales y suprarrenales a partir de tirosina.

33 Producto de descarboxilación de la histidina, es un vasodilatador en los tejidos animales, la sobreproducción forma parte de la respuesta alérgica.

35 Mecanismo por el cual tanto los aminoácidos de la dieta como los provenientes de la degradación de las proteínas generan energía.

36 Enzima de las células exocrinas del páncreas, es secretada como zimógeno, hidroliza uniones peptídicas donde el carboxilo proviene de arginina y lisina.

37 Aminoácido que no forma parte de las proteínas, se genera por la acción de la arginasa en el citosol de los hepatocitos.

38 Aminoácido que es un derivado cíclico de otro aminoácido, en su síntesis intervienen entre otras enzimas la glutamato cinasa y la glutamato deshidrogenasa.

39 Enfermedad genética en donde hay un proceso defectuoso de la tirosinasa, se expresa por falta de pigmentación en cabello y piel.

40 Producto terminal de la serina que mediante la deshidratasa específica pierde primero y gana después una molécula de agua.

VERTICALES

2 Enzimas que catalizan la transferencia de un grupo α-amino de un aminoácido a un α-cetoácido.

3 Así se designan a los aminoácidos que al degradarse se convierten en piruvato, alfa cetoglutarato, succinil coenzima A, fumarato y oxalacetato.

4 Mecanismo por el cual un aminoácido y un cetoácido intercambian los grupos funcionales amino y ceto.

5 Clase química a la que pertenecen los neurotransmisores: noradrenalina, adrenalina y dopamina; están relacionadas con cambios en la presión sanguínea.

6 Llamados así a la mayoría de los vertebrados terrestres cuya forma de excretar el NH_4^+ es como ácido úrico.

9 Nombre del tercer aminoácido que junto con arginina y ornitina, Krebs y Henseleit encontraron que estimulaba la formación de urea.

11 Enzimas secretadas por el intestino delgado, su función es hidrolizar residuos amino terminales de péptidos cortos.

13 Ácido mediante el cual se excreta el NH_4^+ en aves y reptiles terrestres.

14 Padecimiento debido a un defecto genético en la enzima que lleva a cabo una hidroxilación y con ello se impide la transformación de la fenilalanina en tirosina.

16 Se designan así a los aminoácidos que para su degradación se convierten primero en acetil coenzima A o en acetoacetil coenzima A.

18 Enzima proteolítica que secretada como su precursor se transforma en activa por la acción de la tripsina, hidroliza uniones peptídicas donde el carbonilo proviene de fenilalanína, tirosina y triptofano.

19 Zimógeno secretado por las células principales del estomago, se convierte en enzima proteolítica activa ante la pérdida de 42 residuos de aminoácidos.

21 Se sintetiza a partir de NH_4^+ y de α-cetoglutarato por la acción de la glutamato deshidrogenasa.

23 Aminoácidos que son indispensables para los humanos y que deben ingerirse en la dieta.

24 Siglas de γ-aminobutirato, es un neurotransmisor, su deficiencia se le ha relacionado con la epilepsia.

25 Es la forma en la que se transporta el amoniaco; producida por la reacción de este compuesto tóxico con el glutamato y es una molécula neutra que puede pasar a través de las membranas.

26 .Aminoácido indispensable, como S-adenosil derivado es la fuente principal de grupos metilo en el organismo.

27 Tripéptido formado por glicina, glutamato y cisteína; tiene acción redox, ayuda a eliminar a peróxidos tóxicos.

29 Vitamina B_6 de la cual procede el grupo prostético de todas las transaminasas.

34 Coenzima que participa en el catabolismo de los aminoácidos al intervenir en la transferencia de la forma más oxidada del carbono (CO_2).

Solución al Problema Bioquímico I

En cualquier procesador de palabras introducir la secuencia de nucleótidos para su fácil manipulación.

1) La base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih-.gov) tiene la herramienta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) que es una serie de programas que busca similitudes en todas las bases de datos de secuencias disponibles, independientemente si lo que se compara es DNA o proteína. Existen el "nucleotide BLAST", "protein BLAST" o "translated BLAST". Este último programa permite la comparación de una secuencia de nucleótidos traducida a secuencia de aminoácidos en los seis marcos de lectura posibles (esto es, los marcos de lectura que se derivan de la secuencia directa y la secuencia antiparalela), los cuales son comparados con el banco de secuencias de proteínas.

   La secuencia de nucleótidos problema, al ser comparada utilizando las opciones "nucleotide" o "translated" BLAST (Fig. 1), indica que el marco de lectura +1 (esto es, el marco de lectura que inicia con el primer nucleótido de la secuencia directa) tiene 100% de identidad con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glicosomal (gGAPDH) *de T. brucei*, el cual es un gen que ya ha sido reportado. Para efectos ilustrativos, supongamos que la secuencia del gen no ha sido reportada en un artículo científico.

(1)gi|4105581|gb|AAD02471.1| glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Trypanosoma brucei gambiense](2)Length = 194

(3)Score = 207 bits (528),(4) Expect = 2e-53 (5)Identities = 100/100 (100%),
(6)Positives = 100/100 (100%) (7)Frame = +1

```
Query: 1   PWGKLGVEYVIESTGLFTVKSAAEGHLRGGARKVVISAPASGGAKTFVMGVNHNDYNPRE  180
            PWGKLGVEYVIESTGLFTVKSAAEGHLRGGARKVVISAPASGGAKTFVMGVNHNDYNPRE
Sbjct: 67   PWGKLGVEYVIESTGLFTVKSAAEGHLRGGARKVVISAPASGGAKTFVMGVNHNDYNPRE  126

Query:      181 HHVVSNASCTTNCLAPLVHVLVKEGFGISTGLMTTVHSYT  300
            HHVVSNASCTTNCLAPLVHVLVKEGFGISTGLMTTVHSYT
Sbjct: 127  HHVVSNASCTTNCLAPLVHVLVKEGFGISTGLMTTVHSYT  166
```

Figura 1. *Alineamiento tipo "translated BLAST" de la secuencia problema con el banco de datos del NCBI. "Query" indica la secuencia problema que se está comparando y "Sbjct" indica la secuencia con la que tiene similitud. La secuencia entre ambas es la secuencia "consenso" para ese alineamiento. Los números al inicio y al término de cada secuencia corresponden a la numeración de las secuencias comparadas. (1) indica el identificador con el que se puede tener acceso a la información de la secuencia "Sbjct"; 2) indica la longitud total de la secuencia subject; (3) indica el puntaje obtenido para ese alineamiento: mientras más alto el puntaje, mejor es el alineamiento; (4) este valor indica el ruido de fondo que existe para este alineamiento. Mientras más cercano a "0" indica que hay menor probabilidad de encontrar similitud entre las dos secuencias debido puramente al azar; (5) indica el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias (6)este valor es similar al anterior pero también considera las sustituciones conservadas, por lo que es mayor que el valor indicado en (5); (7) indica el marco de lectura en el que se encontró la secuencia "Query".*

2) Una vez identificado que el fragmento pertenece a la TbgGAPDH (*T. brucei* GAPDH glicosomal), para completar la secuencia de nucleótidos se puede consultar la base de datos del proyecto de secuenciación del genoma de dicho organismo en The Institute for Genomic Research (TIGR) http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/

   En dicha página es posible utilizar la herramienta "gene name search" que permite la búsqueda rápida de la secuencia de un gen en las anotaciones del genoma del organismo. Las anotaciones se refieren a los genes identificados o posibles genes de las secuencias obtenidas del genoma mediante el uso de programas computacionales . Bajo el término de "glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase" se obtienen dos anotaciones (43.m00297 y 43.m00295) que corresponden a las secuencias del gen de la TbgGAPDH. El gen consta de 1209 nucleótidos, el cual codifica para una proteína de 403 aminoácidos con la siguiente secuencia:

>43.m00297 | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
MSVALFFSSFLTVPYFPCICLSFCGAEFIRANQTSKRLTTNLNMTIKVGINGFGRIGRMV
FQALCDDGLLGNEIDVVAVVDMNTDARYFAYQMKYDSVHGKFKHSVSTTKSKPSVAKDDT
LVVNGHRILCVKAQRNPADLPWGKLGVEYVIESTGLFTVKSAAEGHLRGGARKVVISAPA
SGGAKTFVMGVNHNDYNPREHHVVSNASCTTNCLAPLVHVLVKEGFGISTGLMTTVHSYT
ATQKTVDGVSVKDWRGGRAAALNIIPSTTGAAKAVGMVIPSTQGKLTGMAFRVPTADVSV
VDLTFIATRDTSIKEIDAALKRASKTYMKNILGYTDEELVSADFISDSRSSIYDSKATLQ
NNLPNERRFFKIVSWYDNEWGYSHRVVDLVRHMAARDRAAKL

3) Para hacer un alineamiento de la secuencia de proteínas que obtuvimos para la TbGAPDH, con la secuencia de otros organismos, es necesario obtener las secuencias de la GAPDH de humano y *E. coli*. Las secuencias se pueden obtener utilizando la herramienta Entrez de la base datos del NCBI. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/)
Por ejemplo las secuencias con los números de acceso:
CAA06501 HumanGAPDH
X02662 *Ecoli*GAPDH
Corresponden a secuencias completas de los genes respectivos.
Una vez obtenidas las tres secuencias, el alineamiento se puede realizar en diversos servidores públicos.
La herramienta "BLAST" del NCBI del que se habló en párrafos anteriores permite el alineamiento de dos secuencias y proporciona un porcentaje de identidad entre ambas.
Utilizando este programa y haciendo alineamientos apareados se obtuvieron los siguientes porcentajes de identidad:
TbgGAPDH *vs* GAPDH humano: 54%
TbgGAPDH *vs* GAPDH *E.coli*: 52%
Otras herramientas para alineamientos múltiples disponibles en internet son:
Multalin: (http://protein.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) y el programa

ClustalW del European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/). Este último también realiza un análisis filogenético de las secuencias alineadas.
Utilizando el programa ClustalW se obtuvo el alineamiento (Fig. 2).

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```
Human    MSKRDIVLTNVTVVQLLRQPCPVTRAPPPPEPKAEVEPQPQPEPTPVREEIKPPPPPLPP  60
Ecoli    ------------------------------------------------------------
Tbrucei  --MSVALFFSSFLAVPYFPCICLSFCGAEFIRAN------------------------  32

Human    HPATPPPKMVSVARELTVGINGFGRIGRLVLRACMEKG-----VKVVAVNDPFIDPEYMV  115
Ecoli    -------------------MTIKVGINGFGRIGRIVFRAAQKRSD-------IEIVAIND-LLDADYMA  42
Tbrucei  --QTSKRLTTNLNMTIKVGINGFGRIGRMVFQALCDDGLLGNEIDVVAVVDMNTDARYFA  90
                              ***********:*::*  . .    :.:**: *   *. *:.

Human    YMFKYDSTHGRYKGSVEFR--------NGQLVVDNHEIS-VYQCKEPKQIPWRAVGSPYV  166
Ecoli    YMLKYDSTHGRFDGTVEVK-------DGHLIVNGKKIR-VTAERDPANLKWDEVGVDVV  93
Tbrucei  YQMKYDSVHGKFKHSVSTTKSKPSVAKDDTLVVNGHRILCVKAQRNPADLPWGKLGVEYV  150
         * :****.**:.. :*.       :. *:*:..* *  ::* :: * :*  *

Human    VESTGVYLSIQAASDHISAGAQRVVISAPSPD-APMFVMGVNENDYNPGSMNIVSNASCT  225
Ecoli    AEATGLFLTDETARKHITAGAKKVVMTGPSKDNTPMFVKGANFDKYAG--QDIVSNASCT  151
Tbrucei  IESTGLFTVKSAAEGHLRGGARKVVISAPASGGAKTFVMGVNHNDYNPREHHVVSNASCT  210
          *:**::  .:*  *: .**::**:.*: . :  ** *.* :.*    .:*******

Human    TNCLAPLAKVIHER-FGIVEGLMTTVHSYTATQKTVDGPSRKAWRDGRGAHQNIIPASTG  284
Ecoli    TNCLAPLAKVINDN-FGIIEGLMTTVHATTATQKTVDGPSHKDWRGGRGASQNIIPSSTG  210
Tbrucei  TNCLAPLVHVLVKEGFGISTGLMTTVHSYTATQKTVDGVSVKDWRGGRAAALNIIPSTTG  270
         *******.:*:  ..  ***  *******:  *********  *  *  **.**.*    ****:.**
```

```
Human    AAKAVTKVIPELKGKLTGMAFRVPTPDVSVVDLTCRLAQPAPYSAIKEAVKAAAKGPMAG    344
Ecoli    AAKAVGKVLPELNGKLTGMAFRVPTPNVSVVDLTVRLEKAATYEQIKAAVKAAAEGEMKG    270
Tbrucei  AAKAVGMVIPSTQGKLTGMAFRVPTADVSVVDLTFIATRDTSIKEIDAALKRASKTYMKN    330
         *****      *:*.   :************.:*******          :   :.   .   *.   *:*   *::      *   .

Human    ILAYTEDEVVSTDFLGDTHSSIFDAKAGIALN———DNFVKLISWYDNEYGYSHRVVDLL    400
Ecoli    VLGYTEDDVVSTDFNGEVCTSVFDAKAGIALN——DNFVKLVSWYDNETGYSNKVLDLI    326
Tbrucei  ILGYTDEELVSADFISDSRSSIYDSKATLQNNLPNERRFFKIVSWYDNEWGYSHRVVDLV    390
         :*.**::::**:**    .:       :*::*:**    :       *                .*.*::******    ***::*:**:

Human            RYMFSRDK—— 408
Ecoli            AHISK———- 331
Tbrucei          RHMAARDRAAKL 402
                   : :
```

Fig. 2 *Alineamiento de las GAPDH de T. brucei, humano (No. Acceso CAA06501) y E. coli (X02662). (*) indica identidad en las tres secuencias; (:) reemplazamiento conservado; (.) reemplazamiento semiconservado.*

Conclusiones

El creciente número de proyectos de secuenciación de los genomas de muy diversos organismos ha hecho necesario el surgimiento de programas computacionales y servidores públicos que permiten la comparación de secuencias de DNA o proteína. Las secuencias depositadas en los bancos de datos son información útil y fácilmente disponible que pueden ayudar en el avance del nuestro trabajo científico. Este problema bioquímico pretende servir como una pauta para la utilización de dicha información.

Respuesta al Problema Bioquímico II

Al graficar la velocidad de transporte contra la concentración de cadmio se obtienen a ambas temperaturas, curvas que no se ajustan a una hipérbola (cinética de Michaelis-Menten) (Fig. 1). La gráfica de dobles recíprocos muestra curvas convexas (Fig. 2). Estos resultados pueden interpretarse de dos maneras: (1) dos componentes están actuando simultáneamente en el transporte o bien, (2) una sola enzima presenta cooperatividad negativa (una curva cóncava se interpretaría como cooperatividad positiva). La gráfica de velocidad contra sustrato a 4 ºC define con mayor claridad dos componentes, de los cuales uno es completamente lineal sugiriendo que parte del transporte se lleva acabo por difusión simple. La curva de saturación presente a bajas concentraciones de cadmio, y claramente visible a 25°C, sugiere que la parte restante del transporte es mediado por una proteína.

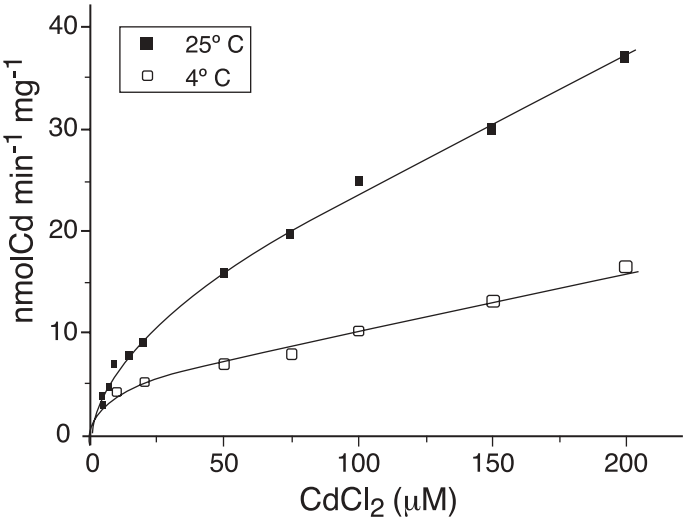


Figura 1

La *Vm* del componente saturable (18.8 nmoles Cd min $^{-1}$ mg^{-1} a 25 ºC), obtenida de la zona lineal en los dobles recíprocos a bajas concentraciones de Cd, será una *Vm* aparente (Vm_{app}) pues se encuentra modificada por el componente lineal. Sin embargo, esta Vm_{app} nos indica que por arriba de esta velocidad, el transporte es únicamente debido al componente lineal (difusión). De hecho, una regresión lineal con los datos de la Fig. 1 a 75, 100, 150 y 200 µM de $CdCl_2$, tiene un coeficiente de correlación de 0.995 (recuadro de la figura 3), y el valor de la pendiente (0.140) nos indica cuanto aumenta la velocidad de difusión por unidad de tiempo por cada µmol de Cd añadido L^{-1}.

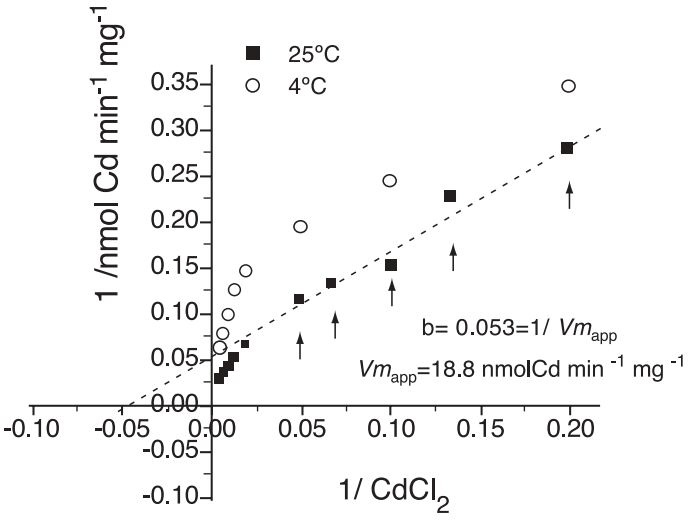


Figura 2

Conociendo la velocidad de difusión, y debido a que esta depende únicamente de la concentración de Cd añadido, la velocidad de transporte del componente saturable puede obtenerse restándole a la velocidad total la velocidad de difusión. Esta se obtiene al multiplicar la pendiente del componente lineal (0.140 nmol Cd min^{-1} mg^{-1} µM^{-1}) por la concentración a la cual se ensayó el transporte (Fig. 3). De los dobles recíprocos de las velocidades corregidas (Fig. 4) podemos obtener los valores reales de las constantes cinéticas para el componente saturable (*Vm* = 11 nmol Cd min $^{-1}$ mg $^{-1}$ y *Km* = 14.28 µM).

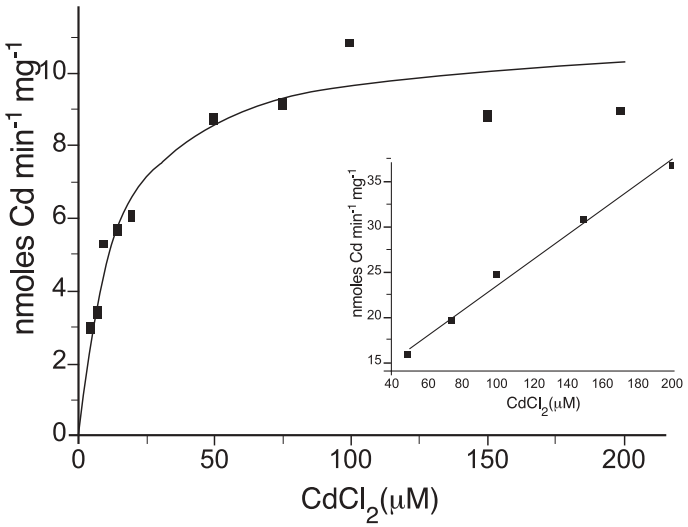


Figura 3

Los valores obtenidos por regresión no lineal, usando el programa Microcal Origin 5.0, al ajustar las velocidades iniciales de la Fig. 1 usando la ecuación v = (Vm*S / Km + S) + (m*S), concuerdan con los valores obtenidos por regresión lineal.

Por otro lado, que el transporte de Cd no haya sido afectado por un desacoplante (CCCP) o un inhibidor de la fotosíntesis (DCMU), indica que el transporte no esta asociado a un potencial electroquímico de protones y que no depende de la actividad de los fotosistemas. Debido a que una proteína esta involucrada, estos resultados sugieren que parte del cadmio entra al cloroplasto por difusión facilitada.

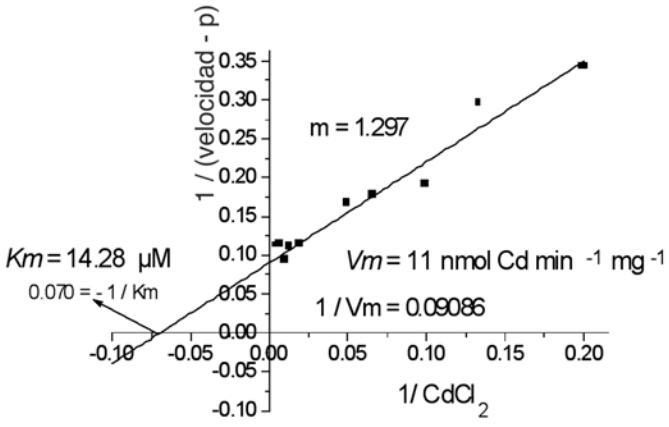


Figura 4

Finalmente, usando la ecuación $\Delta G_{Cd} = RT\ln ([Cd]_{dentro} / [Cd]_{fuera}) + Z_{Cd}\ \mathbf{F}\ \Delta\Psi$, donde R = 1.98 cal mol^{-1} K^{-1}, T = 298.15 (25ºC), Z_{Cd} = 2 (carga del ion), **F =** 23 080 cal mol^{-1} V^{-1} (Cte. de Faraday) y $\Delta\Psi$ = - 0.1 V (potencial de membrana) tenemos que:

$$\Delta G_{Cd} = 1.987 \times 298.15 \ln (5 \times 10^{-6}\ M / 10 \times 10^{-6}\ M) + [2 \times (23\ 080) \times (-0.1)]$$

durante la fotofosforilación, el potencial electroquímico del cadmio es ΔG_{Cd} = - 5.02 kcal mol^{-1}, por lo que el transporte de cadmio es termodinámicamente favorable.

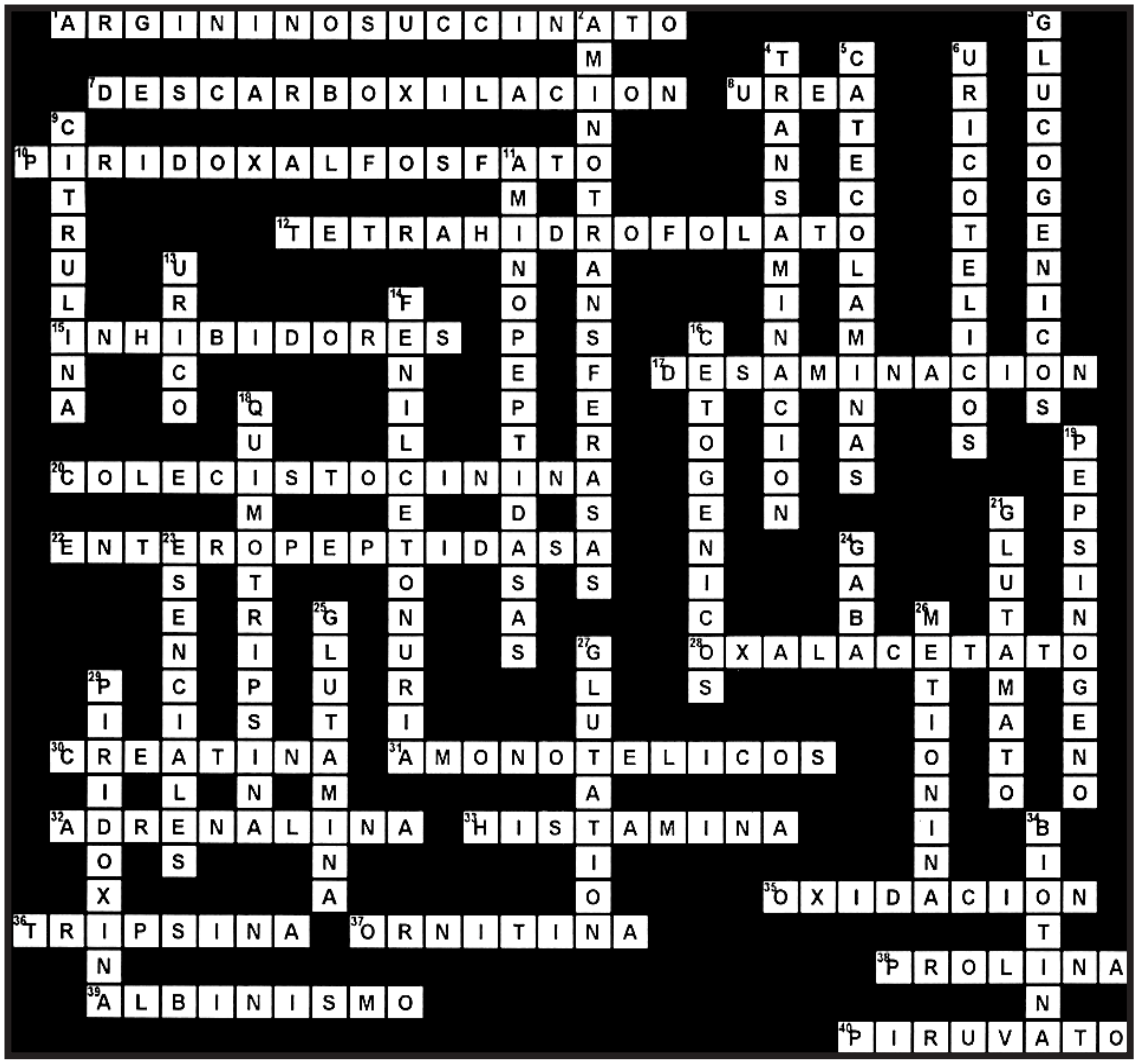
REFERENCIAS.

Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV (1998) Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. Plant Physiol 116 : 1413-1420.

Voet D and Voet JG (1990) Transporte a través de membranas. En : Bioquímica. Ed. OMEGA, Barcelona, España. pp. 520-544.

Solución al Crucibioq

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS



VOCABULARIO INGLÉS-ESPAÑOL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

(1.ª entrega)

VERÓNICA SALADRIGAS* Y GONZALO CLAROS**

Artículo reproducido con autorización de Panace@ , Boletín de Medicina y Traducción 2002; 3 (9-10) 13-28. http://www.medtrad.org/Panacea/PanaceaPDFs/Diciembre2002.htm

3'splice site: sitio de empalme 3', sitio de ayuste 3'.
→ SPLICE SITE.

3'UTR: 3'UTR.
→ TRAILER SEQUENCE.

5'splice site: sitio de empalme 5', sitio de ayuste 5'.
→ SPLICE SITE.

5'UTR: 5'UTR.
→ LEADER SEQUENCE.

acceptor site: sitio aceptor.
→ SPLICE SITE.

acceptor splice site: sitio aceptor.
→ SPLICE SITE.

allele: alelo.
Cada una de las posibles formas en las que existe un gen a consecuencia de una o más mutaciones.
Observación: la palabra *allele* se ha formado porapócope y cambio de la vocal «o» por «e» a partir de la voz *allelomorph,* que William Bateson había acuñado a comienzos del siglo XX (y que significa literalmente «forma alternativa»). Los alelos (o genes alélicos) están situados en LOCI idénticos en cromosomas homólogos. Véase HOMOLOGOUS CHROMOSOME y LOCUS.

allelomorph: alelomorfo.
→ ALLELE.

alternative splicing: corte y empalme alternativo, ayuste alternativo.
Proceso de obtención de ARNm distintos a partir de un mismo transcrito primario por alternancia de las posibilidades de corte y empalme (ayuste) intrónico. De resultas de este proceso, cada uno de los ARNm obtenidos contiene distintos exones del gen a partir del cual ha sido transcrito. Véase EXON y SPLICING.

anticoding strand: cadena no codificante.
→ NONCODING STRAND.

anticodon: anticodón.
Triplete de nucleótidos de un ARNt que se aparea con un codón específico del ARNm por complementariedad de bases a través de puentes de hidrógeno. El apareamiento es antiparalelo, de modo que el extremo 5' de una secuencia coincide con el extremo 3' de la otra, por ejemplo:
5'-ACG-3' (codón)
3'-UGC-5' (anticodón).
No obstante, para mantener la convención de escritura de las secuencias de nucleótidos en la dirección de 5' a 3' suele escribirse el anticodón al revés, con una flecha en dirección opuesta arriba:

antisense RNA: ARN antisentido, ARN complementario.
1 Molécula de ARN complementaria de una molécula de ARN transcrito, que al formar híbridos con esta última estorba el desempeño de su función; por ejemplo, si el ARN transcrito es un ARNm, puede llegar a impedir su traducción en proteína. En este último caso, también puede traducirse por «ARN antimensajero».
2 Molécula de ARN sintetizada in vitro que servirá de sonda en experimentos de hibridación molecular.
Observación: estos ARN pueden ser sintéticos o naturales. Cuando son sintéticos se suelen llamar *micRNA*, por *messenger-RNA-interfering complementary RNA* o *messenger interfering complementary RNA*, y suelen ser complementarios del extremo 5' de un ARNm. Los naturales desempeñan, por lo general, una función reguladora al disminuir la expresión del ARNm correspondiente.

antisense strand: cadena no codificante.
→ NONCODING STRAND.

antitemplate strand: cadena codificante.
→ CODING STRAND.
aRNA: ARNa.
→ ANTISENSE RNA.

* Doctora en Biología Molecular. Servicio de Traducción. Laboratorios Novartis Pharma AG. Basilea (Suiza). Dirección para correspondencia: *maria.saladrigas-isenring@pharma.novartis.com.*
** Doctor en Ciencias. Universidad de Málaga (España).

branch site: sitio de ramificación.
Es la región nucleotídica situada a una distancia de 20 a 40 nucleótidos del extremo 3' de los intrones del grupo II o III. Presenta la secuencia consenso CURAY, que aporta la adenina (A) necesaria con la que la guanina (G) del extremo 5' del intrón (recientemente separado de su exón «izquierdo») establecerá el enlace fosfodiéster 5'-2' que dará al intrón la forma característica de un lazo durante el corte y empalme. Un segundo corte en el extremo 3' del intrón libera el lazo (que luego se linealiza y acaba degradándose) y posibilita la unión de los dos exones. Véase INTRON, LARIAT y SPLICING SITE.

cap: caperuza, casquete, cofia.
Breve secuencia de nucleótidos añadidos en el extremo 5' de un ARNm eucariota mediante enlaces fosfodiéster 5'-5' después de la transcripción. Se trata, por lo general, de uno a tres guanilatos (GTP). Cada nucleótido añadido suele estar metilado en posiciones características.

catalytic RNA: ARN catalítico.
→ RIBOZYME.

cis-splicing: corte y empalme en *cis*, ayuste en *cis*.
Empalme o ayuste de exones de un mismo transcrito primario. Véase TRANS-SPLICING.

cistron: cistrón.
1 Segmento de material genético (ADN o ARN) que codifica un polipéptido y dentro del cual los pares de mutaciones en configuración *trans* originan una deficiencia o anomalía estructural en la correspondiente proteína o enzima (véase figura 1).
2 Mínima unidad de ADN o de ARN capaz de codificar un producto génico funcional. En los ARNm coincide con un marco de lectura abierto u ORF (*open reading frame*). Es sinónimo de «gen» en su tercera acepción. Véase GENE y OPEN READING FRAME.
Observación: la palabra *cistron* fue acuñada por Seymour Benzer en 1957 cuando realizaba ensayos genéticos con mutantes. En un ensayo *cis-trans* (*cis-trans test*), cuando dos mutaciones de un gen están en *cis*, el fenotipo es silvestre, mientras que cuando están en *trans* el fenotipo es mutante. De este análisis *cis-trans* procede la voz cistrón. Hoy en día el nombre ha caído en desuso debido a que los análisis genéticos se realizan por secuenciación y no por mutación. Nótese que cuando una proteína está constituida por un solo polipéptido (con independencia de que éste se repita), el concepto «un gen, una enzima» coincide con el de «un cistrón, un polipéptido».

coding region: secuencia codificante.
→ CODING SEQUENCE.

coding sequence: secuencia codificante.
1 En una molécula de ADN, cualquiera de los exones de un gen. Véase EXON.
2 En una molécula de ARN mensajero (ARNm), es la porción de la secuencia de nucleótidos que se traduce en polipéptido.

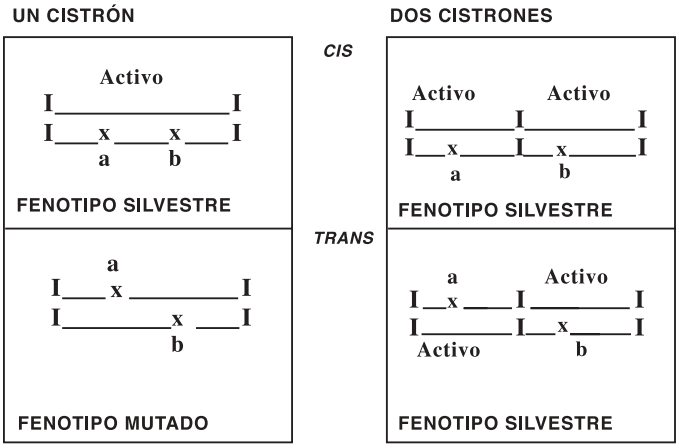


Figura 1

coding strand: cadena codificante, hebra codificante.
Cadena de ácido nucleico bicatenario (ADNbc, ARNbc) cuya secuencia de bases es idéntica a la del ARN transcrito (con la diferencia de que, en el ácido desoxirribonucleico, las timinas reemplazan a los uracilos). Es la cadena complementaria de la que sirve de plantilla para la transcripción del ARN.
Observación: la JCBN (Joint Commission on Biochemical Nomenclature) y la NC-IUB (Nomenclature Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) prefieren esta designación (*coding strand*) a cualquiera de las otras denominaciones posibles (*sense strand, antitemplate strand, nontranscribing strand, codogenic strand* y *plus strand*). Sin embargo, no faltan quienes consideran que la verdadera hebra codificante debe ser aquella a partir de la cual se transcribe el ARN.

codogenic strand: cadena codificante.
→ CODING STRAND.

codon: codón.
Secuencia de tres nucleótidos consecutivos en una molécula de ARNm. Codifica un aminoácido específico o las señales de iniciación o de terminación de la lectura de un mensaje. Véase START CODON y STOP CODON.

Observación: el DRAE recoge esta voz como palabra aguda y, por lo tanto, debe llevar acento prosódico (y ortográfico) en la última «o» (codón). Se usa asimismo, de forma más laxa, para nombrar los tripletes de bases de una cadena codificante o no codificante de un ácido nucleico genómico.

complementary RNA (cRNA): ARN complementario (ARNc).
1 Ribosonda. Véase RIBOPROBE.
2 ARN antisentido. Véase ANTISENSE RNA.

complementary sequence: secuencia complementaria
Secuencia de nucleótidos que se aparea con otra a través de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, tras lo cual ambas adoptan una estructura tridimensional de doble hélice.

complementary strand: cadena complementaria.
→ NONCODING STRAND.

cRNA: ARNc.
→ COMPLEMENTARY RNA.

deoxyribonucleic acid (DNA): ácido desoxirribonucleico (ADN).
Polímero de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces 5'-3' fosfodiéster. Es uno de los dos ácidos nucleicos naturales conocidos y la molécula que almacena la información genética por excelencia en los seres vivos.
Observación: la estructura tridimensional del ADN es la de dos largas hebras o cadenas que adoptan en conjunto el aspecto de una doble hélice antiparalela. Existen asimismo ADN monocatenarios, tricatenarios y circulares. Véase DOUBLE HELIX y RIBONUCLEIC ACID.

DNA: ADN.
→ DEOXYRIBONUCLEIC ACID.

DNA splicing: corte y empalme de ADN, ayuste de ADN.
→ SPLICING.

donor site: sitio donador.
→ SPLICING SITE.

donor splice site: sitio donador.
→ SPLICING SITE.

double helix: doble hélice.
Estructura tridimensional que adoptan las dos hebras del modelo de ADN propuesto por James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick en 1953 (por el que obtuvieron el Premio Nobel en 1962, junto con Maurice Hugh Frederick Wilkins). Es prácticamente idéntica a la estructura del ADN-B: los desoxirribonucleótidos de una hebra se concatenan mediante la unión del hidroxilo 3' de una desoxirribosa con el hidroxilo 5' de la desoxirribosa adyacente por un enlace fosfodiéster. Cada desoxirribonucleótido está formado a su vez por una base nitrogenada, que es la parte variable del ADN (adenina, citosina, timina o guanina), un azúcar (la desoxirribosa) y un grupo fosfato. Las dos hebras se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre bases complementarias (adenina-timina, citosina-guanosina). En la secuencia de bases reside la información genética.

double-stranded: bicatenario, de cadena doble, de hebra doble.
Adjetivo que califica a un ácido nucleico formado por dos cadenas de nucleótidos. Véase DOUBLESTRANDED DNA, DOUBLE-STRANDED RNA y DUPLEX.

double-stranded DNA (dsDNA): ADN bicatenario.
Molécula de ADN en la que dos cadenas de desoxirribonucleótidos con orientación opuesta (antiparalela) se unen mediante puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. Véase DNA.
Observación: la sigla española, ADNbc, apenas se utiliza.

double-stranded RNA (dsRNA): ARN bicatenario.
1 Molécula de ARN en la que dos cadenas de ribonucleótidos con orientación opuesta (anti- paralela) se unen mediante puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. Constituye el material genético de algunos virus (por ejemplo, los *Rotavirus*).
2 Cualquier secuencia de nucleótidos interna en una molécula de ARN monocatenario que se pliega sobre sí misma y forma apareamientos entre bases complementarias.
Observación: la sigla española, ARNbc, apenas se utiliza.

dsDNA: ADNbc.
→ DOUBLE-STRANDED DNA.

dsRNA: ARNbc.
→ DOUBLE-STRANDED RNA.

duplex: bicatenario, híbrido.
Adjetivo que se aplica a los ácidos nucleicos de dos cadenas o hebras. Según la clase de nucleótidos que componen estas cadenas (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos) admite distintas traducciones:

a) ***duplex RNA-DNA*** (ADN-ARN híbrido, doble hélice híbrida) cuando el ácido nucleico está formado por una hebra de ADN y otra de ARN;
b) ***duplex DNA*** (ADN bicatenario) cuando el ácido nucleico está formado por dos hebras de ADN (véase DOUBLE-STRANDED DNA);
c) ***duplex RNA*** (ARN bicatenario) cuando el ácido nucleico está formado por dos hebras de ARN (véase DOUBLE-STRANDED RNA).
Observación: los libros de texto también recogen las variantes «doble» y «dúplex». No son incorrectas desde el punto de vista semántico, pero sí mucho menos frecuentes que el adjetivo «bicatenario».

duplex DNA: ADN bicatenario.
→ DUPLEX.

duplex RNA: ARN bicatenario.
→ DUPLEX.

editing: corrección.
→ PROOFREADING**.**

exon: exón.
1 Secuencia de desoxirribonucleótidos intragénica que se transcribe y se conserva en la molécula de ARN madura (ARNm, ARNr o ARNt).
2 En el transcrito primario, es la secuencia de ribonucleótidos que no se elimina durante el proceso de empalme o ayuste, y que, por lo tanto, forma parte del transcrito maduro (ARNm, ARNr, ARNt). Véase SPLICING**.**
Observación: exon es una palabra formada por apócope y aféresis a partir de la expresión *expressed region*. Una unidad de transcripción comienza y termina en un exón; los exones inicial y final corresponden a los extremos 5' y 3' del ARN, respectivamente

extein: exteína.
Secuencia de aminoácidos no eliminada de una proteína precursora recién traducida en la reacción de transpeptidación que libera las inteínas. Véase INTEIN y SPLICING.
Observación: las exteínas equivalen conceptualmente a los exones de los ácidos nucleicos.

gene: gen.
Desde los albores de la genética clásica hasta la actualidad se ha definido de distintas maneras:
1 En genética clásica (mendeliana), cuando todavía se desconocían las bases moleculares de la herencia (aproximadamente de 1910 a 1930), era *la unidad hereditaria de un organismo que gobierna el desarrollo de un carácter y puede existir en formas alternativas*. Por entonces, esta unidad hereditaria o de transmisión (cada gameto incluía una unidad de cada gen) era considerada asimismo la unidad más pequeña e indivisible de recombinación, mutación y función.
2 El descubrimiento del ADN como material hereditario (Avery, McLeod y McCarty, 1944) y los experimentos de Beadle y Tatum (1941) y de Horowitz y Srb (1944) llevaron a percibir la función de un gen individual como el responsable de la síntesis de una única enzima. Un gen se transformó, pues, en el *segmento de ADN que codifica una enzima capaz de desempeñar funciones asociadas con la expresión fenotípica de ese segmento.* Esta definición se popularizó luego como la hipótesis «un gen, una enzima».
3 Pronto se juntaron pruebas de que el gen como unidad de función no era indivisible, puesto que existían en él sitios de mutación específicos que podían separarse entre sí por medio de la recombinación génica (Oliver, 1940 y Lewis, 1944; Benzer, 1955-1959). Benzer propuso entonces una serie de nuevos términos y denominó «cistrón» (*cistron*) a la unidad de función genética, «recón» (*recon*) a la unidad indivisible de recombinación y «mutón» (*muton*) a la menor unidad de mutación. Cuando el grupo de Yanofsky, entre los años 1958 y 1964, pudo demostrar que el cistrón consistía en una porción de ADN en donde se hallaba cifrada colinealmente la información para sintetizar un único polipéptido (1958-1964), surgió un nuevo concepto de *gen como cistrón*, quedando inmortalizado en la hipótesis «un cistrón, un polipéptido» (más tarde redefinida como «un gen o cistrón, un ARNm, un polipéptido»), que reemplazó a la antigua teoría de «un gen, una enzima». Véase CISTRON, MUTON y RECON.
4 A partir de 1970, el avance de la biología molecular y los numerosos descubrimientos que ocurrieron desde entonces han obligado a revisar la concepción clásica (acepción 1) y neoclásica (acepciones 2 y 3) de gen, de modo que hoy día por gen se entiende:
a) La *secuencia de ADN o de ARN que codifica uno o varios productos capaces de desempeñar una función específica generalmente fuera de su lugar de síntesis*. Estos productos pueden ser polipéptidos (es el caso de la mayoría de los genes) o ARN (ARNt, ARNr). El segmento de ADN o de ARN que codifica un polipéptido contiene asimismo secuencias reguladoras tales como los promotores, silenciadores, o potenciadores; el polipéptido que resulta de la traducción de un ARNm puede a su vez escindirse en varios polipéptidos con funciones distintas; un ARN transcrito también puede originar varios productos funcionales por el fenómeno de corte y empalme alternativo (véase

ALTERNATIVE SPLICING) o mediante un mecanismo de escisión (por ejemplo, en los ARNr precursores, la escisión genera los ARNr grande, pequeño y 5S).
b) En los organismos eucariotas, un gen se puede definir asimismo como la *combinación de segmentos de ADN que en conjunto constituyen una unidad de expresión. La expresión lleva a la formación de uno o más productos génicos funcionales, que pueden ser tanto moléculas de ARN como polipéptidos. Cada gen contiene uno o más segmentos de ADN que regulan su transcripción y, en consecuencia, su expresión.*
Observación: pese a que la noción de factor hereditario nació con Gregor Mendel en 1860, la palabra «gen» se la debemos al botánico danés Wilhelm Ludwig Johannsen (1857-1927), quien en el primer decenio del siglo XX (1905-1909) la utilizó por primera vez para designar el elemento unitario responsable de la herencia de un carácter individual en un organismo –que Hugo de Vries había denominado «pangene» y el propio Mendel había llamado «Merkmal» (factor, rasgo, carácter unitario)–, con estas palabras: «Das Wort Gen ist völlig frei von jeder Hypothese; es drückt nur die sichergestellte Tatsache aus, dass viele Eigenschaften des Organismus durch besondere, trennbare und somit selbständige 'Zustände', 'Grundlagen', 'Anlagen'–kurz, was wir eben Gene nennen wollen– bedingt sind.» (La palabra 'gen' no implica ningún tipo de hipótesis; expresa únicamente el hecho comprobado de que muchas propiedades del organismo vienen determinadas por 'condiciones', 'bases' o 'disposiciones' especiales, separables y, por lo tanto, independientes; es decir, lo que pretendemos llamar 'genes').

gene probe: sonda génica.
→ PROBE.

gene splicing: corte y empalme de genes, ayuste de genes.
→ SPLICING.

gRNA: ARNg.
→ GUIDE RNA.
GT-AG rule: regla GT-AG.
Se refiere a la conservación del dinucleótido GT al comienzo de un intrón (extremo 5') y del dinucleótido AG al final del intrón (extremo 3'). Esta regla se cumple en los intrones de los grupos II y III (nucleares).

guide RNA (gRNA): ARN guía (ARNg).
Pequeños ARN que, por complementariedad de bases, determinan el sitio exacto en el que se producirá la riboedición. Véase RNA EDITING.

heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP): ribonucleoproteína nuclear heterogénea (RNPnh).
Complejo ribonucleoproteico que resulta de la asociación del ARNnh con unos 20 tipos de proteínas en distinta proporción. Su estructura y función exactas aún no se conocen, pero en las purificaciones in vitro se asemeja a un collar formado por cuentas de unos 20 nm de diámetro, separadas entre sí por pequeñas regiones de ARNnh desnudo.

heterogeneous nuclear RNA (hnRNA): ARN nuclear heterogéneo (ARNnh).
Mezcla de moléculas de ARN de longitud variada –de allí el nombre de «heterogéneo»–, fruto de la transcripción del ADN por la ARN-polimerasa II en las células eucariotas. Es el transcrito primario o precursor de un ARN mensajero eucariota (preARNm), pero puede incluir asimismo otros transcritos que no llegan a transformarse en un ARN mensajero (ARNm). Se localiza en el núcleo asociado a proteínas (y forma las denominadas ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas o RNPnh) y su vida media es muy breve, ya que sufre rápidamente una serie de modificaciones covalentes que lo convierten en un ARNm antes de salir al citoplasma.

heterozygote: heterocigoto.
Individuo u organismo con alelos distintos en un locus dado. Véase LOCUS y ALLELE.

hnRNA: ARNnh.
→ HETEROGENEOUS NUCLEAR RNA.

hnRNP: RNPnh.
→ HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN.

homologous chromosome: cromosoma homólogo.
Cada uno de los miembros de un par de cromosomas que se aparea durante la meiosis; uno de los cromosomas proviene de la madre y el otro del padre. Los cromosomas homólogos contienen la misma secuencia lineal de genes y tienen el mismo tamaño y morfología. Se tiñen asimismo de la misma manera, de modo que en ambos se observan idénticas bandas características.

homozygote: homocigoto.
Individuo u organismo con alelos idénticos en un locus dado. Véase ALLELE y LOCUS.

hybridization probe: sonda de hibridación.
→ PROBE.

initiation codon: codón de iniciación.
→ START CODON.

intein: inteína.
Secuencia interna de aminoácidos que se elimina de una proteína precursora recién traducida por medio de una reacción de transpeptidación. Véase SPLICING y TRANSPEPTIDATION.
Observación: este nombre deriva por apócope y aféresis de la expresión *intervening protein sequence* y equivale conceptualmente a los intrones de los ácidos nucleicos.

intervening sequence: secuencia intercalada, secuencia interpuesta.
→ INTRON.

intron: intrón.
1 Secuencia intragénica de desoxirribonucleótidos que se transcribe pero no se conserva en la molécula de ARN madura (ARNm, ARNr o ARNt).
2 En el transcrito primario, es la secuencia de ribonucleótidos que se elimina durante el proceso de corte y empalme (ayuste), y que, por lo tanto, no forma parte del transcrito maduro (ARNm, ARNr, ARNt). Se distinguen cuatro tipos según su forma de eliminación durante el proceso de corte y empalme (ayuste) y la clase de genes en los que se observan. Los intrones de los grupos I, II y III se escinden mediante reacciones de transesterificación. Los intrones del grupo I (presentes en los genes de ARNr de algunos organismos eucariotas inferiores –como, por ejemplo, *Tetrahymena thermophila*–, en los genes mitocondriales de hongos y en ciertos fagos) se caracterizan por carecer de secuencias consenso en los sitios de empalme, aunque pueden tenerlas en su interior, y eliminarse por un proceso autocatalítico estrechamente relacionado con la estructura secundaria y terciaria de la molécula precursora de ARN (en esta clase de intrones, una guanosina o un nucleótido de guanosina libre –guanilato, GMP, GDP o GTP– aporta el grupo OH que produce la primera transesterificación; véase la figura 2); los intrones del grupo II (presentes en genes mitocondriales de hongos) disponen de sitios de empalme con secuencias consenso (responden a la regla GT-AT) y, al igual que los del grupo I, se eliminan mediante un proceso autocatalítico dependiente de la estructura secundaria y terciaria del ARN (en este caso, una adenina cede el grupo 2'-OH que produce la primera transesterificación); los intrones de los genes nucleares o del grupo III son idénticos a los del grupo II (responden a la regla GT-AT), pero, a diferencia de éstos, necesitan de la presencia del empalmosoma (o ayustosoma) para escindirse; tanto en el grupo II como en el grupo III se forma una estructura en lazo característica (*lariat*) cuando se empalman los exones; los intrones del grupo IV, presentes en los tRNA eucariotas, son los únicos que no se eliminan por medio de una reacción de transesterificación, sino a través de un corte endonucleásico con ligamiento ulterior. Véase LARIAT, SPLICEOSOMA y SPLICING.
Observación: intron es una voz formada por apócope y aféresis a partir de *intervening sequence region*. En los organismos eucariotas superiores, la mayoría de los genes se hallan interrumpidos por intrones de longitud por lo general mayor que la de los exones correspondientes. Puede

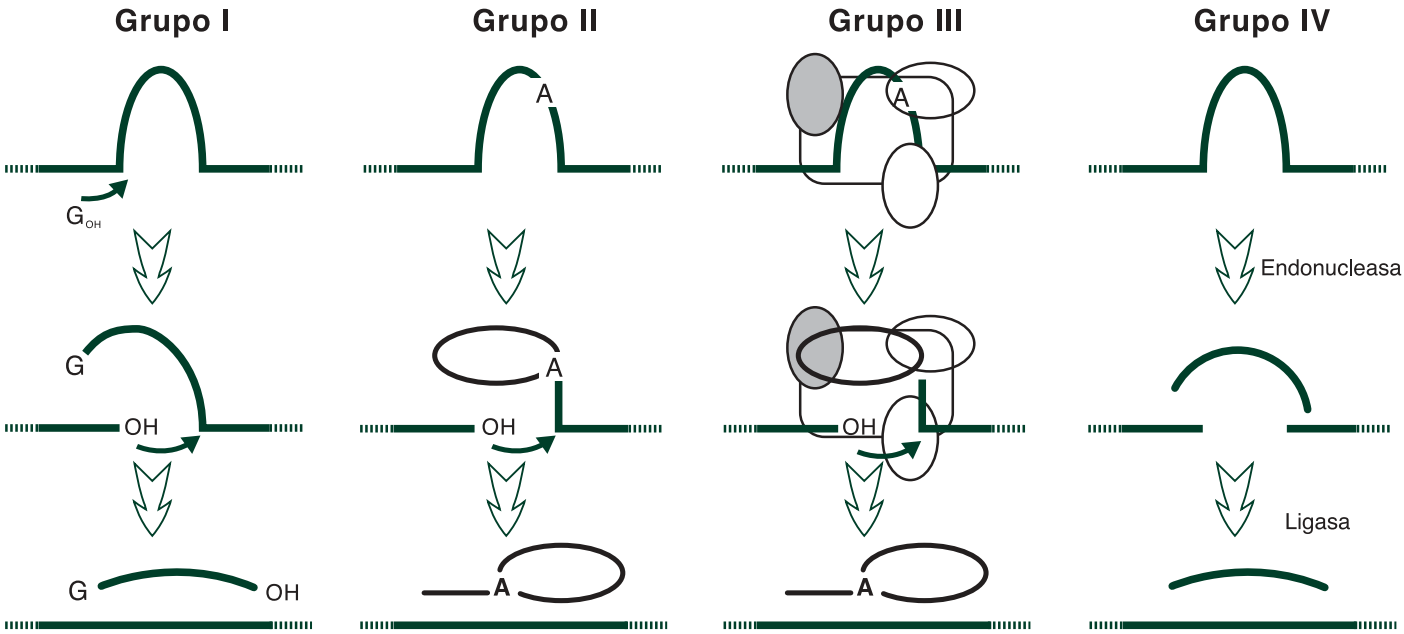


Figura 2 De izquierda a derecha: 5' g 3'

haber intrones en los genes nucleares que codifican proteínas, en los genes nucleolares de ARNr o en los genes de ARNt. En los organismos procariotas, los genes suelen ser continuos, pero se han descubierto intrones en fagos y en algunos ARNt bacterianos.(Véase la figura 2).

lariat: lazo.
Estructura en forma de lazo que se observa tras la reacción de corte y empalme (ayuste) en los intrones del grupo II y III. Véase BRANCH SITE, INTRON y SPLICING.
Observación: los diccionarios de inglés estadounidense indican que esta palabra es un americanismo derivado del español «la reata».

leader peptide: péptido líder.
→ LEADER SEQUENCE.

leader sequence: secuencia líder, secuencia guía, secuencia delantera.
1 En los ARNm, es la secuencia de ribonucleótidos que se extiende desde el extremo 5' hasta el codón de iniciación y que, por tanto, no se traduce.
2 ***signal sequence*** (secuencia señal) o ***signal peptide*** (péptido señal) o ***leader peptide*** (péptido líder): en un polipéptido, es una secuencia de aminoácidos presente en su extremo amino que sirve de señal para:
a) el traslado del polipéptido del citoplasma al espacio periplasmático (en las células procariotas), o
b) la secreción del polipéptido, durante su síntesis, hacia el interior del retículo endoplásmico (en los organismos eucariotas). Se elimina de la proteína madura mediante enzimas específicas.
Observación: se aconseja reservar la expresión «secuencia líder» (guía, delantera) para los ácidos nucleicos y «secuencia señal» para las proteínas. El término también se aplica, aunque con incorrección, a cualquier péptido responsable del emplazamiento de una proteína recientemente sintetizada en los orgánulos de las células eucariotas; estos péptidos reciben el nombre de «péptido de tránsito» (***transit peptide***), «secuencia de acceso» (***targeting sequence***) o «presecuencia» (***presequence***).

left splice site: sitio izquierdo de empalme, sitio izquierdo de ayuste.
→ SPLICING SITE.

loci: loci.
→ LOCUS.

locus: locus.
1 Posición que un gen ocupa en el cromosoma o en la molécula de ácido nucleico que funciona como material hereditario.
2 Segmento de ADN o ARN que coincide con un gen determinado, sin tomar en consideración su secuencia de bases (es un concepto principalmente topográfico).
Observación: el plural de «locus» es *loci* en inglés y en latín, pero en español es «locus».

messenger interfering complementary RNA (micRNA): ARN complementario de interferencia con el mensajero (ARNcim).
→ ANTISENSE RNA.

messenger RNA (mRNA): ARN mensajero (ARNm).
Molécula de ARN que se traduce en una o más proteínas en los ribosomas. Véase TEMPLATE STRAND y SPLICING.

micRNA: ARNcim.
→ MESSENGER INTERFERING COMPLEMENTARY RNA.

minus strand: cadena negativa.
→ NONCODING STRAND.
Observación: la designación «cadena positiva» (*plus strand*) y «cadena negativa» (*minus strand*) se debe reservar para designar las cadenas codificante y no codificante de los genomas víricos, respectivamente.

mRNA: ARNm.
→ MESSENGER RNA.

mutation: mutación.
1 ***gene mutation*** (mutación génica):
a) cualquier cambio que modifica la secuencia de bases de un gen. Este cambio no redunda necesariamente en una modificación del producto o de la función del producto que el gen codifica, como es el caso de las mutaciones génicas silenciosas;
b) La transformación de un alelo en otro (A1 gA 2).
2 ***cromosome mutation*** (mutación cromosómica): modificación estructural de uno o varios cromosomas.
3 ***genome mutation*** (mutación genómica): modificación del número de cromosomas en el genoma de un organismo.
4 ***mutant*** (mutante): cualquier organismo portador de una mutación.

muton: mutón.
Término genético en desuso que designa la unidad genética más pequeña que puede mutar. Las técnicas moleculares han demostrado que se trata de un nucleótido.

noncoding sequence: secuencia no codificante.
1 En una molécula de ADN, cualquiera de los intrones o secuencias intergénicas. Véase INTRON.
2 En el ARN mensajero, es la porción de la secuencia de nucleótidos que no se ha de traducir en un polipéptido. Véase UTR, 5'UTR y 3'UTR.

non-coding strand: cadena no codificante.
→ NONCODING STRAND.

noncoding strand: cadena no codificante, hebra no codificante.
Una de las dos cadenas de ácido nucleico bicatenario (ADNbc, ARNbc) que sirve de plantilla para la transcripción del ARN. Es sinónimo estricto de «cadena plantilla» (*template strand*) en su tercera acepción.
Observación: la JCBN (Joint Commission on Biochemical Nomenclature) y la NC-IUB (Nomenclature Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) prefieren esta designación (*noncoding strand*) a cualquiera de las otras denominaciones posibles (*antisense strand, minus strand, complementary strand, non-coding strand, template strand, anticoding strand* y *transcribing strand*). No obstante, no faltan quienes prefieren utilizar el nombre de «cadena plantilla» (*template strand*) por considerar que no deja lugar a dudas desde el punto de vista conceptual.

nonsense codon: codón de terminación, codón de finalización de lectura, codón de parada.
→ STOP CODON.
Observación: se desaconseja utilizar la expresión «codón sin sentido» como sinónimo de «codón de terminación», pues induce a error, ya que los codones de terminación o parada cumplen la función precisa de finalizar la traducción de proteínas (luego, tienen un significado o «sentido»).

nonsense strand: cadena no codificante.
→ NONCODING STRAND.

non transcribed spacer: espaciador no transcrito, espaciador intergénico. Secuencia en el genoma que separa dos unidades de transcripción y no se transcribe. Suele designar la secuencia separadora de genes en un agrupamiento.
Observación: este espaciador no se ha de confundir con un espaciador intragénico (*transcribed spacer*) ni con un intrón (*intron*). Véase TRANSCRIBED SPACER e INTRON.

nontranscribing strand: cadena codificante.
→ CODING STRAND.

nucleic probe: sonda nucleica.
→ PROBE.

open reading frame (ORF): marco de lectura abierto.
Marco de lectura compuesto únicamente de tripletes no solapados y que codifica un polipéptido. Incluye un codón de iniciación de la traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Véase READING FRAME.
Observación: a diferencia de la inglesa ORF, las siglas españolas correspondientes apenas se utilizan.

ORF: ORF.
→ OPEN READING FRAME.

plus strand: cadena positiva.
→ CODING STRAND.
Observación: la denominación «cadena positiva» (*plus strand*) y «cadena negativa» (*minus strand*) se debe reservar para designar las cadenas codificante y no codificante de los genomas víricos, respectivamente.

poly(A): poli(A).
Abreviatura de «poliadenilato».

poly(A) tail: cola de poli(A).
Serie de adenilatos añadidos en el extremo 3' de los ARNm eucarióticos (excepto los ARNm de las histonas) y de algunas bacterias. La enzima que cataliza la adición se denomina «polinucleótidoadenilil-transferasa» o «poli(A)-polimerasa».

polyadenilation: poliadenilación.
Adición de una secuencia de poliadenilatos en el extremo 3' de un ARN eucariótico que acaba de ser traducido.

polycistronic mRNA: ARNm policistrónico.
Molécula de ARNm que determina la síntesis de varios productos génicos debido a que contiene más de un marco de lectura abierto. Es característico de los organismos procariotas.

pre-mRNA: preARNm.
→ PRECURSOR MRNA.

pre-RNA: preARN.
→ PRECURSOR RNA.
precursor mRNA (pre-mRNA): ARNm precursor (preARNm).
Molécula de ARN procedente de la transcripción inmediata de un gen y cuyo producto funcional será una pro-

teína. Con este nombre se designa a veces el ARN nuclear heterogéneo (ARNnh) y otras veces, sobre todo en los organismos eucariotas, cualquiera de las formas intermedias de un ARN primario en vías de convertirse en un ARN mensajero maduro (ARNm). Véase HETEROGENEOUS NUCLEAR RNA.

precursor RNA: ARN precursor.
Molécula de ARN procedente de la transcripción inmediata de un gen y cuyo producto funcional puede ser tanto una proteína como un ARN. Véase PRIMARY TRANSCRIPT.

presequence: presecuencia.
→ LEADER SEQUENCE.

primary transcript: transcrito primario.
Molécula de ARN procedente de la transcripción inmediata de un gen y cuyo producto funcional puede ser tanto una proteína como un ARN. En algunos organismos procariotas, los transcritos primarios son también transcritos maduros cuando no experimentan modificaciones tras su transcripción (ARNm, ARNr o ARNt). En los organismos eucariotas, no obstante, todos los transcritos primarios sufren algún tipo de modificación, por lo que nunca son iguales a los transcritos maduros. En este último caso, las expresiones «transcrito primario» y «ARN precursor» son sinónimas. Véase PRECURSOR RNA.

probe: sonda.
Cualquier fragmento de ADN o ARN que ha sido marcado con radionúclidos, fluoróforos u otras moléculas, como la biotina o la digoxigenina, con objeto de detectar secuencias complementarias en experimentos de hibridación molecular. Se obtiene por polimerización in vitro a partir de una secuencia complementaria o por purificación de un fragmento de restricción de un ácido nucleico natural o clonado. Salvo indicación contraria, son fragmentos de ADN. Cuando el fragmento es de ARN recibe el nombre de «ribosonda» (*riboprobe*).

Observación: no es lo mismo que 'grupo indicador'. Véase REPORTER GROUP.

proofreading: corrección.
1 En la replicación del ADN, es la actividad exonucleasa de 3' a 5' de una polimerasa, que cataliza la hidrólisis de uno en uno de los nucleótidos no complementarios de la cadena plantilla.
2 En la síntesis de proteínas, es la hidrólisis de un aminoacil-adenilato o de un aminoacil-ARNt por parte de la aminoacil-ARNt-sintetasa cuando se une un aminoácido equivocado.
3 Asimismo en la síntesis de proteínas, es la liberación del aminoacil-ARNt del sitio 'A' del ribosoma justo antes de la transposición de este último sobre el ARNm, cuando el anticodón del ARNt no se ha apareado correctamente con el codón del ARNm.

protein intron: inteína.
→ INTEIN.

protein splicing: empalme de proteínas, ayuste de proteínas.
→ SPLICING.

reading frame: marco de lectura.
Serie ordenada de tripletes de nucleótidos (codones) contiguos y no solapados en el ADN o en el ARN. Dado que el código genético se compone de tripletes no solapados, en principio existen tres maneras posibles de traducir una secuencia de nucleótidos en proteína, según cuál sea el nucleótido de partida. Cada una de ellas constituye un marco de lectura. Por ejemplo, en la secuencia:
ACGACGACGACGACGACG
Los tres marcos de lectura posibles son:
ACG-ACG-ACG-ACG-ACG-ACG
A-CGA-CGA-CGA-CGA-CGA-CG
AC-GAC-GAC-GAC-GAC-GAC-G
El marco de lectura compuesto del conjunto de tripletes o codones correspondientes a los aminoácidos de un polipéptido se denomina «marco de lectura abierto» u ORF (e incluye el codón de iniciación y el de terminación). Véase CODON y OPEN READING FRAME.

recon: recón.
Término genético en desuso que designa la unidad genética indivisible que puede intercambiarse por recombinación. Las técnicas moleculares han demostrado que se trata de un par de nucleótidos complementarios. Véase CISTRON, GENE y MUTON.

reporter group: grupo indicador, radical indicador.
Cromóforo, fluoróforo, o grupo o radical químico (radiactivo o no radiactivo) que, unido a una molécula vehículo (*carrier*), sirve para investigar la naturaleza física o química de otra molécula en el interior de la célula.
Observación: no es lo mismo que una sonda.Véase PROBE.

retrotranscriptase: retrotranscriptasa.
→ REVERSE TRANSCRIPTASE.

reverse transcriptase (RT): transcriptasa inversa, retrotranscriptasa.
Enzima característica (aunque no exclusiva) de los retrovirus que cataliza la síntesis de una hebra de ADN, dirigida por un ARN que sirve de plantilla, mediante la adición de desoxirribonucleótidos de uno en uno en el extremo 3' de la cadena de ADN naciente. Necesita de un cebador (*primer*) de ARN o ADN, y puede asimismo sintetizar ADN a partir de una plantilla de ADN.
Observación: su traducción frecuente por «transcripción reversa» se presta a confusión, puesto que «reverso» no es un adjetivo, sino un sustantivo que significa la parte opuesta al frente de una cosa («el reverso y el anverso de una moneda») o la antítesis de algo, aunque el DRAE también lo recoge con el significado de 'marcha atrás' o 'retroceso'. No obstante, la idea de transcripción en dirección opuesta (ADN g ARN) a la tradicional (ADN g ARN) queda perfectamente transmitida por el adjetivo «inverso» (pues se trata literalmente de una traducción en sentido inverso al habitual) o por el afijo «retro-» (hacia atrás). La expresión «en reverso» no figura en los diccionarios de español. Por otro lado, según la UIPAC, el nombre oficial de esta enzima es *RNA-directed DNA polymerase* (ADN-polimerasa dirigida por ARN), pero ha recibido asimismo otras denominaciones, a saber: *DNA nucleotidyltransferase (RNA-directed); reverse transcriptase; revertase; RNA-dependent deoxyribonucleate nucleotidyltransferase; RNA revertase; RNA-dependent DNA polymerase; RNAinstructed DNA polymerase*.

reverse transcription: transcripción inversa, retrotranscripción.
Síntesis de una molécula de ADN catalizada por la enzima retrotranscriptasa a partir de una hebra de ARN. Véase REVERSE TRANSCRIPTASE.

ribonucleic acid (RNA): ácido ribonucleico (ARN).
Polímero de ribonucleótidos unidos por enlaces 5'-3'fosfodiéster. Es uno de los dos ácidos nucleicos naturales conocidos, pero a diferencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de otras biomoléculas, es la única sustancia capaz de desempeñar funciones no sólo codificantes sino también estructurales, reguladoras y catalíticas.

riboprobe: ribosonda.
Molécula de ARN que sirve de sonda en distintos ensayos de hibridación. Se obtiene por transcripción in vitro de un ADN clonado.

ribosomal RNA (rRNA): ARN ribosómico (ARNr).
Molécula de ARN que confiere soporte estructural y actividad catalítica a un ribosoma.

ribozyme: ribozima.
Molécula de ARN con actividad catalítica. A diferencia de las enzimas verdaderas de naturaleza proteica, la ribozima puede quedar alterada una vez que ha desempeñado su función.
Observación: Sidney Altman describió por vez primera vez una molécula con estas características en 1981 y la bautizó con el nombre de «RNasa P» (*RNase P*). Un año después, Thomas Cech descubría un segundo ARN con propiedades autocatalíticas en el intrón de 414 nucleótidos del ARNr del protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila*. Hoy día se conocen aproximadamente unas cien ribozimas.Thomas Cech y Sidney Altman recibieron el Premio Nobel de química en 1989 por el descubrimiento de las propiedades biocatalíticas del ARN.

right splice site: sitio derecho de empalme, sitio derecho de ayuste.
→ SPLICING SITE.

RNA: ARN.
→ RIBONUCLEIC ACID.

RNA dependent DNA polymerase: ADN-polimerasa dependiente de ARN.
→ REVERSE TRANSCRIPTASE.

RNA editing: edición de ARN, riboedición.
Modificación de la secuencia primigenia de nucleótidos en algunos ARN, bien mediante mecanismos de inserción o eliminación de uridinas, bien por sustitución de bases, habitualmente de una C por una U y de una A por una I, a fin de producir una molécula de ARN cuya secuencia de nucleótidos difiere de la codificada genéticamente en el ADN del que ha sido transcrita. La mayoría de los ejemplos de riboedición se han encontrado en los ARN de las mitocondrias o de los cloroplastos de algunos organismos eucariotas. La inserción de uridinas se realiza por mediación de un ARN guía. Véase GUIDE RNA.
Observación: la palabra inglesa *editing* no es sinónima de nuestro sustantivo «edición» en ninguno de los sentidos que recoge el DRAE 2001. Sin embargo, esta «edición» puede compararse a la actividad de modificación que efectúa cualquier programa informático «editor» de textos, que con ese nombre ya tiene entrada en el DRAE 2001 (2.ª acepción informática).

RNA polymerase: ARN-polimerasa, transcriptasa.
Enzima que cataliza la síntesis de una hebra de ARN, dirigida por un ADN que sirve de plantilla, mediante la adición de ribonucleótidos de uno en uno en el extremo 3' de

la cadena de ARN naciente. En los organismos eucariotas se distinguen tres categorías de polimerasas en función de su sensibilidad a la alfa-amanitina y la clase de ARN que sintetizan.
Observación: el nombre oficial recomendado por la UIPAC es ARN-polimerasa dirigida por ADN (*DNA-directed RNA polymerase*), pero esta enzima ha recibido asimismo otros nombres, a saber: *RNA polymerase; RNA nucleotidyltransferase (DNAdirected); RNA polymerase I; RNA polymerase II; RNA polymerase III; RNA nucleotidyltransferase (DNA-directed); C RNA formation factors; deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase; DNA-dependent ribonucleate nucleotidyltransferase; DNA-dependent RNA nucleotidyltransferase; DNA-dependent RNA polymerase; ribonucleate nucleotidyltransferase; ribonucleate polymerase; C ribonucleic acid formation factors; ribonucleic acid nucleotidyltransferase; ribonucleic acid polymerase; ribonucleic acid transcriptase; ribonucleic polymerase; ribonucleic transcriptase; C RNA formation factors; transcriptase; RNA transcriptase; RNA nucleotidyltransferase.*

RNA probe: sonda de ARN, ribosonda.
→ RIBOPROBE.

RNA splicing: corte y empalme de ARN, ayuste de ARN.
→ SPLICING.

rRNA: ARNr.
→ RIBOSOMAL RNA.

scRNA: ARNcp.
→ SMALL CYTOPLASMIC RNA.

scRNP: RNPcp.
→ SMALL CYTOPLASMIC RIBONUCLEOPROTEIN

scyrp: scirp.
Voz coloquial derivada del acrónimo inglés *scRNP* (*small cytoplasmic ribonucleoprotein*).

self-splicing: autoempalme, autoayuste.
Empalme o ayuste en el que el propio ARN actúa de catalizador y, por consiguiente, no requiere la actividad de enzimas proteicas. Véase RIBOZYME.

sense strand: cadena codificante.
→ CODING STRAND.

signal peptide: péptido señal.
→ LEADER SEQUENCE.

signal sequence: secuencia señal.
→ LEADER SEQUENCE.

single-stranded DNA (ssDNA): ADN monocatenario
Molécula de ADN formada por una sola hebra de desoxirribonucleótidos.
Observación: la sigla española, ADNmc, apenas se utiliza.

single-stranded RNA (ssRNA): ARN monocatenario
Molécula de ARN formada por una sola hebra de ribonucleótidos. La mayoría de los ARN son de hebra única.
Observación: la sigla española, ARNmc, apenas se utiliza.

small cytoplasmic ribonucleoprotein (scRNP, scyrp): ribonucleoproteína citoplasmática pequeña (RNPcp).
Complejo formado por un ARN citoplasmático pequeño (ARNcp) y proteína(s). Se localiza en el citoplasma de las células eucariotas. Véase SMALL CYTOPLASMIC RNA.

small cytoplasmic RNA (scRNA): ARN citoplasmático pequeño (ARNcp).
Cualquier molécula minúscula de ARN (100 a 300 nucleótidos) que forma parte de una ribonucleoproteína citoplasmática pequeña (*small cytoplasmic ribonucleoprotein*). El único ARN citoplasmático pequeño identificado hasta la fecha es el ARNnp 7SL. Este ARNcp forma parte del complejo ribonucleoproteínico SRP que reconoce los péptidos señal en el retículo endoplásmico. Véase LEADER SEQUENCE.

small nuclear ribonucleoprotein (snRNP, snurp): ribonucleoproteína nuclear pequeña (RNPnp).
Complejo formado por unas 10 proteínas y una pequeña molécula de ARN (ARNnp) –que es la que da nombre al conjunto–, presente en los núcleos de las células eucariotas.

small nuclear RNA (snRNA): ARN nuclear pequeño (ARNnp).
Cualquier molécula pequeña de RNA (de 100 a 300 nucleótidos en los organismos eucariotas superiores y hasta 1000 nucleótidos en las levaduras) que se localiza en el núcleo de las células eucariotas. Son indispensables para los procesos de maduración del ARN, principalmente para el empalme o ayuste (*splicing*) y la poliadenilación.

small nucleolar RNA (snoRNA): ARN nucleolar pequeño (ARNnop).
Pequeña molécula de ARN (de 100 a 300 nucleótidos) localizada en el nucléolo de una célula eucariota y cuya presencia es indispensable para el procesamiento de los transcritos primarios de los ARNr.

snoRNA: ARNnop.
→ SMALL NUCLEOLAR RNA.

snRNA: ARNnp.
→ SMALL NUCLEAR RNA.

snRNP: RNPnp.
→ SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN.

snurp: snurp.
Voz coloquial derivada del acrónimo inglés *snRNP* (*small nuclear ribonucleoprotein*).

splice site: sitio de corte y empalme, sitio de empalme, sitio de ayuste.
1 Secuencia de nucleótidos situada a cada extremo de un intrón. Determina el punto de empalme, es decir, el nucleótido exacto en el que se producirá la escisión del intrón y el posterior empalme de exones. Los sitios de empalme se desglosan a su vez en dos tipos:
a) 5'-splice site, donor splice site, donor site, left splice site (sitio de empalme 5', sitio de ayuste 5';sitio donador, sitio izquierdo de empalme o ayuste): zona del extremo 5' del intrón que contiene la secuencia consenso GU.
b) 3'-splice site, acceptor splice site, acceptor site, right splice site (sitio de empalme 3', sitio de ayuste 3'; sitio aceptor, sitio derecho de empalme o ayuste): zona del extremo 3' del intrón que contiene la secuencia consenso AG.
2 Secuencia de nucleótidos que el aparato de empalme o ayuste reconoce a efectos de la maduración del ARN.
Observación: según la definición 2, se considera asimismo un sitio de empalme el lugar de ramificación.Véase BRANCH SITE, INTRON y LARIAT.

spliceosome: empalmosoma, ayustosoma.
Complejo ribonucleoproteico responsable de la eliminación de los intrones de los transcritos primarios en el núcleo celular. Consta de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (RNPnp) o *snurps*, formadas a su vez por la asociación de seis a diez proteínas con moléculas de ARN pequeñas (ARNnp) ricas en uridinas (se conocen distintos tipos: U1,U2, U4, U5, U6, U11 y U12). Además de las RNPnp, pueden formar parte del empalmosoma entre 40 y 100 proteínas o factores de empalme diversos. Véase INTRON.
Observación: a partir del momento en que la traducción más difundida de *splicing* es «corte y empalme» o «empalme» a secas (y, más recientemente, «ayuste»), lo lógico es que este complejo ribonucleoproteico se llame como se indica y no «espliceosoma», como se observa en algunos libros de texto.

splicing: corte y empalme; escisión y empalme; empalme; ayuste.
1 ***RNA splicing*** (corte y empalme de ARN): en las células eucariotas, es el proceso postranscripcional, autocatalítico o enzimático de eliminación de las secuencias no codificantes o intrones y de reunión de las secuencias codificantes o exones del:
a) ARN nuclear heterogéneo (ARNnh) para formar el ARN mensajero continuo (ARNm) que se ha de traducir en proteína;
b) ARN ribosómico (ARNr);
c) ARN de transferencia (ARNt).
También se ha descrito el fenómeno de empalme o ayuste en los ARNt de procariotas y bacteriófagos.Véase INTRON.
2 ***protein splicing*** (empalme de proteínas): modificación postraduccional de una proteína precursora.
Conlleva dos escisiones proteolíticas concertadas y un ligamiento, que redunda en la eliminación de una secuencia interna de la cadena polipeptídica original (inteína) para formar una proteína madura. Se cree que es un proceso autocatalítico.
3 ***DNA splicing*** (empalme de ADN) o ***gene splicing*** (empalme de genes): la unión covalente de dos fragmentos de ADN bicatenario. Desde el punto se vista enzimático, se trata de un ligamiento de dos fragmentos de ADN catalizado por una ADN-ligasa.
Observación: la traducción más popular al español de la expresión *RNA splicing* es «corte y empalme», pese a que la voz *splicing* significa literalmente «empalme» o «acoplamiento». En este caso, a veces, el verbo *to splice* se utiliza con partículas como *out* o *in* para referirse a la eliminación o desempalme de intrones (*spliced out*) o al empalme de exones (*spliced in, spliced together*) propiamente dichos; el término inglés *splicing*, no obstante, encierra ambos significados, de supresión de intrones y de reunión de exones, a la vez. Hay registro de su traducción por «empalme» o «ayuste» a secas, entendiéndose por ello el empalme de los exones de ARN. «Ayuste», una voz de origen náutico que significa «costura y unión de dos cabos», ya figura en ciertos libros de biología molecular como una traducción posible de *splicing*.

splicing junction: zona de unión, sitio de unión.
→ SPLICE SITE.

splicing site: sitio de corte y empalme, sitio de empalme, sitio de ayuste.
→ SPLICE SITE.

ssDNA: ADNmc.
→ SINGLE-STRANDED DNA.

ssRNA: ARNmc.
g SINGLE-STRANDED RNA.

strand: cadena, hebra.
1 Ordenación lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster.
2 Ordenación lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

start codon: codón de iniciación.
Triplete que marca el inicio de un marco de lectura abierto y, por ende, el comienzo del mensaje contenido en el gen. Casi siempre es «AUG» (el triplete que codifica la metionina), pero en los organismos procariotas también puede ser «GUG».

stop codon: codón de terminación, codón de finalización de lectura, codón de parada.
Codones reconocidos por un factor de terminación de la traducción debido a que carecen de un anticodón complementario. Cuando el factor los reconoce, se interrumpe la traducción y se libera el polipéptido nuevo. En el código genético universal, son los codones «UAG», «UGA» y «UAA».

synonymous codons: codones sinónimos.
Codones que codifican el mismo aminoácido, aunque difieren en su secuencia de nucleótidos.

targeting sequence: secuencia de acceso.
→ LEADER SEQUENCE.

template strand: cadena plantilla, cadena molde.
1 Cadena de ácido nucleico que sirve de plantilla para la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria.
2 En la replicación de un ácido nucleico, es cualquiera de las dos cadenas del ácido nucleico bicatenario (ADNbc, ARNbc) que, al separarse, sirve de plantilla para la síntesis de una cadena hija complementaria. Ambas cadenas de un ácido nucleico bicatenario sirven de plantilla para la síntesis de sendas hebras hijas.
3 En la transcripción, es sinónimo de «cadena no codificante». Véase NONCODING STRAND.
Observación: aunque la expresión *template strand* siempre se utilizó como sinónimo de «cadena no codificante» (*noncoding strand*), los recientes avances y aplicaciones de la biología molecular exigen incluir aquí una acepción más amplia que tome en consideración la copia de ADN o de ARN a partir de ADN, y la de ARN o ADN a partir de ARN.

termination codon: codón de terminación, codón de finalización de lectura, codón de parada.
→ STOP CODON.

to code for: codificar, cifrar, determinar.
Contener una secuencia de nucleótidos la información suficiente para la producción de una proteína o un ácido nucleico funcional.
Observación: en castellano, el verbo codificar, en su acepción genético-molecular, tiende a conservar el carácter transitivo; por consiguiente, se deben evitar las traducciones literales del estilo «codifica para» o «codifica a». Lo correcto es decir, por ejemplo, «el gen X que codifica la proteína Y». Más dudoso es el uso del verbo cifrar en frases tales como «el gen X que cifra la proteína Y», por cuanto «cifrar» es, según el diccionario académico: «Transcribir en guarismos, letras o símbolos, de acuerdo con una clave, un mensaje cuyo contenido se quiere ocultar» y según el nuevo DUE: «Escribir un mensaje en cifra (clave)». De seguir cualquiera de estas definiciones, la frase debería construirse de otra forma, por ejemplo: «el mensaje para la fabricación de una proteína se halla cifrado [oculto, secreto] en la secuencia de bases de un gen».

trailer sequence: secuencia remolque, secuencia trasera.
En los ARNm, es la secuencia de ribonucleótidos que se extiende desde el codón de terminación hasta el extremo 3’ y que, por consiguiente, no se traduce.

trans-splicing: transempalme, empalme en *trans*, transayuste, ayuste en *trans*. Empalme o ayuste de exones de dos transcritos primarios distintos con la consiguiente formación de un ARNm híbrido. Véase CIS-SPLICING.

transcribed spacer: espaciador transcrito, espaciador intragénico, espaciador.
Secuencia interna de una unidad de transcripción que se transcribe y luego desaparece al madurar el ARN transcrito mediante uno o dos cortes endonucleotídicos, sin empalme ulterior de los extremos producidos. Son característicos de la maduración de los ARNr.
Observación: estos espaciadores no son intrones, pues su eliminación no trae aparejado un empalme de exones, tal como ocurre tras la escisión intrónica en el fenómeno de corte y empalme. Tampoco se ha de confundir con un espaciador intergénico.Véase NON TRANSCRIBED SPACER y SPLICING.

transcribing strand: cadena no codificante.
→ NONCODING STRAND.

transcript: transcrito.
Molécula de ARN transcrita a partir de una hebra complementaria de ADN.
Observación: el DRAE recoge la palabra «transcrito» como voz grave y no esdrújula y, por lo tanto, debe llevar acento prosódico (pero no ortográfico) en la letra *i*.

transcription: transcripción.
Síntesis de ARN a partir de una hebra complementaria de ADN, catalizada por la ARN-polimerasa. Véase DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE, NONCODING STRAND y RNA-POLYMERASE.

transcription unit: unidad de transcripción.
Segmento de ADN que se transcribe en una molécula de ARN mediante una reacción enzimática catalizada por la ARN-polimerasa.
Observación: esta expresión se utiliza mucho con referencia a los organismos procariotas, dado que en estos casos las unidades de transcripción pueden contener uno o más cistrones (es decir, varios genes). Es menos frecuente en relación con los organismos eucariotas, habida cuenta de que los genes eucarióticos son generalmente monocistrónicos (salvo quizás los genes de los ARNr), de modo que una unidad de transcripción refleja el ordenamiento de bases de un único gen. Véase CISTRON, GENE y RNA POLYMERASE.

transcriptional unit: unidad de transcripción.
→ TRANSCRIPTION UNIT.

transesterification: transesterificación.
1 Reacción de un éster con un alcohol en presencia de un catalizador en la que se intercambian grupos alcohólicos –es decir, se forma un segundo éster y un segundo alcohol– sin gasto de energía:
R-CO-OR’ + R’’OH g R-CO-OR’’ +R’OH
Las enzimas que catalizan estas reacciones son proteasas (tripsina, quimotripsina, papaína, etc.) o esterasas.
2 En el ARN (véase la figura 3), es la reacción que se produce durante el fenómeno de corte y empalme en los intrones de los grupos I, II y III; en este caso el grupo acilo es el fosfato de unión de las dos ribosas, y los alcoholes intercambiados son los del carbono 3’ de distintas moléculas de ribosa.

transfer RNA (tRNA): ARN de transferencia (ARNt).
Pequeña molécula de ARN (de tamaño inferior a 100 nucleótidos) que actúa de intermediario en la incorporación de un aminoácido en el extremo carboxilo de un polipéptido naciente durante la síntesis de una proteína. Suele dibujarse en forma de trébol (con arreglo a su estructura secundaria), pero adopta tridimensionalmente la forma de una letra L. En uno de los extremos de la L lleva un anticodón de tres nucleótidos complementario delcodón del ARNm, y en el otro, que coincide con el extremo 3’ de la molécula, lleva unido un aminoácido por un enlace covalente de tipo éster entre el hidroxilo 3’ del ARNt y el carboxilo del aminoácido. Existe al menos un ARNt por cada aminoácido natural, aunque un mismo aminoácido es capaz de interaccionar con varios ARNt.

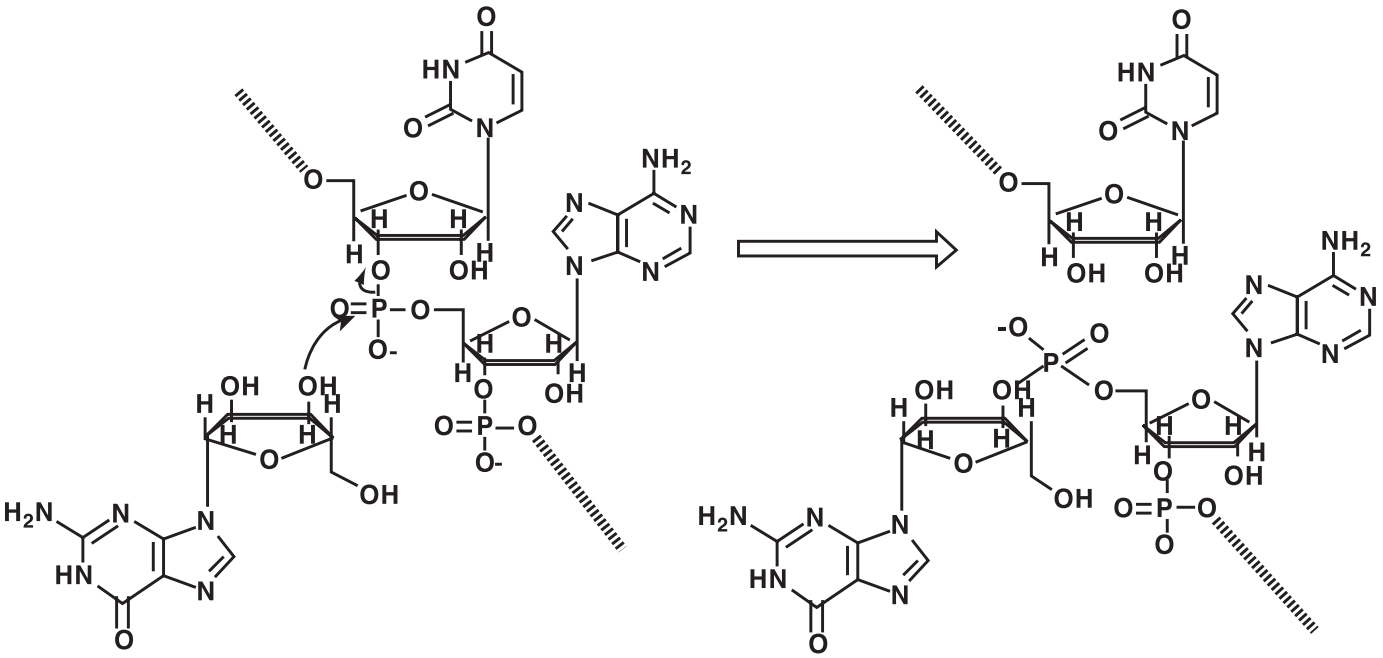


Figura 3

transit peptide: péptido de tránsito.
→ LEADER SEQUENCE.

transpeptidation: transpeptidación.Reacción de hidrólisis de un enlace peptídico entre dos aminoácidos y posterior restablecimiento del enlace entre uno de ellos y un tercero sin gasto de energía. Son reacciones catalizadas por peptidiltransferasas y, a veces, autocatalíticas (es el caso de la eliminación de inteínas). Véase INTEIN y EXTEIN.

triplet: triplete.
1 ***codon*** (codón) en el ARNm. Véase CODON.
2 ***anticodon*** (anticodón) en el ARNt. Véase ANTICODON.

tRNA: ARNt.
→ TRANSFER RNA.

unassigned reading frame (URF): marco de lectura no asignado.
→ UNIDENTIFIED READING FRAME.

unidentified reading frame (URF): marco de lectura no identificado.
Marco de lectura abierto (ORF) de un gen que codifica una proteína desconocida o no identificada ni caracterizada aún.

untranslated region (UTR): región no traducida.
Secuencia de ARNm externa al marco de lectura abierto y que, por consiguiente, no se traduce. Véase LEADER SEQUENCE y TRAILER SEQUENCE.

URF: URF.
→ UNIDENTIFIED READING FRAME.

UTR: UTR.
→ UNTRANSLATED REGION.

Agradecimientos
A los doctores Ángel Herráez (Profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, España), Horacio E Hopp (Profesor titular de Genética. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Coordinador del Instituto de Biotecnología CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], Castelar, República Argentina), Fernando Navarro (Médico especialista y traductor. Cabrerizos, Salamanca, España), y a José M de Sousa (ortógrafo, lexicógrafo y bibliólogo, Barcelona, España) por la lectura crítica de esta primera entrega del vocabulario de bioquímica y biología molecular, y los comentarios y sugerencias recibidos en relación con su contenido o diagramación.

Bibliografía

Biochemical Nomenclature Recommendations. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>; <http://www-.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/> [Consulta: 2 oct. 2002].

Biotech's Life Science Dictionary. <http://biotech.icmb. utexas.edu/search/dict-search.html> [Consulta: 11 sept. 2002].

Cárdenas J, Fernández E, Muñoz J, Pineda M. Glosario de Biología Molecular. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba; 1996.

Claros MG, Avila C, Gallardo F, Cánovas FM. Bioquímica aplicada: manual para el diseño experimental y el análisis de datos. Oviedo: Septem; 2001.

Collins Cobuild. English Language Dictionary. Londres: Harper Collins Publishers; 1994.

Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions. http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/ [Consulta: 12 nov. 2002].

Cooper GM. The Cell: A molecular approach, 2.ª ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2000.

Cortés F. Diccionario médico etimológico. <http://clasicas.usal.es/dicciomed/> [Consulta: 2 oct. 2002].

Diccionarios Vox. <http://www.diccionarios.com/> [Consulta: 11 sept. 2002].

Fisher EP. Gene sind wie Sand am Meer. <http://www-.netdoktor.de/feature/gene_fischer.htm> [Consulta: 1 nov. 2002].

García-Pelayo y Gross R. Larousse Dictionary. Spanish-English, Inglés-Español, unabridged edition. Rosa Blanca: Larousse; 2000.

Glick DM. Glossary of Biochemistry and Molecular Biology.http://www.portlandpress.com/pp/books/online/glick/ [Consulta: 11 sept. 2002].

González M. Diccionario inglés-español Collins. Barcelona: Grijalbo; 1990.

King RC. A dictionary of genetics. New York: Oxford University Press; 1968

Lacadena JR. Genética General: Conceptos fundamentales. Madrid: Síntesis; 1999.

Lackie JM, Dow JAT. The Dictionary of Cell & Molecular Biology, 3.ª ed. Londres: Academic Press. <http://www.mblab.gla.ac.uk/dictionary/> [Consulta: 11 sept. 2002].

Lenay C. Hugo de Vries: from the theory of intracellular pangenesis to the rediscovery of Mendel. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences 323:1053-1060; 2000.

Lewin B. Genes VII. New York: Oxford University Press Inc.; 2000.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4.ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana S.A.; 2002.

Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid: Harcourt; 2001. Martín P. Recopilación de reglas, normas y recomendaciones para la escritura de números y unidades de medida del Sistema Internacional. <http://www.ctv.es/USERS/pmc/> [Consulta: 2 oct.2002].

Martínez de Sousa J. Diccionario de redacción y estilo, 2.ª ed. Madrid: Pirámide; 1997.

Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry. San Francisco: Addison Wesley Longman; 1999. MeSH Browser de la NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/meshbrowser.cgi> [Consulta: 2 oct. 2002].

Moliner M. Diccionario de uso del español (DUE), 2.ª ed. [CDROM]. Madrid: Gredos; 2001.

Navarro FA. Diccionario crítico de dudas inglés-español de medicina. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. Nueva York: Worth Publishers; 2000.

Office Québécois de la langue française. Grand dictionnaire terminologique, v. 1.2.2. http://www.grand-dictionnaire.com/ [Consulta: 4 oct. 2002].

Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Revised edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.

Peers EA, Barragán JV, Vinyals FA, Mora JA. Diccionario inglés-español Cassell. Londres: Cassell & Co.; 1976.

Perera J, Tormo A, García JL. Ingeniería Genética, vols. I y II. Madrid: Síntesis; 2002.

Portin P. The origin, development and present status of the concept of the gene: a short historical account of the discoveries. <http:www.bentham.org/cg1-1/portin/P.Protin . htm> [Consulta: 1 nov. 2002].

Quintana JM. Raíces griegas del léxico castellano, científico y médico. Madrid: Dykinson; 1987. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Vocabulario Científico y Técnico. Madrid: Espasa Calpe; 1990.

Real Academia Española. Diccionario de la lengua española, 22.ª edición; 2001 [mencionado frecuentemente como DRAE 2001]. <http://buscon.rae.es/diccionario/drae.htm> [Consulta: 2 oct. 2002]

Schlindwein B. Hypermedia Glossary Of Genetic Terms. <http://www.weihenstephan.de/~schlind/genglos.html> [Consulta: 11 sept. 2002]

Singer M, Berg P. Genes y genomas, una perspectiva cambiante. Barcelona: Ediciones Omega; 1993.
Stryer L. Bioquímica, 4.ª ed. Bilbao: Reverté; 1995.

SWISS-PROT Protein Knowledgebase. List of keywords. < http://www.expasy.org/cgi-bin/keywlist.pl> [Consulta: 2 oct. 2002]

Universidad de Oviedo: Diccionarios en línea. <http-://tradu.scig.uniovi.es/> [Consulta: 11 oct. 2002].
Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1999.

World Who's Who in Science. A biographical Dictionary of Notable Scientists from Antiquity to the Present, 1.ª ed.

Marquis-Who's Who; 1968.

YourDictionary.com. <http://www.yourdictionary-.com/> [Consulta: 4 nov. 2002

CORRESPONSALES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Si eres miembro de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A C o suscriptor de la REB 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 la REB sea leída.

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 de la REB son profesores y/o investigadores, que sin formar parte del Comité Editorial, coadyuvan en las actividades de la revista. E1 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. E1 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) E1 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 de la REB de su localidad y comunicación inmediata de los cambios en él.

5.1.c) Colaboración en la promoción, difusión y distribución de la REB 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 de la REB, Apartado Postal 70-281, México, 04510, DF, MEXICO, o bien al Tel: (52) 5623-2168 / Fax: (52) 5616-2419.

email: balmori@laguna.fmedic.unam.mx

Yolanda Saldaña Balmori
Coordinadora de Corresponsales de la REB

INTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

La REB 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:

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

1) El artículo deberá enviarse en un disco para computadora, escrito en los procesadores de textos "Winword" o "Word-perfect", con una extensión máxima de 15 cuartillas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 caracteres por renglón). Este deberá ir acompañado de tres impresiones del artículo y de la solicitud para su publicación, firmada por cada uno de los autores.

2) E1 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.

3) 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 última 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 2002. 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.

7) Se recomienda revisar los números recientes para familiarizarse con el estilo de la revista.

II. OTRAS COMUNICACIONES

1) E1 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.

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

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

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 a la Revista de Educación Bioquímica, Apartado Postal 70-281, México 04510, DF o bien por intermedio del corresponsal de la REB en su localidad.