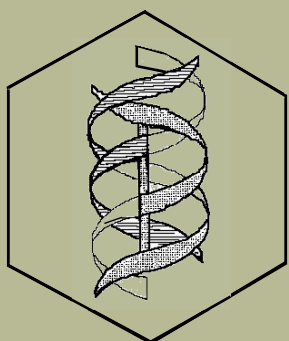


REB 2013

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA



Órgano de información de la
**Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM



Facultad de Medicina
UNAM



Sociedad Mexicana de
Bioquímica, A.C.

EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

VOL. 32

No. 3

SEPTIEMBRE 2013

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

VÍCTOR M. VALDÉZ LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAÍN HERZBERG

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

ASISTENTE EDITORIAL

MARIVEL ROJAS GARCÍA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

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

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

JOSÉ CARLOS GARCÍA PIÑEIRO

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

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., México

AURELIO MENDOZA MEDELLÍN

Facultad de Medicina
Universidad Autónoma del Estado de México

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc y Latindex.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB) La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La REB es una publicación trimestral. La presentación y disposición en conjunto y de cada página de la Revista de Educación Bioquímica son propiedad del editor. Derechos reservados © Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Queda estrictamente prohibida la reproducción parcial o total por cualquier sistema o método mecánico o electrónico sin autorización por escrito del editor. Certificados de: Licitud de Título: 12000; Licitud de Contenido: 8397, expediente No. 1/432"2"/15792; Reserva al título en Derechos de Autor No. 04-2002-030616225500-102. (ISSN: 1665-1995); Reserva de título en Derechos de Autor para publicación electrónica No. 04-2005-092612014100-203 (ISSN: 187-3690). Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza; UNAM-Departamento de Bioquímica y Facultad de Medicina. Distribución electrónica: Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM (<http://computo.sid.unam.mx/Bioquimica> o bien <http://www.puis.unam.mx>). Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F. Correo electrónico: reb@bq.unam.mx.

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

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

MOTIVACIÓN DE LOS ESTUDIANTES DE POSGRADO Corin Hernandez Palafox y José Víctor Calderón Salinas.....	89
---	----

ARTÍCULOS

LA LEVADURA DEL PAN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL Manuel Gutiérrez-Aguilar y Norma Corona de la Peña.....	91
--	----

LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CINASA DE PROTEÍNAS TIPO A DEPENDIENTE DEL AMPc EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sergio Pérez-Landero y Jorge Nieto-Sotelo.....	97
---	----

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ GLICOSILACIÓN Yolanda Saldaña Balmori y Rocío Salceda Sacanelles.....	106
--	-----

PROBLEMA BIOQUÍMICO CINÉTICA ENZIMÁTICA Elizabeth Lira Silva y Ricardo Jasso Chávez.....	110
---	-----

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ GLICOSILACIÓN Yolanda Saldaña Balmori y Rocío Salceda Sacanelles.....	111
--	-----

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO CINÉTICA ENZIMÁTICA Elizabeth Lira Silva Ricardo Jasso Chávez.....	112
---	-----

NORADRENALINA GENERA UN MICROAMBIENTE INDUCTOR DE METÁSTASIS VÍA LA CINASA SRC Rodríguez-Gama Alejandro Ortega-Granillo Augusto.....	119
--	-----

GRACIAS MARIVEL, NUESTRA ASISTENTE EDITORIAL José Víctor Calderón Salinas.....	121
--	-----

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....	123
---	-----

EDITORIAL

MOTIVACIÓN DE LOS ESTUDIANTES DE POSGRADO

Según las estadísticas descritas por el Dr. Juan Pedro Laclette, Coordinador del Foro Consultivo Científico y Tecnológico (FCCyT), sólo 16 de cada 10,000 mexicanos estudian algún tipo de posgrado en México; muy por debajo de países como Canadá y Estados Unidos de América, en donde estas cifras son cinco veces más altas. Adicionalmente, de los 16 egresados, menos de la mitad se integra a diferentes áreas de investigación y desarrollo a través del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Sin duda, la necesidad del país por tener personal altamente preparado en las áreas de investigación científica y tecnológica es esencial para el desarrollo del país; sin embargo, esté dicho no ha dejado de ser un discurso político continuamente mencionado, trillado y sin consecuencias prácticas y aplicadas.

Las acciones gubernamentales han pasado por diferentes estrategias, de las cuales, los posgrados de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) sin duda ha sido de las más exitosas, siendo el sistema que genera más profesionistas con alta capacidad en investigación científica, tecnológica e innovación al país.

Otros programas y esfuerzos, han cumplido ciertos objetivos, aun sin ser tan exitosos en eficiencia. Varios de estos programas han exigido la formación con posgrado a profesores de licenciatura, haciendo que la propia institución que requiere la preparación ofrezca a sus docentes la capacitación, generando programas de posgrado, que con frecuencia y salvo honrosas excepciones, tienen deficiencias, por falta de profesores-investigadores, generando egresados con baja calificación en ciencia, tecnología e innovación. Cumpliendo, por supuesto, con requisitos burocráticos y puntos de escalafón, pero con un relativo impacto en la orientación de los alumnos y la mejora continua en la impartición de cursos, las prácticas de laboratorio y la orientación a sus capacidades y el desarrollo de habilidades en el marco del método científico.

Lo anterior se puede entender en el contexto de que se trata de profesionistas que fueron contratados para ser profesores de una asignatura que tenía como base la memoria y en un sistema que no desarrolla las habilidades y las competencias; haciéndolos víctimas del propio sistema que un día cambia y les exige repentinamente tener maestría y generar habilidades y competencias que nunca estimuló, generó o actualizó. Y es que para tener eficiencia en la preparación de personal en investigación se requiere de un sistema dedicado y formado para ello, además de una adecuada motivación de los aspirantes.

Recientemente en unos cursos de inducción al posgrado en el Distrito Federal y dos estados de la República Mexicana (Coahuila y Tlaxcala), realizamos una encuesta que no pretende ser cuantitativa, pero si ilustrativa. Primero preguntamos las motivaciones para hacer un posgrado en forma directa y después solicitamos lo escribieran en forma anónima y de manera libre; los resultados saltaron a la vista. En las respuestas directas fueron evidentes las aceveraciones políticamente correctas, pasando por salvar a México, curar enfermedades malignas, obtener conocimiento, ser mejor profesionista, prepararse mejor, hacer un mejor trabajo, contribuir al conocimiento científico, hacer mejor las cosas, vivir mejor y aportar al desarrollo del país. Al pasar al anonimato las opiniones políticamente correctas se diluyeron notablemente con motivaciones tales como: la falta de empleo, mejores oportunidades para ganar más, la exigencia del trabajo, la obligación del sistema globalizado, el tener una beca, la posibilidad de viajar gratis, conocer gente, las presiones familiares, no querer un trabajo rutinario, es más fácil que trabajar en la industria, entre otras menos sobresalientes.

Lo anterior pone en evidencia la falta de valores humanísticos, de orientación vocacional y el desconocimiento profundo del quehacer científico y la importancia del desarrollo de la ciencia, propios de un país con cultura científica y donde la vocación

maquiladora y sin empuje innovador y empresarial hace su aparición. Todo lo cual explica porqué las carreras de medicina y leyes siguen siendo las más demandadas; la creencia popular indica que sí se es médico o abogado la vida está resuelta.

El bajo nivel de cultura general, el poco entendimiento y la falta de visión como sociedad del conocimiento, es un reflejo de lo que pasa en el País; que se retroalimenta y se expande por la frecuente falta de experiencia y de formación científica y tecnológica de los profesores de educación media, media superior y superior, quienes, en su mayoría, no sólo no tienen cultura científica, sino frecuentemente la menosprecian y satanizan, por una condición laboral que se percibe como competencia desleal, generando enemigos a aquellos profesores-investigadores que realizan investigación en universidades sin tradición en la misma, lo que los convierte en blanco de ataques por tener supuestos privilegios, que son los donativos de CONACYT o la membresía del SNI, siendo frecuentemente "castigados" pidiéndoles cumplir en exceso con otras tareas académicas, de gestión y de promoción, frecuentemente iguales o mayores que los académicos no científicos y que hacen valer su antigüedad, por encima de estas características en investigación.

Ciertamente este ambiente de desencanto en contra de la investigación y quien la realiza se transmite eficientemente a los alumnos que reciben con frecuencia la propaganda velada o directa en contra de la actividad científica y sólo destellos de los excelentes aunque insuficientes programas de atracción a la ciencia de Conacyt, la Academia de la Investigación Científica y diversos esfuerzos de los gobiernos estatales y las propias Instituciones educativas, que en general poco pueden hacer frente a la opinión diaria del profesor o a la falta de preparación del mismo en materia de investi-

gación y tecnología, que no permite la motivación y entender la adquisición de estrategias para obtener conocimiento, aún con una actitud positiva del docente.

En diferentes sistemas de enseñanza, aplicados generalmente en otros países y sólo en algunas instituciones del nuestro, los alumnos desde muy temprana edad aprenden a desarrollar la curiosidad científica, generan tempranamente proyectos, realizan trabajo de investigación bibliográfica, presentan reportes estructurados, cultivan la cultura del razonamiento como herramienta y no el autoritarismo del conocimiento memorizado y la verdad del profesor. Integran continuamente los conocimientos en algo práctico y aplicado. Generan ensayos donde la individualidad, la imaginación, el empeño y la iniciativa son premiados y no reprimidos por no estar acorde con los conocimientos autoritarios y la necesidad de que sólo exista una respuesta.

¿Cómo lograrlo sin la preparación adecuada de los profesores de todos los niveles? es una tarea titánica que se intenta llevar a cabo pero requiere una profunda planeación, mientras tanto tendremos que seguir trabajando con los estudiantes mejor motivados, con la mejor preparación y con una visión de futuro por encima de dogmas, idealismos o la cruda realidad económica que parece dirigirlo todo.

Corin Hernandez Palafox
Maestría en Salud Pública
Universidad Autónoma de Tlaxcala
corinpalafox@yahoo.com.mx

José Víctor Calderón Salinas
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
jcalder@cinvestav.mx

LA LEVADURA DEL PAN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL*

Manuel Gutiérrez-Aguilar^{1*} y Norma Corona de la Peña²

¹Dalton Cardiovascular Research Center, University of Missouri-Columbia, Columbia, Missouri, 65211, USA.

*Correo electrónico: gutierrezaguilarm@missouri.edu

²U. de Inv. en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital Gabriel Mancera, IMSS, México D.F., Mexico.

RESUMEN

Las mitocondrias de mamíferos presentan un canal inespecífico de identidad desconocida llamado Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial. Los estudios para elucidar la estructura proteica de este poro han sido escasos dada la dificultad para generar organismos mutantes carentes de poro. En este sentido, la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) constituye una alternativa para este tipo de estudios ya que presenta un poro mitocondrial de características similares. Por ser un microorganismo facultativo y por ser relativamente fácil manipular su genoma, la levadura *S. cerevisiae* representa un modelo atractivo para descifrar la estructura molecular del poro de transición de la permeabilidad.

PALABRAS

CLAVE:

Mitocondria, transición de la permeabilidad, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Mammalian mitochondria express a structurally unidentified unselective channel termed the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Studies designed to determine the protein structure of this pore have been scarce mainly due to difficulties in generating knock out organisms of potential pore components. In this scenario, baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) represents an appealing alternative since it harbors a pore with similar characteristics. Given the available genetic tools as well as the possibility for this yeast to grow with dysfunctional mitochondria for oxidative phosphorylation, *S. cerevisiae* represents an attractive model to study the molecular structure of the mitochondrial permeability transition pore.

KEY WORDS:

Mitochondria, permeability transition, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo cuyo funcionamiento es de suma importancia para la homeostasis celular. En condiciones normales, la mitocondria genera ATP a partir de azúcares y ácidos grasos. Es también en este organelo en donde convergen vías de degradación de aminoácidos y esqueletos de carbono (1). Las mitocondrias no son consideradas organelos estables por ser un blanco del estrés oxidante y por la sobrecarga de iones Ca^{2+} provenientes del retículo endoplásmico. La inestabilidad puede ser observada durante el daño por isquemia-reperusión (DIR) (2,3). El daño mitocondrial derivado de esta lesión está íntimamente ligado a la inducción de la tran-

sición de la permeabilidad mitocondrial: Un estado en donde la mitocondria cesa sus funciones como proveedor de energía y se convierte en un potente factor de muerte celular (2). El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP) es la estructura responsable de disipar el potencial electroquímico ($\Delta\psi$) utilizado para la síntesis de ATP así como el transporte de iones, solutos y macromoléculas. A pesar de ser un fenómeno ampliamente estudiado a nivel bioquímico, las características estructurales de este poro son poco claras y siguen siendo el tema de investigación de muchos grupos en el mundo (4). Las mitocondrias de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) representan una herramienta valiosa para el establecimiento de la estructura del

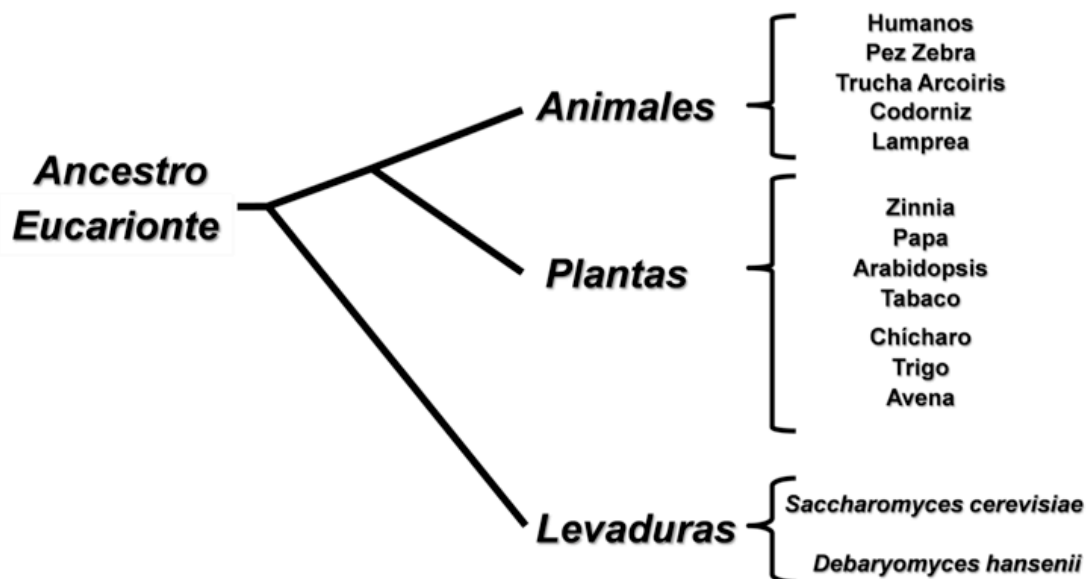


Figura 1. Distribución de los canales inespecíficos mitocondriales en el dominio eucarionte. En la actualidad, estos canales han sido detectados tanto en animales como en plantas y levaduras. Las características de cada canal varían con respecto al organismo en donde son estudiados. Estas diferencias podrían emerger como un medio de adaptación al entorno en donde cada organismo se desarrolla. Actualmente se sabe que estos poros son mas parecidos entre plantas y animales por la sensibilidad a inhibidores clave tales como la ciclosporina A. La figura no representa un diagrama filogenético.

PTP. Lo anterior deriva de que las mitocondrias de *S. cerevisiae* poseen un PTP relativamente conservado (Fig. 1) (2). Al ser un microorganismo facultativo, *S. cerevisiae* puede crecer aún en ausencia de proteínas mitocondriales, lo que sería imposible lograr en un organismo eucarionte superior.

En la presente revisión se abordarán los eventos celulares previos y posteriores a esta transición mediada por períodos de isquemia-reperfusión en mamíferos y con énfasis en la utilización de las mitocondrias de levadura como modelo para la comprensión de la estructura del PTP.

LA MITOCONDRIA Y EL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El daño ocasionado por la disminución del aporte de oxígeno a un tejido u órgano por un intervalo de tiempo umbral, seguido de la restitución en dicho aporte es conocido con el nombre de Daño por Isquemia-Reperfusión (DIR). Comúnmente, el daño involucra órganos con un metabolismo energético alto, tales como corazón, músculo esquelético, riñón, hígado y cerebro. Cuando el DIR afecta al cerebro, se le conoce como daño cerebro-vascular isquémico (3). Cuando un tejido presenta DIR, el blanco inicial son todos aquellos procesos dependientes de oxígeno. Entre ellos destaca la fosforilación oxidativa, proceso en el cual una molécula de difosfato

de adenosina (ADP) es fosforilada para dar origen al trifosfato de adenosina (ATP). En condiciones de homeostasis, esta reacción es posible gracias a la catálisis facilitada por la ATP sintasa. Este complejo utiliza como fuerza de síntesis al gradiente de protones establecido a través de la membrana interna mitocondrial (Δp). A su vez, el Δp es establecido por la cadena respiratoria, un supercomplejo de enzimas que utiliza sustratos oxidables generados en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, reduciendo O_2 para formar H_2O (1). En condiciones de DIR, el transporte de electrones no se lleva a cabo debido a la ausencia de oxígeno. Por consiguiente, la cadena respiratoria entra en un estado de inactividad caracterizado por la inhibición en el bombeo de protones. Al carecer de combustible, la ATP sintasa se encuentra imposibilitada para catalizar la reacción de fosforilación de ADP, promoviendo la reacción termodinámicamente favorable: La hidrólisis del ATP remanente. Este último proceso tiene repercusiones celulares muy graves ya que múltiples procesos dependientes de ATP tanto a nivel celular como tisular se ven comprometidos. Como vía alternativa de producción de ATP, la célula incrementa la actividad de la glucólisis en condiciones anaeróbicas. Esto origina una acumulación de lactato citosólico y la consiguiente disminución en el pH celular (4). Si el periodo de isquemia es suficientemente largo, el ATP producido por la glucólisis también será totalmente utilizado.

Entre los procesos celulares dependientes de ATP interrumpidos, destaca la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática, originando un colapso en el gradiente de los iones K^+ y Na^+ . Esto ocasiona un incremento notorio en la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de dicha membrana (5). La acumulación creciente de Ca^{2+} en el citoplasma activa el transporte de este catión a la matriz mitocondrial mediante el enigmático uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. En estas condiciones, la mitocondria pasa a convertirse de un organelo esencial para la vida, en un organelo inductor de la muerte celular. Esto es debido a que la inactividad de la cadena respiratoria produce un incremento en la disponibilidad del radical semiquinona, el cual reduce parcialmente moléculas de O_2 para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las especies reactivas de oxígeno favorecen la peroxidación de lípidos y proteínas, originando un cambio en la permeabilidad en las membranas mitocondriales.

EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL

Una consecuencia del DIR, es el incremento en la permeabilidad mitocondrial inespecífica a solutos y metabolitos, lo que ha llevado a varios grupos de

investigación a postular la existencia de un PTP (6). La apertura del PTP desencadena el transporte masivo de iones y moléculas a través de la membrana interna mitocondrial cuya masa no exceda los 1.5 KDa. El transporte de especies químicas acompañadas de agua a la matriz mitocondrial origina hinchamiento, despolarización del organelo, aumento en el consumo de oxígeno y eventualmente, la ruptura de las membranas interna y externa. Esto ocasiona la liberación de señales proapoptóticas al citoplasma ocasionando muerte celular programada cuando los niveles de ATP son elevados, y necrosis celular cuando el metabolismo energético de la célula se ha colapsado (Fig. 2) (6). Por su sensibilidad a ligandos de proteínas de las membranas externa e interna mitocondriales, se ha propuesto que este poro se localiza en los sitios de contacto entre las dos membranas. Actualmente se piensa que el PTP está compuesto por un complejo multiprotéico constituido por el translocador de adenín nucleótidos (ANT) y el acarreador de fosfato (PiC) en la membrana interna mitocondrial, el canal aniónico dependiente de voltaje de la membrana externa mitocondrial (VDAC) y la ciclofilina D (CypD) en el espacio matricial (Fig. 1A) (5,7). Sin embargo, diversos experimentos en mitocondrias de mamíferos y de levaduras sugieren que estas

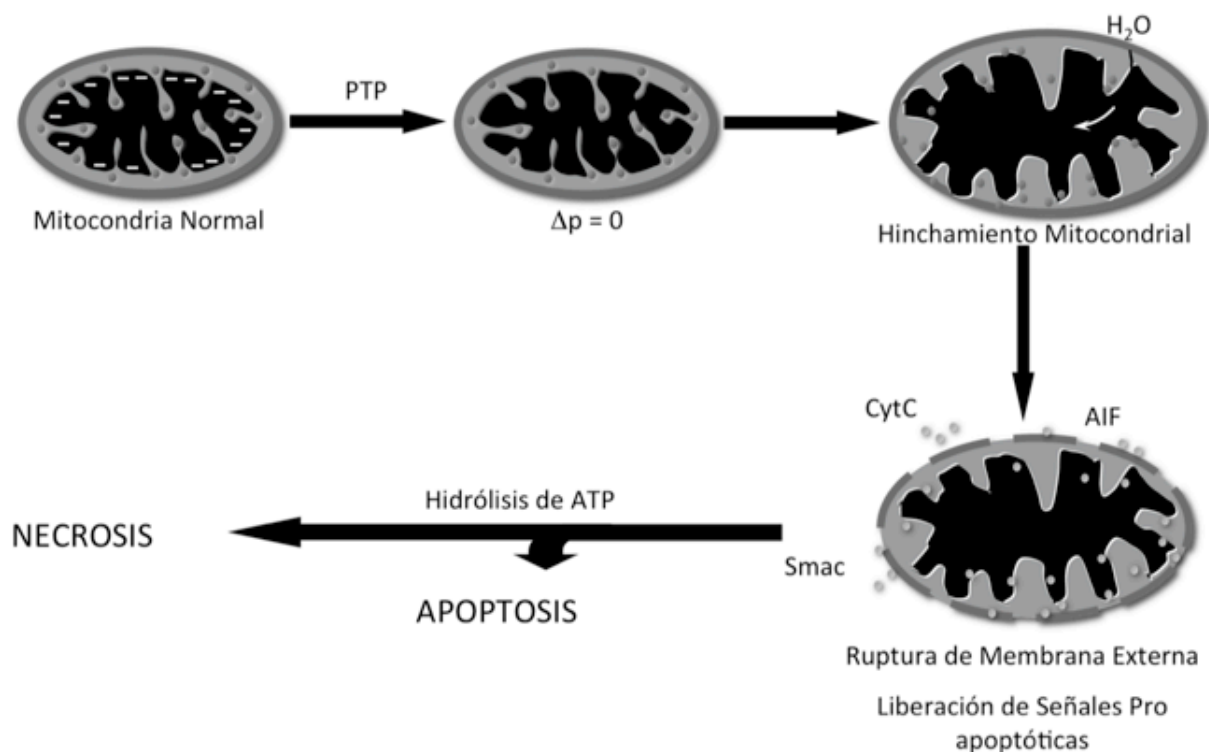


Figura 2. Consecuencias de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en mitocondrias de mamíferos.

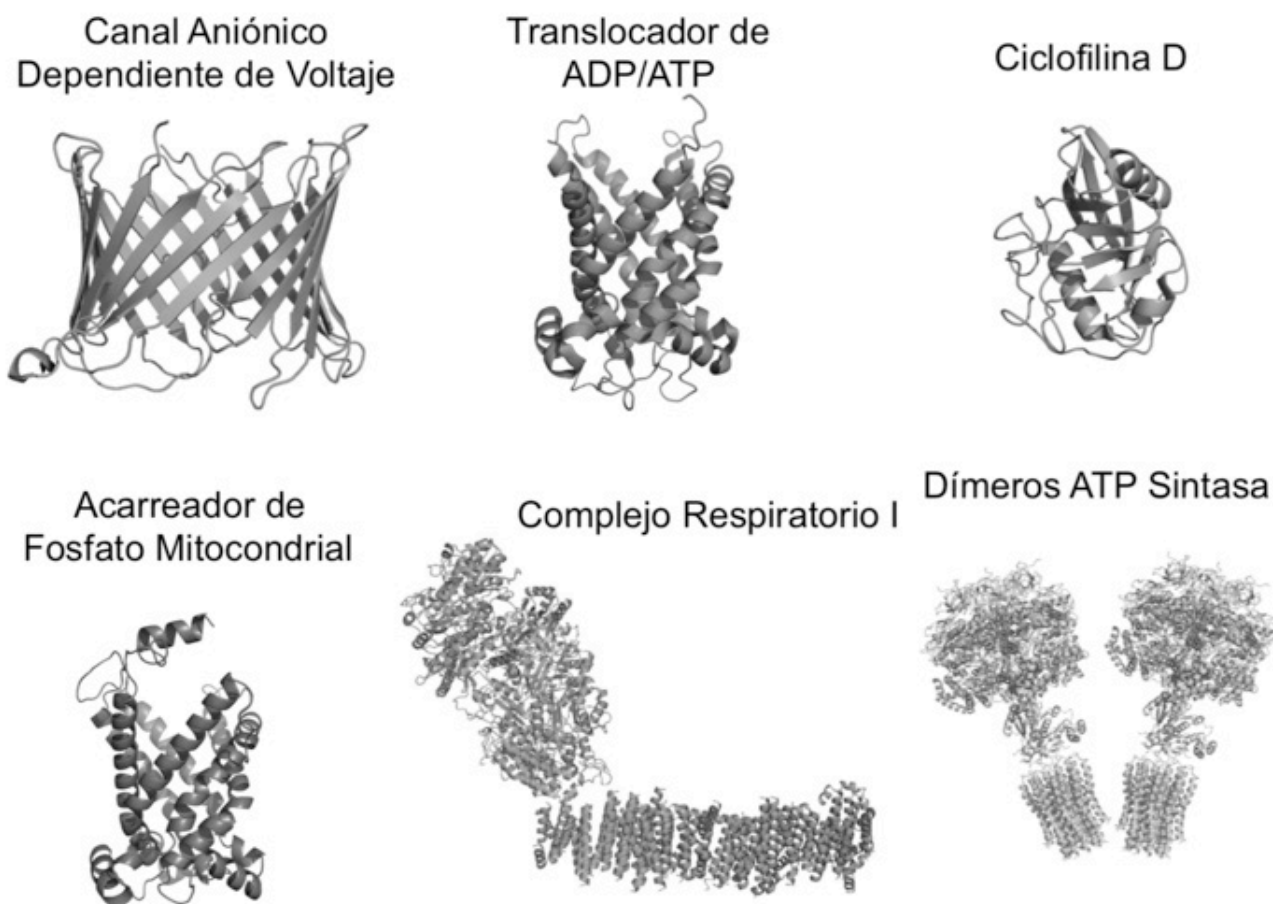


Figura 1. Estructura probable del Poro de Transición de la Permeabilidad en mitocondrias de mamíferos. La porina (VDAC) en la membrana externa mitocondrial ha sido sugerida como un blanco en donde el rojo de rutenio y el Ca^{2+} pueden modular la transición. El translocador de adenín nucleótidos (ANT) ha sido recientemente involucrado en la transición desde un punto de vista regulatorio. El acarreador de fosfato (PiC) ha sido recientemente sugerido como el componente a través del cual son transportados los solutos y metabolitos durante la transición. La ciclofilina D ha sido considerada como un componente regulador del poro. Dímeros de la ATP sintasa ha sido considerada como un probable componente del poro con base a sus propiedades electrofisiológicas. (Modelos generados con Pymol: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

proteínas desempeñan un papel regulatorio más que estructural, pues aun en ausencia de éstas, se sigue detectando el PTP (Fig. 3) (5). Hipótesis recientes proponen que el PTP está formado por dímeros de la ATP sintasa mitocondrial (3). Esto se desprende de experimentos que demuestran la presencia de un megacanal de múltiples estados de conductancia en preparaciones de la ATP sintasa dimérica. La elucidación de los componentes del PTP permitirá el desarrollo de fármacos específicos que permitan bloquear el DIR.

La consecuencia inmediata de la apertura del PTP es la depolarización del organelo (7). Como se mencionó anteriormente, el hinchamiento de la mitocondria ocasiona la incapacidad de estos organelos para recuperar su función productora de energía. En estas condiciones, la célula muere

por necrosis (Fig. 2) (8). La liberación de factores apoptóticos así como de ligandos del receptor al factor de necrosis tumoral al espacio extracelular, inducen la apoptosis extrínseca en las células del tejido aledaño a la zona de isquemia (3). Durante un período de isquemia, el pH del medio intra- y extracelular tiende a descender. En estas condiciones, el PTP se encuentra inhibido (6,7). Actualmente se piensa que la protonación de ciertas histidinas en los componentes del poro, inhiben la apertura del canal en estas circunstancias. Sin embargo, cuando se reanuda el aporte sanguíneo al tejido/órgano, la cadena respiratoria comienza a operar restableciendo un gradiente en la concentración de protones e incrementando el pH celular a niveles cercanos a 7.4. En estas condiciones (elevados niveles de Ca^{2+} mitocondrial, daño por EROs y valores de pH

suprafisiológicos) el PTP inicia el colapso final de la célula (4-8).

EL PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD EN LAS MITOCONDRIAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en mitocondrias de mamíferos, las mitocondrias aisladas de la levadura del pan *S. cerevisiae* presentan un Poro de Transición el cual fue caracterizado hace 18 años por los grupos de Rial y Guérin (9,10). La caracterización del canal inespecífico en *S. cerevisiae* fue motivo de polémica entre ambos grupos, sin embargo, éstos sentaron las bases de su probable función, regulación y estructura. Entre estos descubrimientos destacan la inhibición del canal por fosfato, ADP y Mg^{2+} y su activación por restricción de fosfato y adición de ATP. Durante esos años, Pfeiffer propuso que este canal era un PTP de levaduras (yPTP) no sensible a Ciclosporina A, un inmunosupresor y potente inhibidor del PTP en mamíferos (11). Adicionalmente, Pfeiffer demostró que el yPTP presentaba dimensiones similares al PTP, lo cual sugería que ambas eran estructuras equivalentes. En este estudio se demostró que el yPTP no era inducido por Ca^{2+} a menos que se adicionara un ionóforo de Ca^{2+} , demostrando que las mitocondrias de levadura carecen de un sistema uniportador del catión. Esto reubicó el estudio de la transición de la permeabilidad en levaduras y resaltó sus similitudes como un probable modelo para el estudio de patologías mitocondriales en mamíferos como las detectadas durante el DIR y distrofias musculares (12, 13). Es importante recalcar las limitaciones de este modelo. Por ser un organismo facultativo, *S. cerevisiae* manifiesta adaptaciones a la supresión del aporte de oxígeno que no presentan organismos eucariontes superiores y por lo tanto serían un mal ejemplo para el estudio del poro desencadenado por el DIR. Paradójicamente, el ser una levadura facultativa le otorga a *S. cerevisiae* ventajas sobre organismos superiores para el estudio de la fisiología mitocondrial (ver el párrafo siguiente).

Un ejemplo de las ventajas que ofrece *S. cerevisiae* para poder determinar la estructura del yPTP (y probablemente del PTP), es la capacidad que presenta éste para crecer con mitocondrias carentes de proteínas esenciales para la fosforilación oxidativa y muchos otros procesos. Esto permite evaluar la pérdida de sensibilidad a inhibidores reportados para ambos poros como el Mg^{2+} , mersalil y mastoparan en levaduras carentes (mutantes nulas) de probables componentes del yPTP (2). Este es el caso de la pérdida de sensibilidad en levaduras mutantes nulas de VDAC a octilguanidina (OG), un inhibidor del daño por isquemia-reperfusión (13,14). A di-

ferencia de lo observado en mitocondrias aisladas de una cepa silvestre, en mitocondrias carentes de VDAC, la OG no inhibe el hinchamiento mitocondrial y la caída en el $\Delta\Psi$ (14). Los resultados sugieren que VDAC podría ser considerado el blanco en donde la OG inhibe el PTP de mitocondrias de mamíferos (13). Es importante resaltar que llevar a cabo experimentos con mutantes de VDAC en mamíferos no es posible, primero porque tienen tres isoformas del canal y la supresión genética de la isoforma 2 resulta en la muerte del organismo en el estado embrionario (5). Otro caso en donde la levadura permitió determinar el sitio de interacción de un efector del PTP se dio al evaluar el efecto del fosfato y del mersalil sobre el yPTP (15). El fosfato ha sido recientemente catalogado como un inhibidor del PTP y desde hace casi 30 años ha sido utilizado como inhibidor del yPTP (12). Éste es transportado gracias al PiC, el cual deja de funcionar al ser inhibido por mersalil. Experimentos de bioenergética clásica en una cepa mutante nula de PiC en *S. cerevisiae* permitieron elucidar que tanto el fosfato como el mersalil perdían sus efectos de antagonista y agonista del yPTP respectivamente (15). Esto sugiere que el sitio de unión de ambas moléculas es a nivel del PiC.

Un caso más controvertido de similitud entre el PTP y el yPTP se dio cuando se determinó que el Ca^{2+} presentaba un efecto dual en el PTP: A bajas concentraciones, promovía el estado abierto del poro, lo cual se observa durante el DIR. Sin embargo, experimentos de un grupo líder en el ramo demostraron que en presencia de muy bajas concentraciones de rojo de rutenio (Un complejo de rutenio que inhibe la entrada de calcio a la mitocondria), el Ca^{2+} inhibía la apertura del PTP en concentraciones muy similares a las reportadas para la inhibición del yPTP en levadura (13). Experimentos subsecuentes con mitocondrias purificadas de una cepa mutante nula de VDAC permitieron demostrar que el Ca^{2+} interactúa con VDAC para inducir el estado cerrado del yPTP (13).

CONCLUSIONES

El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial es probablemente una estructura conservada en organismos eucariontes. En la actualidad, un número creciente de inhibidores del PTP son reportados. Sin embargo, el sitio o mecanismo a través del cual cumplen sus funciones por lo general no es determinado. En este sentido, la utilización de mitocondrias de *S. cerevisiae* para establecer el blanco de los ligandos reportados representa un modelo relativamente confiable y de fácil utilización para comprender las relaciones estructura-función del PTP de mamíferos y con ello contribuir al dise-

ño racional de fármacos inhibidores del daño por isquemia-reperusión.

Agradecimientos

Manuel Gutiérrez-Aguilar agradece al CONACyT el apoyo otorgado para la realización de una estancia

postdoctoral con el apoyo del programa "ESTANCIAS POSDOCTORALES Y SABÁTICAS AL EXTRANJERO PARA LA CONSOLIDACIÓN DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN 2011". Agradecemos al Dr. Salvador Uribe-Carvajal por los comentarios y sugerencias hechas al manuscrito. 

REFERENCIAS

1. Lehninger AL ND, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry Worth Publishers, New York, NY, USA: 1013.
2. Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2010) The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 584:2504-2509.
3. Kerrigan CL, Stotland MA. (1993) Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 14:165-175.
4. Halestrap AP, Pasdois P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1402-1415.
5. Halestrap AP (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46: 821-831.
6. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. (2013) Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:5887-5892.
7. Zoratti M, Szabo I (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176.
8. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006) Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43: S31-44.
9. Prieto S, Bouillaud F, Ricquier D, Rial E (1992) Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur J Biochem* 208: 487-491.
10. Manon S, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M, Guerin B (1998) Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J Bioenerg Biomembr* 30: 419-429.
11. Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR (1997) Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 272:21104-21112.
12. Azzolin L, von Stockum S, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2010) The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 584:2504-2509
13. Pavon N, Aranda A, Garcia N, Hernandez-Esquivel L, Chavez E (2009). In hyperthyroid rats octylguanidine protects the heart from reperfusion damage. *Endocrine* 35: 158-165.
14. Gutierrez-Aguilar M, Perez-Vazquez V, Bunoust O, Manon S, Rigoulet M, Uribe S (2007) In yeast, Ca²⁺ and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1245-1251.
15. Uribe-Carvajal, S, Luévano-Martínez, L A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., Gutiérrez-Aguilar, M (2011) Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion* 11: 382-390.

LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CINASA DE PROTEÍNAS TIPO A DEPENDIENTE DEL AMP_c EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Sergio Pérez-Landero y Jorge Nieto-Sotelo

Laboratorio de Fisiología Molecular, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D. F., México, Correo E: jorge.nieto@ibiologia.unam.mx

RESUMEN

La fosforilación reversible de las proteínas regula una infinidad de procesos celulares. La cinasa de proteínas dependiente del AMP cíclico (PKA) está presente en todos los eucariontes (protozoarios, animales, algas y hongos) a excepción de las plantas terrestres y su estudio ha revelado mecanismos importantes para la señalización celular. Aquí se describen los componentes de la cascada de señalización de la PKA en *Saccharomyces cerevisiae*, la compartimentalización de las subunidades regulatorias, así como los mecanismos de regulación de la respuesta al estrés, la estimulación del crecimiento filamentoso y la retro-regulación de la actividad de la PKA. El análisis genético de los componentes de la vía PKA en *S. cerevisiae* ha arrojado información muy detallada acerca de su evolución, de sus relaciones estructura-función y de su operación mediante el desarrollo de modelos matemáticos y computacionales.

PALABRAS

CLAVE:

Respuesta al estrés, AMP_c, transducción de señales, desarrollo, diferenciación celular, modelamiento.

ABSTRACT

Many cellular processes are regulated by reversible protein phosphorylation. cAMP dependent protein kinase (PKA) is present in all eukaryotes (protozoa, fungi, algae, and animals) with the exception of land plants and its study has revealed important mechanisms for cell signaling. Here, the components of the PKA signaling cascade in *Saccharomyces cerevisiae*, the compartmentalization of the regulatory subunits as well as the mechanisms for regulation of the stress response, the stimulation of filamentous growth, and the feed-back regulation of PKA activity are described. The genetic analyses of the components of the PKA pathway in *S. cerevisiae* have revealed detailed information about its evolution, structure-function relationships, and operation by means of mathematical and computational modeling.

KEY WORDS:

Stress response, cAMP, signal transduction, development, cellular differentiation, modeling.

INTRODUCCIÓN

La remodelación de la estructura celular está determinada por interacciones complejas y delicadas entre sus componentes, así como por las condiciones del ambiente extracelular. En vertebrados, la PKA juega un papel muy importante en actividades tan dispares como la regulación del metabolismo, los procesos secretorios, la memoria y el aprendizaje (1). La PKA también regula el desarrollo, puesto que mutaciones en el gen *DCO* de *Drosophila*, que codifica a la subunidad catalítica de la PKA, ocasionan defectos en la oogenesis y en la formación de

patrones embrionarios. En vertebrados, la deficiencia de la PKA o su mala activación afectan el tubo neural, las somitas y las extremidades (1).

En *S. cerevisiae*, una de las rutas principales de señalización que regulan el metabolismo y el crecimiento en respuesta a la presencia de nutrientes y a las condiciones de estrés involucra a la PKA (2), la cual estimula tanto a las enzimas de la glucólisis y la fermentación como a aquellas involucradas en el desarrollo y en la proliferación celular. Al contrario, inhibe a las proteínas involucradas en la resistencia al estrés, en la gluconeogénesis y en la síntesis de la trealosa y del glucógeno (2, 3, 4, 5) (Fig. 1). Las

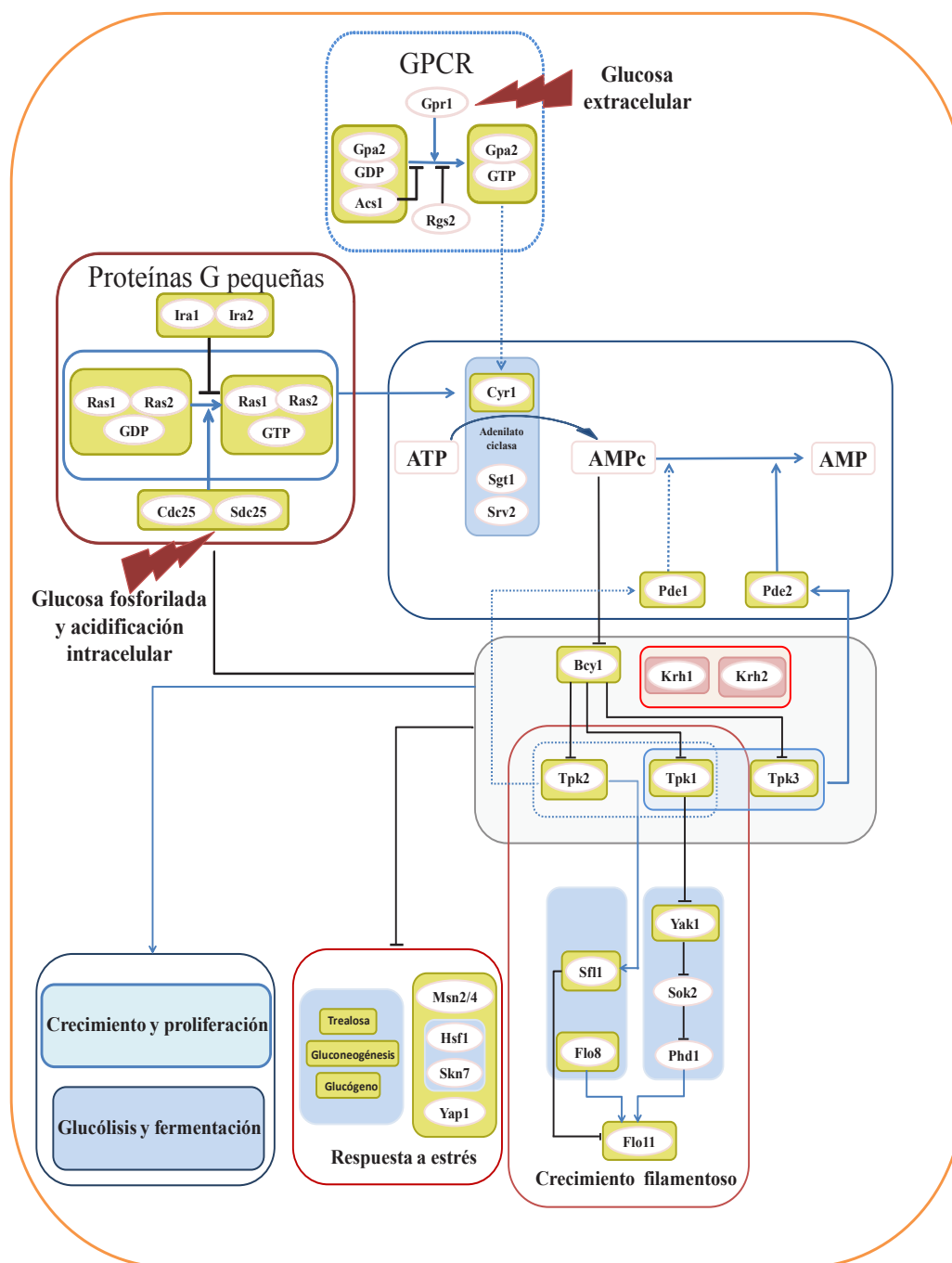


Figura 1. Esquema de la ruta de transducción de señales de la PKA en *S. cerevisiae*. Los cuadros representan a componentes de la vía que actúan de manera más íntima permitiendo apreciar claramente las interacciones entre los distintos módulos que la componen. La ubicación espacial intracelular y la dinámica temporal de las interacciones implican niveles de regulación no representados en éste esquema. Las líneas discontinuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos cuando se añade glucosa a un cultivo que se encuentra creciendo en fuentes de carbono no-fermentables. Las líneas continuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos durante el crecimiento exponencial en medio rico en nutrientes. La adenilato ciclasa es activada rápidamente por el sistema GPCR un minuto después de que la célula en ayuno percibe por primera vez a la glucosa en el medio extracelular, mientras que el sistema de proteínas G pequeñas (Ras) activa y mantiene de manera sostenida la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta al aumento en los niveles de glucosa fosforilada y a la disminución del pH intracelulares.

células de *S. cerevisiae* proliferan cuando disponen de nutrientes y, por el contrario, crecen lentamente cuando éstos escasean o cuando las condiciones físico-químicas del medio les son adversas (2, 5). Para modular su crecimiento la levadura monitorea el ambiente circundante mediante estrategias diversas, integrando los estímulos o señales generadas y reestructurando, incluso, el estado transcripcional del genoma (2, 3). La ruta de señalización de la PKA está altamente conservada en los hongos y, debido a su relevancia en la adaptación a las condiciones nutricionales y ambientales, se le considera como un blanco clave para el desarrollo de fármacos antifúngicos que permitan controlar enfermedades humanas y vegetales. Algunos de estos fármacos en desarrollo actúan a nivel de los Receptores Acoplados a las Proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR), de las subunidades catalíticas o de las fosfodiesterasa, ya que muchos de sus dominios funcionales están conservados.

LAS VÍAS PRINCIPALES QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE LA PKA EN *S. cerevisiae*

La activación de la PKA requiere de dos vías principales (Fig. 1). Una, la vía Gpa1-Gpr2, el equivalente funcional de las proteínas G heterotriméricas de la adenilato ciclasa de los mamíferos, detecta la presencia extracelular de la glucosa o la sacarosa y estimula de manera rápida a la PKA. La segunda, la vía Cdc25-Ras, permite mantener elevada la actividad de la PKA cuando los niveles de glucosa fosforilada aumentan y el pH disminuye dentro de la célula como resultado de la actividad glucolítica. Para monitorear el ambiente circundante, la levadura utiliza a los GPCR. Los azúcares extracelulares son inicialmente percibidos por la proteína receptora transmembranal Gpr1. El receptor, al sensar a la glucosa, estimula el intercambio del GDP por el GTP de la proteína Gpa2 (proteína tipo G α). Unido el GTP a Gpa2, la adenilato ciclasa (AC), Cyr1, es estimulada con el consecuente aumento en la actividad de la PKA en respuesta a la rápida elevación de los niveles del AMPc. Por el contrario, la subunidad Rgs2 (subunidad reguladora RGS -*Regulator of G-protein Signaling*-) promueve la retro/inhibición de la cascada, promoviendo la actividad GTPasa de la proteína Gpa2 (4). Un segundo punto de control negativo de la actividad de Gpa2 lo constituye la proteína Asc1 que, al unirse al complejo Gpa2-GDP, inhibe el intercambio de GDP por GTP (4). En la Vía Cdc25-Ras, los sacáridos intracelulares son fosforilados antes de ser metabolizados y se postula que, cuando la glucosa se encuentra fosforilada, la unión del GTP a las proteínas G monoméricas Ras (Ras1 y Ras2) aumenta de dos a tres veces (2). Esto

es relevante, ya que la isoforma Ras-GTP también estimula a la AC ayudando a mantener elevada su actividad. La estimulación de la AC por Ras-GTP requiere de elementos adicionales, como la proteína asociada a la AC, Srv2, o la proteína Sgt1, que puede actuar como chaperona (3). El intercambio del GDP por el GTP de Ras requiere de los factores de intercambio Cdc25 y Sdc25 (2, 5). Por el contrario, las proteínas Ira, Ira1 e Ira2, inhiben a Ras acelerando su actividad intrínseca de GTPasa (2). Ras y los intercambiadores de nucleótidos de guanina tipo Cdc25 están presentes en los mamíferos, pero no activan a la AC.

LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS Y REGULATORIAS DE LA PKA

La PKA en *S. cerevisiae* consta de tres subunidades catalíticas (C) codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (2, 3). Estas cinasas son reguladas negativamente por Bcy1 (R), mediante la formación de un complejo tetramérico inactivo compuesto por dos subunidades R unidas a dos subunidades C (6). En otras especies, el número de isoformas que componen la PKA es mayor. En humanos, por ejemplo, cuatro genes codifican a las subunidades regulatorias y tres a las catalíticas (7), por lo que *S. cerevisiae* representa un modelo de menor complejidad para el estudio de la dinámica y de las interacciones entre las subunidades de la PKA.

A concentraciones elevadas del AMPc se activan las Tpk's, ya que dos moléculas de este nucleótido cíclico (AMPc) se unen a cada una de las subunidades R, promoviendo cambios estructurales que desencadenan en la disociación del complejo R-C y, en consecuencia, la liberación/activación de las subunidades catalíticas -Tpk1, Tpk2 o Tpk3- (6). Las Tpk's reconocen residuos de serina o treonina en sus proteínas blanco ubicados dentro de las secuencias consenso R-R/K-X-S*/T* > R-X2-S*/T* = R-X-S*/T* (8).

Los análisis filogenéticos sugieren que las isoformas Tpk1 y Tpk3 son evolutivamente más cercanas, mientras que la Tpk2 es la más distante de las tres (9), siendo el dominio N-terminal el que más ha variado, tanto en longitud como en secuencia. En Tpk2 el dominio N-terminal es el de menor longitud, componiéndose de 66 aminoácidos, en comparación con 83 y 84 de Tpk1 y Tpk3, respectivamente (6). Esto ha llevado a sugerir que el dominio N-terminal podría determinar la especificidad de la cinasa hacia sus sustratos. Esta hipótesis se basa en el análisis de quimeras entre el dominio N-terminal de las Tpk's de *Candida albicans*, donde se demostró que este segmento en Tpk2 es relevante para regular el crecimiento invasivo (10). El análisis fino

de la relación estructura-función en la subunidad Tpk2 de *S. cerevisiae* mostró que existen dominios afuera del núcleo catalítico, tanto en el C- como en el N-terminales, que afectan la actividad de la enzima (11). Este tipo de estudios permitirá facilitar el diseño de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas. En varios procesos celulares se ha visto que la actividad de las Tpk's es redundante, por ejemplo: en la estimulación del crecimiento, en la progresión del ciclo celular y en la inhibición de la gluconeogénesis (2, 3). Sin embargo, se conocen ciertos procesos celulares que de manera específica son regulados por las Tpk's. La subunidad Tpk2 estimula el crecimiento filamentosos (12), desreprime a los genes involucrados en la degradación de la trehalosa, favorece la asimilación del hierro y la homeostasis del agua (13) y antagoniza a las subunidades Tpk1 y Tpk3 durante la inhibición de la actividad los factores de transcripción Hsf1 y Skn7 (14, 15). La subunidad Tpk1 estimula la expresión de genes que participan en la respiración celular y en la biosíntesis de aminoácidos con cadenas ramificadas (12). La subunidad Tpk3 estimula el contenido enzimático mitocondrial durante el crecimiento fermentativo (15) e hiper-fosforila a Rgt1, que es un factor de transcripción involucrado en la represión del gen *HXK2* -hexocinasa 2-, cuando la concentración de la glucosa es alta.

LA COMPARTAMENTALIZACIÓN Y LA RETRO-REGULACIÓN DE LA PKA

La existencia de varias subunidades catalíticas e incluso regulatorias, como en vertebrados, que permiten la formación de distintas isoformas de los complejos R-C constituye un primer nivel de especificidad para encausar a la señalización. Un segundo nivel de regulación, es la localización de la PKA en compartimentos subcelulares específicos mediante la unión de las subunidades regulatorias con las proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs, *A-kinase anchoring proteins*). Las AKAPs sirven como andamios moleculares que unen a la PKA con otras proteínas (p. ejem., enzimas blanco, receptores, componentes de vías de señalización) de manera que su localización espacial dentro de la célula es más próxima, facilitando su interacción. Se han descrito varias AKAPs que se unen ya sea a la subunidad regulatoria RI o a la RII, lo que constituye un segundo nivel de regulación de la PKA bien establecido en vertebrados, con posibles ortólogos en invertebrados, pero, sorprendentemente, no en hongos como la levadura *S. cerevisiae* (7).

Como se describió anteriormente, la inhibición que ejerce Bcy1 sobre las Tpk's, favorecida cuando los niveles del AMPc son bajos, está bien caracteri-

zada. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que las proteínas con repeticiones *kelch*, Krh1 y Krh2, facilitan la interacción entre Bcy1 y las cinasas (4). En cultivos de *S. cerevisiae* en fase logarítmica, crecidos con medio nutritivo rico y glucosa como fuente de carbono, los niveles de la proteína Bcy1 son aproximadamente el doble de la suma de las tres Tpk's (16). Estas proporciones asegurarían la formación del tetrámero R-C. Sin embargo, en estas condiciones es cuando la PKA presenta mayor actividad. Es posible que este efecto se deba, parcialmente, a diferencias en la compartimentalización intracelular de estos componentes. De hecho, se sabe que la localización subcelular de las subunidades catalíticas no es homogénea, ya que durante el crecimiento en glucosa, la mayoría de las moléculas de Bcy1 se encuentran en el núcleo al igual que Tpk2, mientras que la mayor parte de las moléculas de Tpk1 y Tpk3 se localizan en el citoplasma (16). Además, en estas condiciones, en mutantes con alta actividad de PKA debido a la delección de *BCY1*, la Pde2 se ubica en el núcleo (17). Lo anterior permite sugerir la hipótesis de que las diferencias en la concentración del AMPc son drásticas entre los diferentes compartimentos subcelulares.

Cuando las levaduras son sometidas a ayuno y reciben una fuerte dosis de glucosa (como durante la fase "lag" de la curva de crecimiento), se dispara la síntesis rápida y vigorosa del AMPc. Sin embargo, este pico de AMPc disminuye por efecto de la fosfodiesterasa de baja afinidad Pde1 que inmediatamente es activada por las cinasas Tpk1 y Tpk2 constituyendo de esta manera una horquilla de retroregulación negativa (18).

Otro tipo de retroregulación ocurre durante la fase exponencial del crecimiento en glucosa. En este caso el AMPc es degradado principalmente por la fosfodiesterasa de alta afinidad Pde2 (19) debido a que Tpk1 y Tpk3 la activan y la estabilizan (17). Interesantemente, al cambiar la fuente de carbono a rafinosa, o cuando la actividad de la PKA disminuye, una gran cantidad de Pde2 se transloca del núcleo hacia el citoplasma (17). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual la PKA actúa sobre Pde2. Otro punto de autorregulación negativa se da a nivel de la modulación de la estabilidad de Ras en la membrana (3). Las Tpk's hiperfosforilan a Cdc25, comprometiendo su estabilidad en la membrana y la unión con Ras (20). En ambos casos la actividad de la AC disminuye. Además, el anclado a la membrana plasmática y estabilidad de Cdc25 dependen de Ssa1 (Hsp70) (2). Durante el estrés oxidativo o de calor los niveles de Cdc25 disminuyen (21). Se ha planteado que este efecto se debe a que, en condiciones estresantes, el aumento en la cantidad de proteínas desnaturalizadas disminuye

la disponibilidad de Ssa1 y de otras chaperonas que se requieren para proteger y renaturalizar a otras proteínas. Por lo anteriormente expuesto, se ha sugerido que las proteínas Ras podrían estar relacionadas en la transmisión de señales en condiciones de estrés.

La localización espacio-temporal de los componentes que inciden sobre la PKA es relevante para la regulación de los distintos procesos celulares en los cuales está involucrada. En *S. cerevisiae* Bcy1 se concentra en el núcleo cuando el medio de cultivo contiene glucosa, mientras que, en fuentes no fermentables de carbono (p. ejem., etanol, glicerol), su localización es homogénea entre el citoplasma y el núcleo. La distribución subcelular de Bcy1 es regulada por la fosforilación de dos regiones ricas en serinas de su extremo N-terminal (22). La forma no fosforilada se encuentra en el núcleo, mientras que, cuando es fosforilada por la cinasa Yak1, se mueve hacia el citoplasma. La retención de Bcy1 en el citoplasma depende de la proteína Zds1, que interactúa físicamente con el N-terminal de Bcy1 una vez que éste es fosforilado por Yak1. Existe evidencia de que otro factor retiene a Bcy1 en el citoplasma, ya que la fosforilación de una de las dos regiones ricas en serina es independiente de Zds1 (22). Cuando las levaduras son sometidas a choque térmico (37°C) en presencia de glucosa, una subconjunto de la población de Bcy1 sale del núcleo al citoplasma, translocación que es dependiente tanto de Zds1, como de Zds2 (22). Los datos anteriores indican que el mecanismo de compartimentalización subcelular de la subunidad reguladora de la PKA es funcionalmente homólogo entre levaduras y animales, pero no a nivel estructural, pues las primeras carecen de AKAPs y los segundos de Zds1 y Zds2.

LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

El estado transcripcional de cada gen está gobernado tanto por la estructura que adquiere la cromatina como por los factores de transcripción (FT), que son capaces de reclutar a la RNA polimerasa tipo II. Este proceso requiere de la coordinación de muchas proteínas y de la unión de los FT a secuencias específicas ubicadas cerca del inicio de la transcripción a lo largo del tiempo y en células, tejidos u órganos específicos. Se sabe que la remodelación de la expresión genética está gobernada por FT jerárquicos dependiendo del estímulo. Por ejemplo, en respuesta a un choque térmico o al aumento paulatino en la temperatura, el principal FT que interviene es Hsf1, ya que su función se requiere para la inducción de 165 genes (23). Los FT Msn2, Msn4, Yap1 y Skn7 también colaboran en la inducción de la expresión

de los genes de respuesta al estrés (GRE). La actividad de la PKA está relacionada a la actividad de algunos de estos FT.

Los genes *MSN2* y *MSN4* codifican para los FT Msn2 y Msn4, respectivamente, los cuales conservan un dominio de unión al DNA del tipo "dedo de zinc". Ambos participan en la respuesta general al estrés en *S. cerevisiae* (24) y reconocen a los elementos consenso *STRE* (5'-CCCCT-3') promoviendo el aumento de la expresión de 200 a 300 genes en réplica a distintas condiciones adversas (25). Uno de los principales mecanismos de inhibición de Msn2 y Msn4 consiste en contenerlos en el citoplasma, lo cual se logra con la fosforilación del dominio de localización nuclear. Las cinasas TOR y PKA regulan el estado de fosforilación de Msn2 y Msn4 de manera directa. En condiciones de estrés, los FT Msn2 y Msn4 son hiper-fosforilados y rápidamente re-localizados al núcleo, oscilando dinámicamente entre el núcleo y el citoplasma (26).

Si bien la regulación de la actividad de Hsf1 vía la PKA ha estado sujeta a debate, recientemente se demostró que las variaciones genéticas entre cepas de *S. cerevisiae* determinan el estado de la actividad de Hsf1 cuando la cascada de señalización Ras-PKA es alterada. Se postula que la inhibición de Hsf1 por la PKA es de manera indirecta, en donde la chaperona Hsp70 es intermediaria en esta relación (15). Estos datos concuerdan con observaciones acerca del complejo Hsf1-Hsp70, que mantiene baja actividad transcripcional durante el crecimiento exponencial en medio con glucosa. En condiciones de estrés se promueve su disociación, liberando a Hsf1 en un estado transcripcional de mayor actividad (27).

LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO FILAMENTOSO

Yak1 constituye un nodo importante en la estimulación del crecimiento filamentoso y de la respuesta a estrés en condiciones nutricionales adversas, actuando paralelamente y hacia abajo de la PKA. La PKA regula el crecimiento filamentoso (12), modulando la especificidad dual de la cinasa de treoninas Yak1. La eliminación de cada uno de los genes que codifican para las Tpk's causa fenotipos diferentes. A falta de *TPK2* este tipo de crecimiento resulta inhibido, mientras que la eliminación de *TPK1* no lo afecta y la eliminación de *TPK3* causa hiper-crecimiento filamentoso, sugiriendo que Tpk3 tiene la capacidad de inhibir y Tpk2 de estimular este fenotipo (12). Específicamente, Tpk1 fosforila a Yak1 inactivándola. Se sugiere que esta modificación mantendría a Yak1 en el citoplasma. En contraste, en el estado activo (no-fosforilado) Yak1 preferentemente se

localiza en el núcleo, donde promueve la expresión de *FLO11* a través de los FT Sok2 y Phd1 (28). En cambio, Tpk2 estimula el crecimiento filamentosos controlando la unión al promotor de *Flo11* del FT *Flo8* y la disociación, por fosforilación, del represor transcripcional *Sfl1*.

LA INTEGRACIÓN DE LAS INTERACCIONES

Los modelos computacionales constituyen herramientas importantes para investigar el comportamiento de los sistemas complejos. Se han propuesto modelos matemáticos discretos y determinísticos para describir la dinámica de las interconexiones entre los componentes de la ruta de señalización Ras/PKA/AMPC (29, 30). Aunque en el modelo matemático determinístico se modeló la actividad de la PKA, incluyendo el asa de retro-inhibición, se consideró que la actividad de las Tpk's es redundante (30). El modelo matemático del tipo discreto se enfocó principalmente a estimar la cantidad relativa de los componentes citoplasmáticos de la ruta de señalización de la PKA pero, similarmente al trabajo anterior, se consideró como redundante la actividad de las Tpk's (29). Recientemente se ha desarrollado un modelo computacional discreto en donde la actividad de cada una de las subunidades catalíticas es analizada de manera independiente. Este modelo se basó en datos experimentales del análisis genético de la regulación de la expresión génica dependiente de *Heat Shock Elements* (HSE) vía los FT *Hsf1* y *Skn7* por la PKA, el cual demostró la existencia de interacciones antagónicas entre la subunidad Tpk2 y las subunidades Tpk1 y Tpk3 en la inhibición de *Hsf1* y *Skn7*, así como el papel de las proteínas *Hsp70* (*Ssa1* y *Ssa2*) como mediadoras de la inhibición de *Hsf1* por las Tpk's. Con este modelo se representa la dinámica de las interacciones de la red; entre las tres subunidades catalíticas con su subunidad reguladora *Bcy1* a través de la retroinhibición de la síntesis de AMPc vía *Pde2*. La modelación matemática de la vía PKA está todavía en una etapa temprana de desarrollo. Las nuevas generaciones de modelos matemáticos y computacionales deberán de incorporar tanto a la ubicación espacial, así como a la dinámica temporal de los elementos que componen esta vía de señalización. Los modelos que incluyan estos parámetros permitirán postular hipótesis que no siempre se obtienen bajo mera intuición, así como analizar el comportamiento del sistema con dos o más variables incluidas de manera simultánea o en compartimentos diferentes, tal y como ocurre en la célula. Otro reto más ambicioso implicará el acoplamiento de las dinámicas antes mencionadas con los experimentos masivos llevados a cabo en *S. cerevisiae* que han permitido conocer

la localización subcelular y la abundancia de todo el proteoma, los cambios en la expresión del genoma y sus interacciones epistáticas. Esto aumentará aún más la complejidad del modelamiento de la vía PKA en el futuro, tanto en *S. cerevisiae* como en humanos.

CONCLUSIONES

Una gran cantidad de laboratorios han analizado extractos de plantas (algas y plantas terrestres [briófitas y pteridofitas]) para detectar al AMPc o a las cinasas dependientes del AMPc desde los años 70 del siglo pasado. Las evidencias más contundentes indican que, salvo en algas verdes y rojas, estos componentes no son detectables en las plantas terrestres. La ausencia de éstos componentes regulatorios (cAMP, subunidad reguladora de la PKA) y catalíticos (subunidad catalítica de la PKA, adenilato ciclasa) en las plantas terrestres, concuerda con los estudios genómicos recientes de plantas vasculares y no vasculares (31, 32). Cabe aclarar que la falta de secuencias similares a la PKA en las plantas terrestres no implica la ausencia de otras familias de cinasas de proteínas de serina y treonina que no dependen del cAMP para su funcionamiento (33) o incluso la ausencia de genes que codifican componentes de la vía PKA cuya secuencia ha divergido de sus ancestros algales a tal grado que ya no es posible reconocerlas con los algoritmos tradicionales tipo BLAST. La ausencia de componentes fácilmente reconocibles de la PKA, en las plantas terrestres, pudiera ser una consecuencia de su larga historia evolutiva. Se ha sugerido que el ancestro común de las plantas, que divergió hace mil millones de años de las algas verdes, perdió funciones importantes relativas a la motilidad celular, como los cilios y los flagelos y su cuerpo basal asociado, el centriolo (34). En *Chlamydomonas reinhardtii* el cAMP se requiere para el proceso de apareamiento y para la función y regulación flagelar, por lo que se podría hipotetizar que la pérdida de las funciones anteriores incluyó también la de los genes implicados en la vía PKA. Sin embargo, estudios más recientes han avivado la controversia acerca de si las plantas tienen la capacidad de sintetizar cAMP y cGMP vía adenilil o guanilil ciclasas no convencionales, respectivamente (35). Una hipótesis alternativa es que las plantas terrestres desarrollaron distintas estrategias de monitoreo y adecuación al ambiente, por su naturaleza sésil y quizás evolucionaron posteriormente, por convergencia evolutiva, la capacidad de sintetizar cAMP o cGMP.

En los animales, la PKA desempeña un papel muy importante en la transmisión de señales tanto intracelulares como intercelulares en procesos fisio-

lógicos, de desarrollo, metabólicos y de proliferación celular a través de la activación de enzimas y genes. La fácil manipulación experimental de *S. cerevisiae* y la baja complejidad genética de los componentes que regulan a la PKA han facilitado el rápido avance en el estudio de su regulación e interacciones físicas y genéticas. Aunado a lo anterior, la variabilidad genética entre cepas de la especie *S. cerevisiae* ha permitido iniciar estudios acerca de cómo es que fenómenos como la epistasis influyen en la actividad de ésta cascada de señalización. El modelaje ma-

temático y computacional de la vía permitirá algún día entender y predecir la importancia de la diversidad genética en la adecuación a los ambientes en constante cambio.

AGRADECIMIENTOS

S.P.L. contó con el apoyo de la beca doctoral del CONACYT (165709) y recibió apoyo del donativo CONACYT (78982) del cual JNS es responsable.



TABLA I

Comparación de los componentes de los módulos que conforman a la ruta de señalización de la PKA en *Homo sapiens* y en *S. cerevisiae*. Abreviaturas: TSH (hormona estimulante de la tiroides), GEF (factores de intercambio de nucleótidos de guanina), GAPs (proteínas activadoras de la GTPasa), AKAPs (proteínas-ancra de la PKA). Nótese que en humanos existe una gran diversidad de moléculas Ras, GEFs, GAPs y proteínas con repeticiones Kelch. Sin embargo, para el caso de Ras, GEFs y GAPs, se sabe que no existe interacción alguna con la PKA. Para el caso de las proteínas con repeticiones Kelch, no se ha determinado aún si median la interacción entre las subunidades R y C de la PKA.

Módulo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Proteínas G heterotriméricas	TSH, α y β -adrenérgico, muscarínico de acetilcolina, dopamina, etc. (receptores). Cuatro subclases de proteínas G α , cada una con varios miembros: G α_s , G α_i , G α_q y G $\alpha_{12/13}$. Cinco proteínas G β ; doce proteínas G γ .	Gpr1 (receptor de glucosa); Gpa2 (G α_s); Rgs2 (regulador).
Proteínas G monoméricas	Todos los componentes presentes, pero no están relacionados a la estimulación de la AC	Ras1, Ras2 (proteínas G); Cdc25, Sdc25 (GEFs); Ira1, Ira2 (GAPs).
AMP cíclico	AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, AC6, AC7, AC8, AC9 y sAC (adenilato ciclasas); Pde 1, Pde2, Pde3, Pde4, Pde5, Pde6, Pde7, Pde8, Pde9, Pde10, Pde11 (fosfodiesterasas)	Cyr1 (adenilato ciclasa), Srv2 (activador de la AC); Sgt1 (cochaperona de la AC); Pde1 y Pde2 (fosfodiesterasas)
PKA	C α , C β , C γ , PrkX (subunidades catalíticas); RI α , RI β , RII α , RII β (subunidades regulatorias); > 50 AKAPs (localización subcelular de R)	Tpk1, Tpk2, Tpk3 (subunidades catalíticas); Bcy1 (subunidad regulatoria); Krh1, Krh2 (proteínas con repeticiones Kelch); Zds1 y Zds2 (localización subcelular de R)

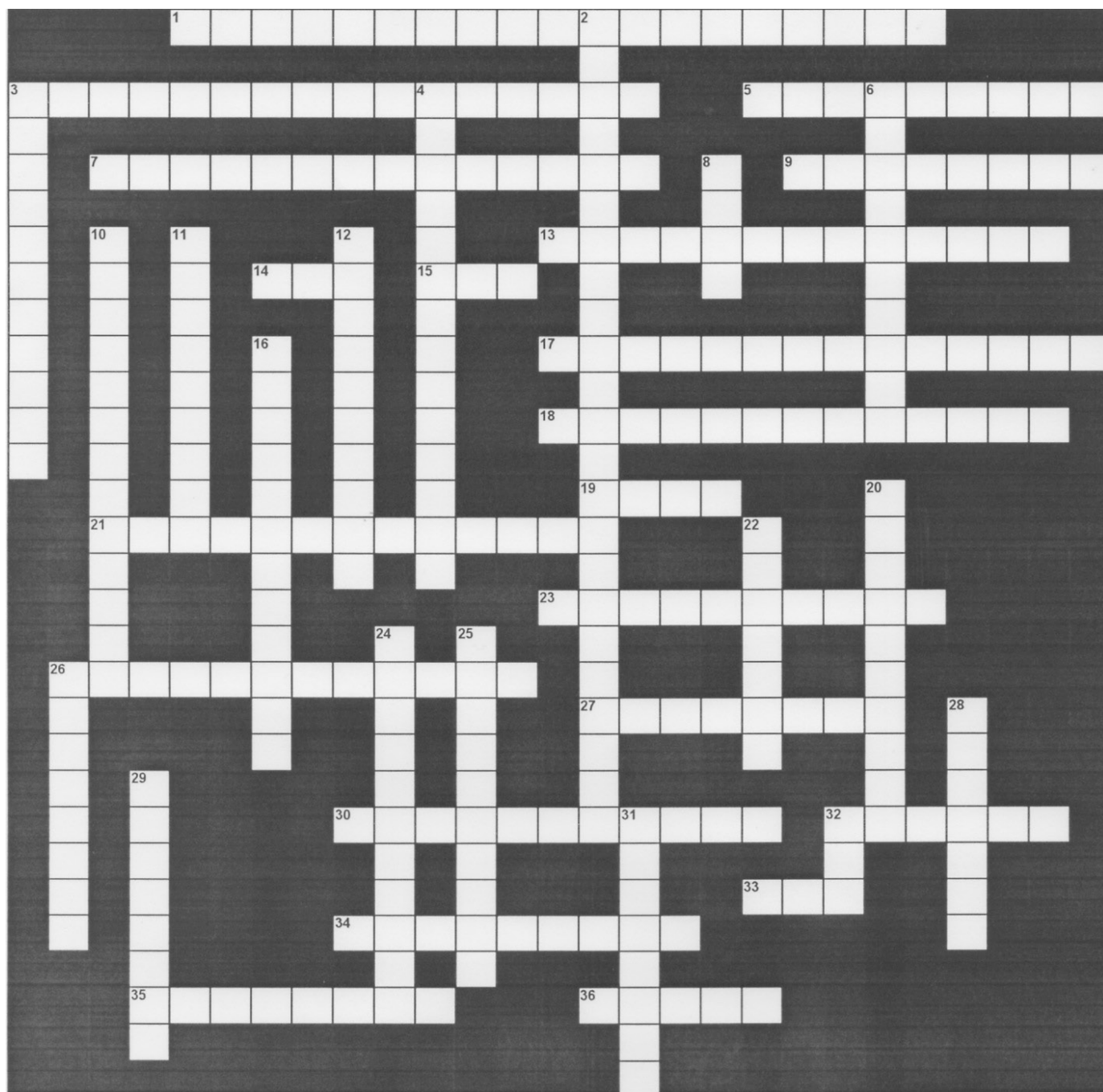
REFERENCIAS

1. Milenkovic L, Scott MP (2010) Not lost in space: trafficking in the Hedgehog signaling pathway. *Sci Signal* 3 p. pe14 [DOI: 10.1126/scisignal.3117pe14].
2. Thevelein JM, de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
3. Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 253-282.
4. Rubio-Teixeira M, Van Zeebroeck G, Voordeckers K, Thevelein JM (2010) *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Res* 10: 134-149.
5. Folch-Mallol JL, Martínez LM, Casas SJ, Yang R, Martínez-Anaya C, López L, Hernández A, Nieto-Sotelo J (2004) New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150: 2865-2879.
6. Cannon J F, Tatchell K (1987) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 7: 2653-2663.
7. Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klusmann E (2010) Mechanisms of protein kinase A anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol* 283: 235-330.
8. Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558.
9. Hunter T, Plowman G D (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22: 18-22.
10. Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A, Ernst JF (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 42:1243-57.
11. Kennedy EJ, Ghosh G, Pillus L (2008) Identification of functionally distinct regions that mediate biological activity of the protein kinase A homolog Tpk2. *J Biol Chem* 283: 1084-1093.
12. Pan X, Heitman J (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 3981-3993.
13. Robertson LS, Causton HC, Young RA, Fink GR (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5984-5988.
14. Pérez-Landero S (2007) El papel de Hsf1 y Skn7 en la regulación de la respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae* a través de la vía Ras-AMPc-PKA. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, 87 páginas.
15. Chevtzoff C, Vallortigara J, Avéret N, Rigoulet M, Devin A (2005) The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim Biophys Acta* 1706: 117-125.
16. Tudisca V, Recouvreur V, Moreno S, Boy-Marcotte E, Jacquet M, Portela P (2010) Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *Eur J Cell Biol* 89: 339-348.
17. Hu Y, Liu E, Bai X, Zhang A (2010) The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 10: 177-187.
18. Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* 10: 91-104.
19. Park JI, Grant CM, Dawes IW (2005) The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 311-319.
20. Jian D, Aili Z, Xiaojia B, Huansheng Z, Yun H (2010) Feedback regulation of Ras2 guanine nucleotide exchange factor (Ras2-GEF) activity of Cdc25p by Cdc25p phosphorylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 584:4745-4750.
21. Wang L, Renault G, Garreau H, Jacquet M (2004) Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150: 3383-3391.

22. Griffioen G, Swinnen S, Thevelein JM (2003) Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem* 278: 23460-23471.
23. Hahn JS, Thiele DJ (2004) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 279: 5169-5176.
24. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235.
25. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
26. Garmendia-Torres C, Goldbeter A, Jacquet M (2007) Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. *Curr Biol* 17: 1044-1049.
27. Halladay JT, Craig EA (1995) A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Mol Cell Biol* 15: 4890-4897.
28. Malcher M, Schladebeck S, Mösch H-U (2011) The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187: 717-730.
29. Cazzaniga P, Pescini D, Besozzi D, Mauri G, Colombo S, Martegani E (2008) Modeling and stochastic simulation of the Ras/cAMP/PKA pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* evidences a key regulatory function for intracellular guanine nucleotides pools. *J Biotechnol* 133: 377-385
30. Williamson T, Schwartz JM, Kell DB, Stateva L (2009) Deterministic mathematical models of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol* 3:70-84
31. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.
32. Canaves JM, Taylor SS (2002) Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J Mol Evol* 54:17-29.
33. Hardie DG. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 97-131.
34. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC et al. (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117: 541-552.
35. Gehring C (2010) Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling - past and present. *Cell Communication and Signaling* 8: 15 <http://www.biosignaling.com/content/8/1/15>

CRUCIBIOQ[®] GLICOSILACIÓN

Yolanda Saldaña Balmori y Rocío Salceda Sacanelles
Correos E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx; rsalceda@correo.ifc.unam.mx



HORIZONTALES

1. Polímeros lineales formados por unidades repetitivas de disacáridos constituidos por aminoazúcares, los principales representantes son heparina, ácido hialurónico, condroitín y dermatán sulfato; se localizan en la matriz extracelular y participan en procesos de adhesión celular, crecimiento y proliferación celular y el mantenimiento de hidratación de los tejidos.
3. Proceso por el que en una película sensible a los rayos X se graban las posiciones de entidades radiactivas, como proteínas y ácidos nucleicos inmovilizados en una matriz (nitrocelulosa, gel, célula); con esta técnica se puede estudiar el transporte intracelular de una proteína marcada radiactivamente.
5. Enlace que ocurre espontáneamente en presencia de un agente oxidante al reaccionar dos residuos de cisteína, su formación contribuye a estabilizar la estructura tridimensional de las proteínas; en eucariontes se forman en la luz del retículo endoplásmico.
7. Lípidos que cuando se descubrieron por Thudichum en 1884, resultaba enigmática su función, actualmente se han identificado algunos que participan en la membrana plasmática de las neuronas, otros participan en procesos de reconocimiento en la superficie celular y algunos que tienen porción glucosídica, definen los grupos sanguíneos del humano.
9. Reacción de _____ es el nombre que recibe la glicación o glicosilación no enzimática debido a la producción de melanoidinas ante el calentamiento de alimentos proteicos, lo que produce el color característico de la carne asada.
13. Lectina presente en la luz del retículo endoplásmico que además de participar en el almacenamiento de calcio previene el plegado prematuro incorrecto de las proteínas recién sintetizadas.
14. Siglas de productos finales de la glicación, son el resultado de una serie de reacciones químicas que ocurren posteriormente a la adición no enzimática de un azúcar a otra molécula, los productos intermedios en la formación de éstos, se conocen como productos Amadori, de la reacción de Maillard y bases de Schiff; su formación se ha relacionado con la progresión de la diabetes y enfermedades asociadas con la edad adulta como el Alzheimer.
15. Siglas en inglés (ácido periódico-de Schiff) que le da el nombre a la tinción utilizada para la detección de ciertas moléculas abundantes en el tejido conectivo y la lamina basal de los epitelios.
17. Componentes de la matriz extracelular, del cartílago y del líquido sinovial de los animales, formado por la unión de proteínas con glucosaminoglicanos; estas moléculas por su gran resistencia y flexibilidad permiten que, entre otras funciones, el cartílago se pueda comprimir y re-expandir, además de que son moduladores de señales de comunicación entre la célula y su entorno.
18. Reacción enzimática de los azúcares con lípidos y proteínas en el retículo endoplásmico; en el caso de las proteínas constituye la modificación postraducciona l más importante ya que para que ser secretadas o formar parte de la superficie deben ser sintetizadas en el retículo endoplásmico y unidas a un oligosacárido y posteriormente son enviadas al aparato de Golgi.
19. Siglas en inglés de los receptores de productos finales de glicación avanzada, pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y se encuentran en la superficie celular, son importantes en la inmunidad innata contra patógenos, intervienen en el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, en el síndrome metabólico, artritis, aterosclerosis y cáncer.
21. Identificada con las siglas Con A, es una lectina que actúa específicamente al unirse a residuos de D-manosa y D-glucosa localizadas en el lado extracelular de las membranas; además es utilizada como agente aglutinador de células malignas en los linfocitos
23. Aminoácido de una proteína, que por su grupo amino de la cadena lateral se une a oligosacáridos para dar lugar a una glicoproteína; estas moléculas le confieren estabilidad a las proteínas ya que incrementan su solubilidad, participan modificando su carga neta, su resistencia a la proteólisis y su afinidad en procesos como la, adhesión o la señalización.
26. Moléculas que se encuentran en un alto porcentaje en las membranas de células del sistema nervioso, formadas por ceramida, oligosacáridos y tienen residuos de ácido siálico; junto con esfingolípidos y colesterol forman las balsas lipídicas o caveolas que son sitios de reconocimiento y comunicación intercelular, participan en la transducción de señales; a través de los carbohidratos se unen específicamente a ciertos virus como el de la gripe y a toxinas bacterianas como las del cólera o tétanos.
27. El _____ endoplásmico es una estructura membranosa de las células eucariontes que provee a la célula de una gran superficie en la que se sintetizan proteínas de secreción a las que se adicionan carbohidratos como modificaciones postraduccionales, además en él se realizan reacciones de desintoxicación de la célula.

30. Nombre del proceso por el cual algunas proteínas de la membrana con función reguladora, fijan un grupo lipídico de naturaleza isoprenoide, mediante su unión por un enlace tioéter a un residuo de cisteína.
32. Se llama O-glucosídica a la unión covalente entre el carbono anomérico de un sacárido y el grupo hidroxilo de la _____, treonina, hidroxilisina, hidroxiprolina o lípidos como la ceramida.
33. Siglas del nucleótido que unido a acetilglucosamina participa inicialmente como donador de un carbohidrato que se utiliza para la síntesis de oligosacáridos en el proceso de glicosilación.
34. Organelos celulares que contienen una diversidad de enzimas proteolíticas e hidrolíticas; las proteínas que las forman son altamente glicosiladas, se sintetizan en el retículo endoplásmico y son modificadas postraduccionalmente en el aparato de Golgi; presentan residuos de manosa -6-fosfato identificados por un receptor localizado en las cisternas trans del aparato de Golgi.
35. Se refiere a la unión de la célula a una superficie que puede ser otra célula o la matriz extracelular; intervienen moléculas como las cadherinas, selectinas e integrinas que son moléculas que participan en la transducción de señales y en la interacción parásito-hospedero.
36. Así se designa al péptido transitorio de una secuencia corta de aminoácidos de una proteína naciente que dirige a ésta hacia el retículo endoplásmico en eucariontes o a la membrana plasmática en procariontes.

VERTICALES

2. Enzima de la N-glicosilación, está localizada en la membrana del retículo endoplásmico, une un oligosacárido al nitrógeno de la amida de la asparagina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr.
3. Brefeldin A es un _____ producido por *Penicillium brefeldianum* que inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi e induce el transporte retrogrado de proteínas del mismo aparato hacia el retículo endoplásmico a través de actuar sobre la proteína ARF-1.
4. Proteínas que están unidas covalentemente a uno o más carbohidratos; tienen diversas funciones, son: transportadoras, receptoras, estructurales, hormonales o enzimáticas.
6. Proteína pequeña, es reguladora y está presente en todos los organismos eucariontes; controla la estabilidad, función y localización intracelular de una gama de proteínas; se une covalentemente a proteínas mal plegadas, lo que conduce a la degradación de estas últimas.
8. Siglas de una secuencia señal (Lys-Asp-Glu-Leu) de las proteínas que las retiene en la luz del retículo endoplásmico y con ello se evita que sea secretada.
10. Aumento de glucosa en la sangre que ocasiona complicaciones en los individuos entre las que se incluyen retinopatía, nefropatía, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular entre otras; se ha identificado que la glicación de algunas proteínas contribuyen a la patología diabética.
11. Proceso no enzimático en el que azúcares como la glucosa y la fructosa se unen a proteínas y lípidos, lo que lleva al mal funcionamiento de ellas y da como resultado la formación de moléculas identificadas con las siglas en inglés AGE.
12. Lectinas de la membrana plasmática que interactúan con carbohidratos de la matriz extracelular o de la superficie de otras células y contribuyen al flujo de la información entre la célula y la matriz.
16. Antibiótico que bloquea el primer paso de la síntesis del oligosacárido de 14 residuos que se une a las proteínas en el retículo endoplásmico para constituir a las glucoproteínas.
20. El dolicol fosfato participa en el _____ de oligosacáridos al retículo endoplásmico y aparato de Golgi para su unión a lípidos o proteínas.
22. El ácido _____ es un término genérico para los N- u O-derivados del ácido neuramínico se sintetizan a partir de N-acetilgalactosamina y ácido fosfoenolpirúvico mediante las sialiltransferasas, forman parte de las glicoproteínas en las cisternas del aparato de Golgi; participan entre otras reacciones, en procesos de reconocimiento celular, en la modulación de sistema inmune y en la apoptosis.
24. Ácido cuya sal pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos, formado por aproximadamente 50,000 unidades repetidas de glucuronato y N-acetilglucosamina con enlaces β 1-4, se encuentra presente en el humor vítreo, en el líquido sinovial, tiene la capacidad de poder absorber una gran cantidad de agua y por su estructura viscosa lubrica y da flexibilidad a las articulaciones.
25. Los defectos _____ de la glicosilación son un grupo de enfermedades autosómicas recesivas (1/50 mil a 1/100 mil nacimientos) ocasionadas por una síntesis anormal de glucoproteínas ya sea por error en el transporte de los azúcares o por déficit de las enzimas, ocasionando retraso psicomotriz, anomalías esqueléticas, alteración en la coagulación, problemas de regulación hormonal, fibrosis hepática, citolisis y piel de naranja, entre otras.

- 26.** Tay-Sachs es el nombre de una enfermedad _____ de carácter hereditario, autosómico recesiva, se caracteriza por la deficiencia en la enzima hexosaminidasa A que causa el almacenamiento de gangliósidos en el cerebro ocasionando la muerte de las células, lo que produce un deterioro progresivo de las capacidades físicas y mentales del individuo.
- 28.** Lípido poliisoprenoide de cadena larga que cuando está fosforilado, transfiere a través de la membrana del retículo endoplásmico a un oligosacárido de 14 azúcares que se une al residuo de asparagina de una proteína que se está sintetizando en este organelo.
- 29.** Glicoproteínas localizadas en la superficie celular, algunas pueden interactuar con células de la respuesta inmune generando un efecto inmunosupresor, otras son tóxicas al inhibir el crecimiento celular; contienen sitios de unión específica para carbohidratos, lo que les permite participar en los mecanismos de reconocimiento y aglutinación celular.
- 31.** Proteína abundante del tejido conjuntivo de cartílagos y huesos a la que se adiciona galactosa a los residuos hidroxilados de lisina y prolina; en la ancianidad hay glicosilación no enzimática la que conduce a que haya pérdida de elasticidad y fuerza tensora, al mismo tiempo que aumenta la rigidez.
- 32.** Siglas en inglés de la partícula de reconocimiento de la señal que se une simultáneamente a la subunidad grande del ribosoma y a la secuencia de señalización hacia el retículo endoplásmico de una proteína que se está sintetizando.

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva y Ricardo Jasso Chávez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

Cinética enzimática

Cinética enzimática. Efecto del pH

Las enzimas microbianas han reemplazado a los catalizadores químicos utilizados en la industria química, farmacéutica, alimenticia y textil debido a que su proceso de producción es más amigable con el ambiente comparado con los procesos utilizados con anterioridad. En la actualidad dichas enzimas tienen un gran potencial a nivel industrial, un ejemplo de ello son las proteasas alcalinas que se utilizan preferencialmente como aditivos en la formulación de detergentes sobre compuestos sintéticos, debido a su capacidad para degradar manchas proteínicas como sangre, chocolate y leche (1). Dos tercios de las proteasas producidas a nivel industrial son de origen microbiano, entre los que destacan principalmente el género *Bacillus* sp. Las proteasas utilizadas deben tener un alto nivel de actividad y estabilidad en un amplio intervalo de pH y temperatura, por lo que es importante implementar estrategias para su obtención con la finalidad de incrementar su rendimiento. En este sentido, se implementó el uso de lodos residuales para la producción de proteasas alcalinas a partir de *Bacillus licheniformis*, para lo cual se llevó a cabo la recuperación y purificación de la proteasa a partir del filtrado del cultivo fermentado. La eficacia de la enzima se ha examinado en presencia de detergentes comerciales estándar y se determinó que su máxima actividad fue a 60 °C, manteniendo el 97 % de su actividad durante 180 min de incubación y que la presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} incrementaron la actividad (2).

La actividad de la enzima se determinó por el método modificado de Kunitz (2), midiendo a 275 nm la producción de tirosina liberada a partir

de la hidrólisis de caseína. Se incubó 1 mL de la enzima diluida con 5 mL de caseína (1.2 % p/v) por 10 min a 37° C a diferentes valores de pH. El intervalo de pH se realizó utilizando diferentes amortiguadores; acetato (pH 5), fosfato (pH 6-7), borato (pH 8-9), bicarbonato (pH 10), Robinson y Stokes ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$) (pH 11-12). La reacción se detuvo por la adición e incubación de la mezcla con 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % (w/v) para desnaturalizar y precipitar la proteína no hidrolizada. Una unidad internacional de actividad (IU) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol (181.2 μg) de tirosina/min a partir de caseína a pH 8.2 y 37° C. La tabla 1 muestra la actividad de la proteasa alcalina de *B. licheniformis* a diferentes valores de pH.

Con los valores obtenidos determinar:

1. la V_{max} , K_m y la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) a cada valor de pH del ensayo.
2. los valores de pK_a e identificar los residuos de los aminoácidos involucrados en la unión y en la catálisis.

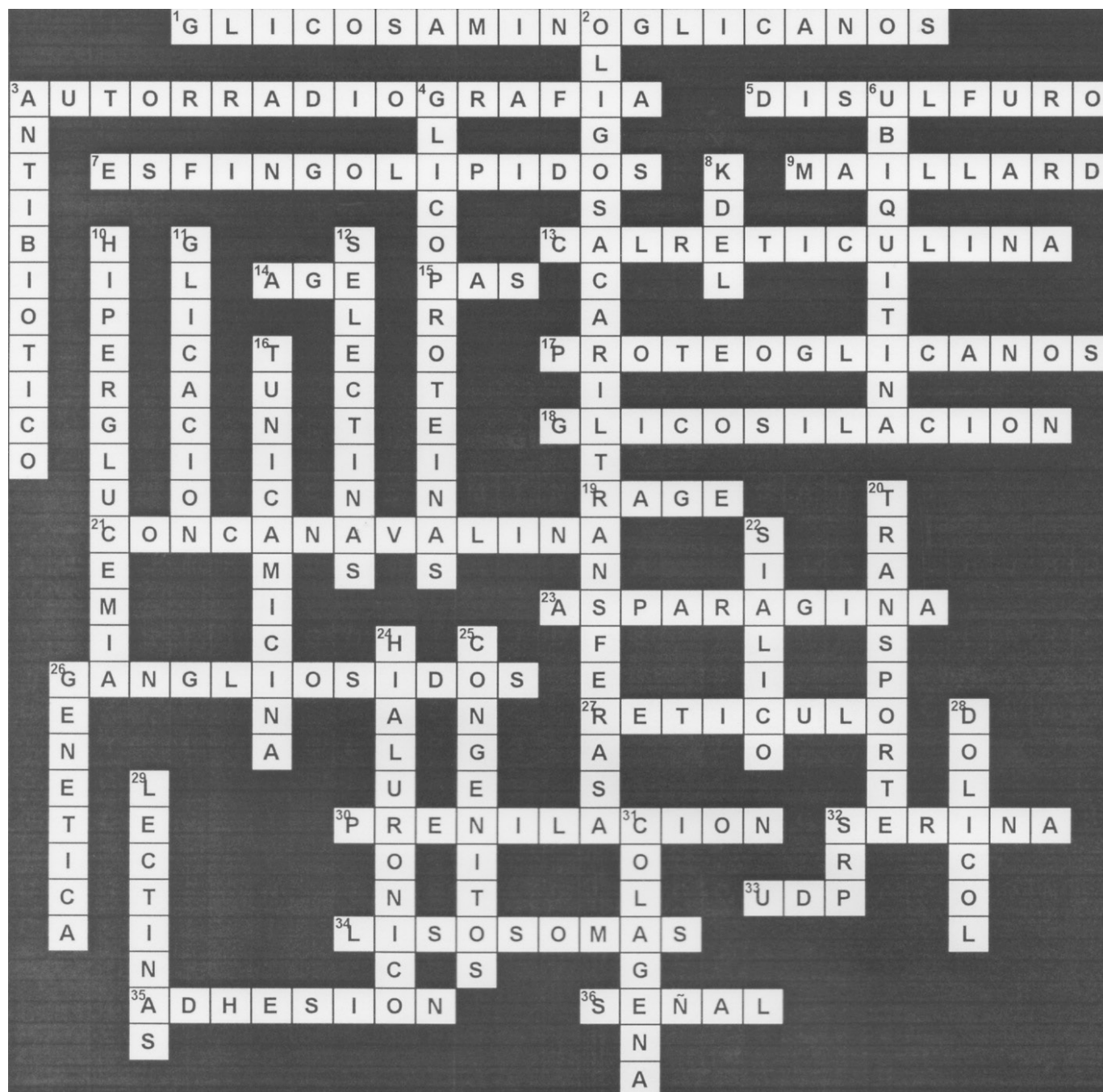
Referencias

1. Renganathan Jayakumar, Shanmugam Jayashree, Balumuri Annapurna, Sundaram Seshadri (2012) Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-012-9902-6.
2. Jyothi Bezawada, S Yan, Rojan P John, RD Tyagi, RY Surampalli (2011) Biotechnology Research International doi:10.4061/2011/238549.
3. Segel IH (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York. p.957

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®] GLICOSILACIÓN

Yolanda Saldaña Balmori y Rocío Salceda Sacanelles

Correos E: balmori@laguna.fmedic.unam.mx; rsalceda@correo.ifc.unam.mx



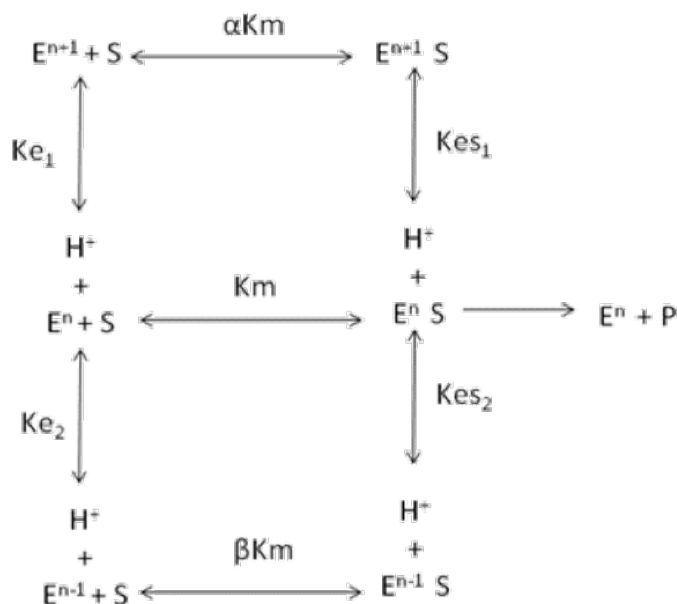
RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva y Ricardo Jasso Chávez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

Se ha demostrado que la actividad de las enzimas varía respecto al pH, debido a que en su sitio activo pueden tener aminoácidos con varios grupos ionizables (ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, histidina, arginina y lisina) involucrados en la unión y catálisis. A bajos valores de pH la enzima esta protonada (E^{n+1}) mientras que a altos valores estará desprotonada (E^{n-1}), de acuerdo con el siguiente modelo para dos grupos ionizables:



Donde se asume que las tres formas de la enzima son capaces de unir al sustrato pero solo la forma $E^n S$ es catalíticamente activa: n es el número de grupos ionizables, E^n es la forma de la enzima catalíticamente activa, E^{n+1} y E^{n-1} son las formas no catalíticas, K_{e1} y K_{e2} representan las constantes de disociación de protón de la enzima libre, K_{es1} y K_{es2} las constantes de disociación de protón de los complejos enzima-sustrato ($E^{n+1} S$ y $E^{n-1} S$), α y β son factores que modifican la afinidad de la enzima por el sustrato.

La ecuación de velocidad de Michaelis-Menten que describe el efecto del pH sobre la enzima es:

$$v = \frac{V_{max}^* S}{K_m^* + S} \quad \dots \dots \dots 1$$

Donde:

$$V_{max}^* = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{H^+}{K_{es1}}\right) + \left(\frac{K_{es2}}{H^+}\right)} \quad \dots \dots \dots 2$$

$$K_m^* = K_m \frac{(1 + \left(\frac{H^+}{K_{e1}}\right) + \left(\frac{K_{e2}}{H}\right))}{(1 + \left(\frac{H^+}{K_{es1}}\right) + \left(\frac{K_{es2}}{H^+}\right))} \quad \dots \dots \dots 3$$

Los valores de los parámetros cinéticos son aparentes, lo cual se indica con asteriscos pues están afectados por la concentración de protones $[H^+]$.

Con los valores de la Tabla 1 se construyó la gráfica de actividad de la proteasa alcalina a diferentes concentraciones de caseína y diferentes valores de pH (Fig. 1); con los mismos datos se realizó el gráfico de dobles recíprocos ó gráfico de Lineweaver-Burk (Fig. 2), donde se puede observar que la K_m , la V_{max} y la eficiencia catalítica dependen del valor del pH del ensayo. Los valores de K_m , V_{max} y V_{max}/K_m se pueden obtener a partir de los valores de la ordenada al origen ($1/V_{max}$), abscisa al origen ($-1/K_m$) y de la pendiente (K_m/V_{max}) de la figura 2. En la Tabla 2 se muestran los parámetros cinéticos calculados a cada valor de pH utilizando el método de Lineweaver-Burk. Se determinó que a valores de pH extremos (pH 5 y 12) la velocidad máxima de la proteasa fue muy baja en comparación con las actividades determinadas en el intervalo de pH 9-10 (el valor de la ordenada al origen $b = 1/V_{max}$ disminuye); la afinidad de la enzima (K_m) en el intervalo de pH analizado es variable (el valor de la abscisa al origen $a = -1/K_m$), mientras que la eficiencia catalítica de la enzima se incrementa a pH 10.

Tabla 1Actividad de la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* a diferentes valores de pH

Caseína (mM)	pH	Actividad de la proteasa alcalina (IU/mL)							
		5	6	7	8	9	10	11	12
0		0	0	0	0	0	0	0	0
5		0.15	0.18	0.35	0.66	2.54	3.89	1.8	0.32
10		0.22	0.254	0.72	1.32	4.8	7.9	2.3	0.98
20		0.35	0.43	0.85	1.65	5.72	8.43	3.6	1.43
30		0.55	0.68	0.98	1.98	6.43	9.32	4.87	2.101
40		0.72	0.89	1.12	2.08	6.78	9.89	5.32	2.62
80		0.85	0.912	1.23	2.32	6.9	10.05	5.54	3.18

Una unidad internacional (UI) es igual a un 1 μ mol de tirosina producido por minuto.

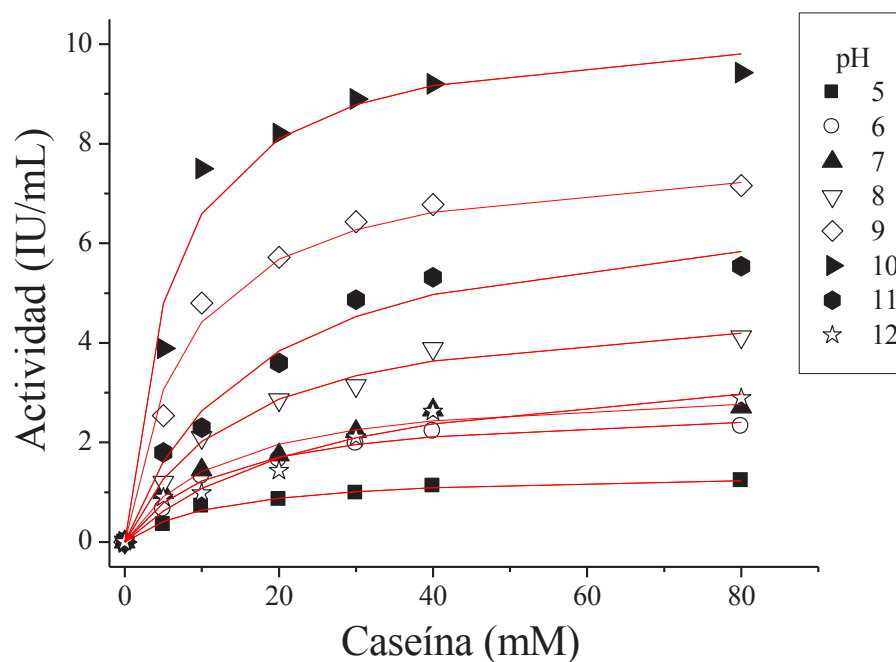


Figura 1. Actividad de la proteasa alcalina a diferentes valores de pH. Los ajustes se obtuvieron de forma independiente a cada valor de pH utilizando la ecuación no lineal de Michaelis-Menten.

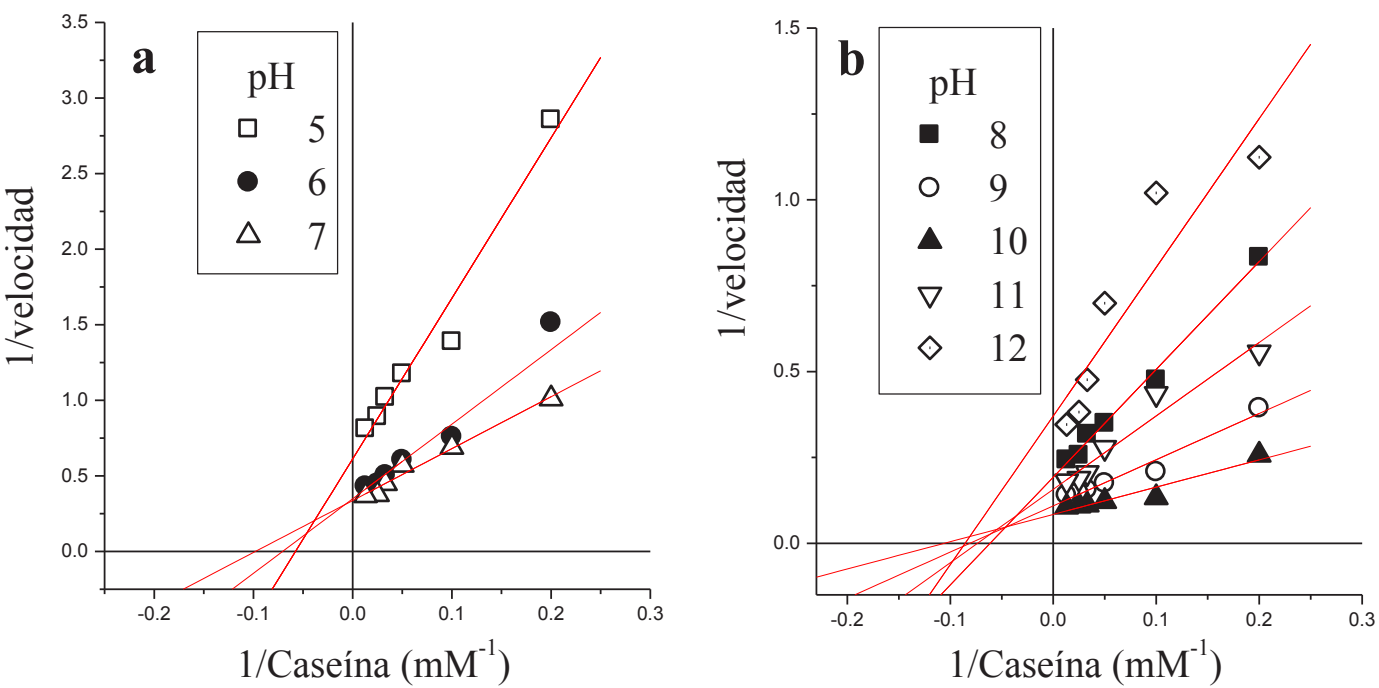


Figura 2. A partir del gráfico de Lineweaver-Burk a) intervalo ácido de pH (5-7) y b) intervalo básico de pH (8-12) se pueden obtener los valores de K_m , V_{max} y V_{max}/K_m a partir de la ordenada al origen ($1/V_{max}$), abscisa al origen ($-1/K_m$) y de la pendiente (K_m/V_{max}).

Tabla 2

Parámetros cinéticos de la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* obtenidos a partir de la caracterización cinética realizada a diferentes valores de pH y calculados a partir del ajuste por regresión lineal del método Lineweaver-Burk

pH	V_{max}^* (IU/mL proteína)	K_m^* (mM)	V_{max}/K_m^* min ⁻¹
5	1.6	17.3	0.1
6	3.3	18.9	0.2
7	2.4	7.7	0.3
8	5.2	16.3	0.3
9	9.0	12.0	0.8
10	11.9	9.4	1.3
11	6.4	13.6	0.5
12	2.7	11.7	0.2

Considerando el doble recíproco de la ecuación 2, la ordenada al origen es:

$$\frac{1}{V_{max}^*} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{H^+}{V_{max}K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{V_{max}H^+} \dots \dots \dots 4$$

A valores de pH bajos (1-6 ó $[H^+]$ alta), el término $K_{es2}/(V_{max}H^+)$ puede despreciarse, por lo que la ecuación 4 se reduce a:

$$\frac{1}{V_{max}^*} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{H^+}{V_{max}K_{es1}} \dots \dots \dots 5$$

De forma similar, el término $H^+/(V_{max}K_{es1})$ puede despreciarse a valores de pH altos (8-14 ó $[H^+]$ baja), por lo que la ecuación 4 se reduce a:

$$\frac{1}{V_{max}^*} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_{es2}}{V_{max}H^+} \dots \dots \dots 6$$

La pendiente del doble recíproco de la ecuación (3) es:

$$\frac{K_m^*}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}K_{e1}}H^+ + \frac{K_mK_{e2}}{V_{max}H^+} + \frac{K_m}{V_{max}} \dots \dots \dots 7$$

El término $(K_mK_{e2})/(V_{max}H^+)$ puede ser despreciado a valores de pH bajos (1-6 ó $[H^+]$ alta), por lo que la ecuación 7 se reduce a:

$$\frac{K_m^*}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}K_{e1}}H^+ + \frac{K_m}{V_{max}} \dots \dots \dots 8$$

De modo similar, a pH básico, el término $K_m/(V_{max}K_{e1})H^+$ puede ser despreciado a valores de pH altos (8-14 ó $[H^+]$ baja); por lo que la ecuación 7 se reduce a:

$$\frac{K_m^*}{V_{max}} = + \frac{K_mK_{e2}}{V_{max}H^+} + \frac{K_m}{V_{max}} \dots \dots \dots 9$$

Considerando las ecuaciones anteriores, es posible regraficar los valores de las ordenadas al origen ($1/V_{max}$) y las pendientes (K_m/V_{max}) vs $[H^+]$ ó $1/[H^+]$ dependiendo del intervalo de pH (ácido o básico, respectivamente). En estos regráficos es posible obtener el valor de las constantes de

disociación K_{e1} , K_{e2} , K_{es1} y K_{es2} , a partir del cruce con las abscisas (Fig. 3). Los valores de pK_a se obtuvieron calculando el - logaritmo de las constantes de disociación y fueron $pK_{e1} = 5.09$, $pK_{e2} = 11.7$, $pK_{es1} = 5.3$ y $pK_{es2} = 11.6$. En los regráficos es importante notar que solo se deben tomar en cuenta aquellos puntos que caen dentro de la recta, ya que los que no lo hacen se encuentran fuera del intervalo de pH estudiado.

Otra forma de calcular los valores de pK_a con mayor precisión es realizar el ajuste por regresión no lineal utilizando las ecuaciones 2 y 3 descritas anteriormente (Fig. 4). La ecuación 2 se editó para obtener los valores de K_{es1} y K_{es2} ; mientras que a partir de las ecuaciones 2 y 3 se obtuvo la ecuación 10 para obtener K_{e1} y K_{e2} :

$$\frac{V_{max}}{K_m} = \frac{\left(\frac{V_{max}}{K_m}\right)^*}{\left(1 + \left(\frac{K_{e1}}{H^+}\right) + \left(\frac{H^+}{K_{e2}}\right)\right)} \dots \dots \dots 10$$

La edición de estas ecuaciones se realizó utilizando el programa de computo Origin 5.0. Al realizar el análisis a pH ácidos se observó la presencia de un tercer grupo ionizable que probablemente esté participando en la estabilidad de la enzima (Fig. 4). La ventaja al utilizar este método es que se obtienen los valores de pK_a de unión y de catálisis directamente esto es, sin regráficos (Tabla 3).

Una tercera opción para obtener los valores de pK_a es mediante el uso del gráfico de Dixon Webb, obtenido a partir de la forma logarítmica de las ecuaciones 2 y 10. Para la ecuación 2, se obtiene la siguiente ecuación en forma logarítmica:

$$\log V_{max}^* = \log V_{max} - \log \left[1 + \left(\frac{H^+}{K_{es1}}\right) + \left(\frac{K_{es2}}{H^+}\right) \right] \dots 11$$

A pH ácido, los términos 1 y K_{es2}/H^+ se pueden despreciar debido a que son muy pequeños respecto a H^+/K_{es1} , por lo que la ecuación simplificada es:

$$\log V_{max}^* = pH - (pK_{es1} - \log V_{max}) \dots \dots \dots 12$$

A pH básico, los términos 1 y H^+/K_{es1} se pueden despreciar debido a que son muy pequeños respecto a K_{es2}/H^+ , por lo que la ecuación simplificada es:

$$\log V_{max}^* = pH + (pK_{es2} - \log V_{max}) \dots \dots \dots 13$$

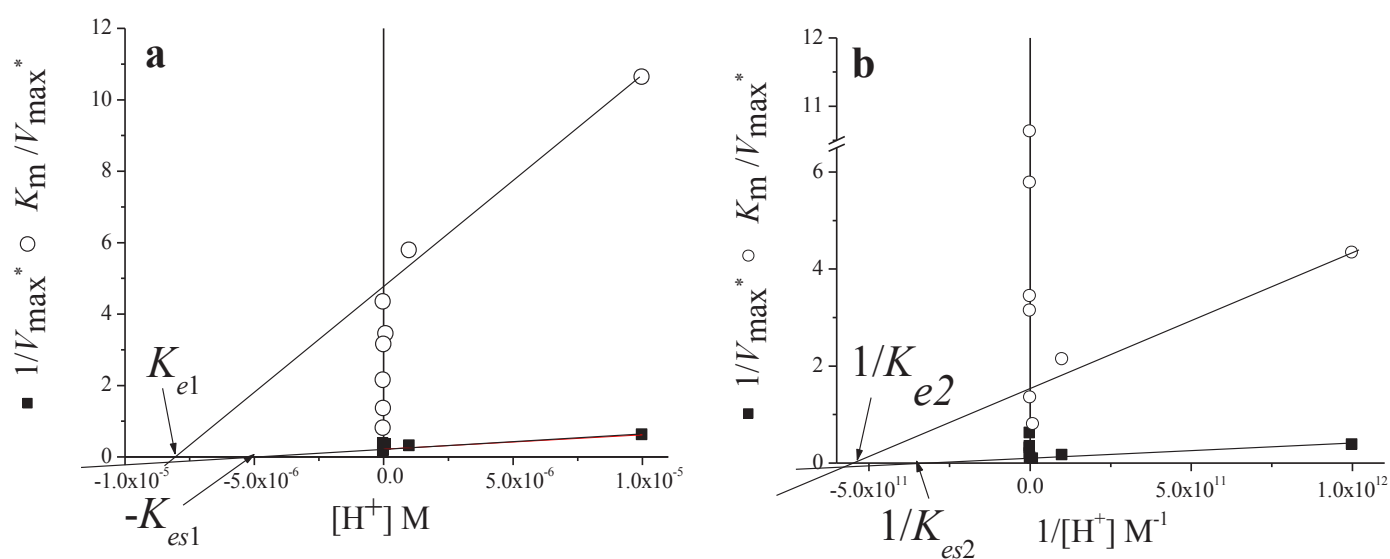


Figura 3. A partir de los regráficos a) $1/V_{max}$ o K_m/V_{max} versus $[H^+]$ para el intervalo de pH ácido y b) $1/V_{max}$ o K_m/V_{max} versus $1/[H^+]$ para el intervalo de pH básico, es posible obtener el valor de las constantes de disociación K_{e1} , K_{e2} , K_{es1} y K_{es2} , a partir del cruce con las abscisas.

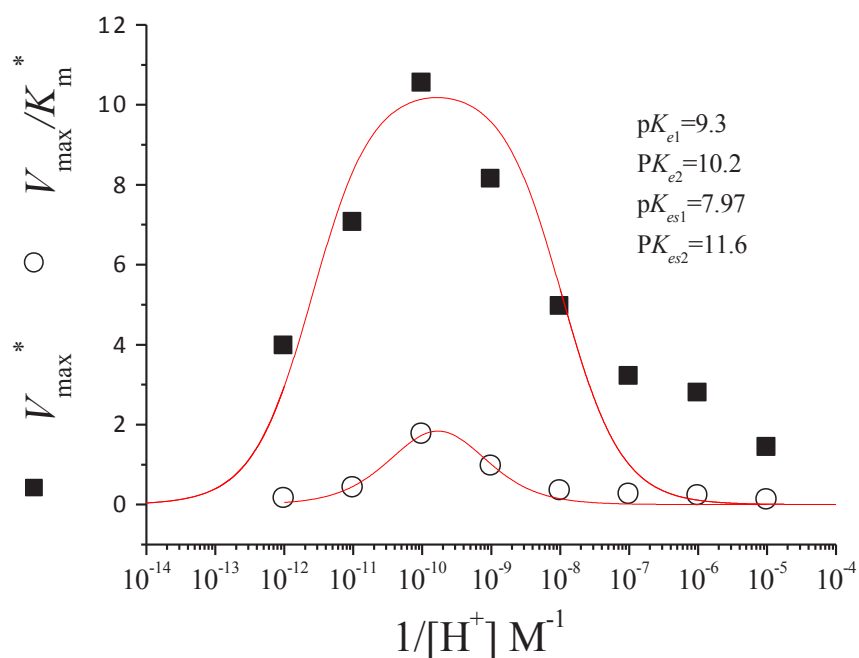


Figura 4. Análisis por ajuste no lineal a diferentes valores de pH obtener el valor de las constantes de disociación pK_{e1} , pK_{e2} , pK_{es1} y pK_{es2} .

Tabla 3

Constantes cinéticas involucradas en la unión y catálisis de la proteasa alcalina de *B. licheniformis* calculadas a partir de métodos de análisis por regresión lineal y no lineal

	Lineweaver Burk	Dixon Webb	Ajuste no lineal
pK_{es1}	5.3	6.7	7.9
pK_{es2}	11.6	10.8	11.7
pK_{e1}	5.09	7.04	9.3
pK_{e2}	11.7	10.4	10.2

De manera similar se obtiene la ecuación logarítmica a partir de la ecuación 10 para intervalos de pH ácido y la ecuación que resulta es:

$$\log \frac{V_{max}^*}{K_m} = pH - \left[pK_{e1} - \log \left(\frac{V_{max}}{K_m} \right) \right] \dots \dots \dots 14$$

y para pH básico, la ecuación es:

$$\log \frac{V_{max}^*}{K_m} = pH + \left[pK_{e2} - \log \left(\frac{V_{max}}{K_m} \right) \right] \dots \dots \dots 15$$

$$\frac{V_{max}}{V_{max}} = 1 \quad y \quad \frac{V_{max}/K_m}{V_{max}/K_m} = 1 \quad \dots \dots \dots 16$$

El gráfico de Dixon Webb (Fig. 5) se obtuvo graficando el $\log V_{max}^*$ o el $\log (V_{max}/K_m)^*$ versus el pH, en esta gráfica se puede trazar una línea recta tangente a la curva de pendiente = 1 y otra de pendiente= -1 (debido a que el valor de la pendiente de la variable independiente en las ecuaciones 14 y 15 es 1, ver ecuación 16) hasta que intersecten con el valor de V_{max} y (V_{max}/K_m) reales que se obtuvieron a partir del gráfico de Lineweaver Burk y están marcados con líneas horizontales.

Entonces los valores de pK_a serán iguales al valor de pH en el punto de intersección de estas dos líneas. Así se puede obtener directamente los valores de pK_{es1} , pK_{es2} , pK_{e1} y pK_{e2} . Es importante

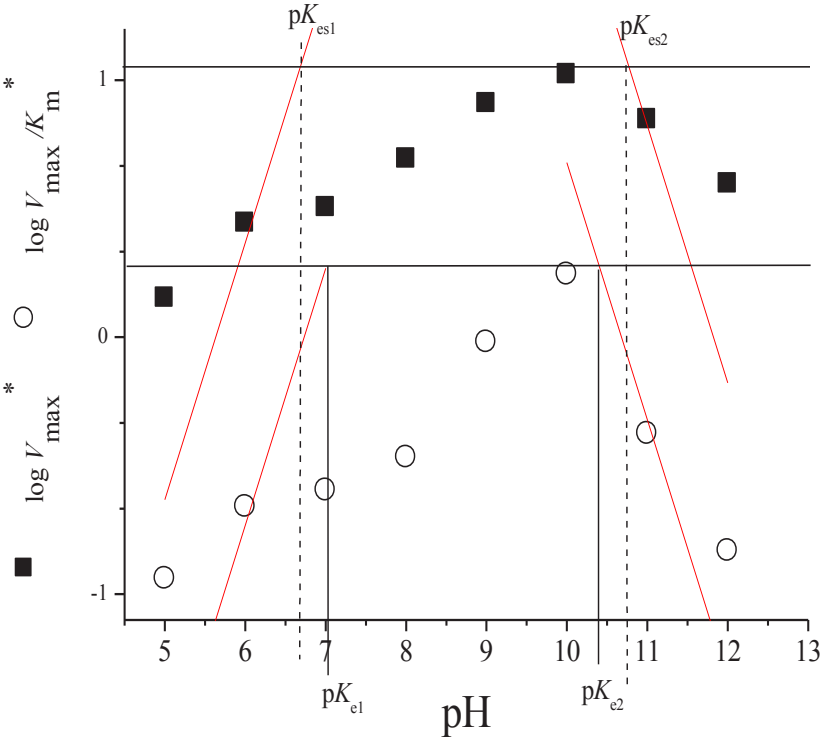


Figura 5. A partir del Gráfico de Dixon Webb: $\log V_{max}^*$ o el $\log (V_{max}/K_m)^*$ versus el pH, es posible obtener los valores de pK_{es1} , pK_{es2} , pK_{e1} y pK_{e2} . directamente del punto de intersección de la recta tangente de $m=1$ y $m=-1$ con el valor de V_{max} y (V_{max}/K_m) reales.

mencionar que los resultados obtenidos de estos gráficos sólo serán confiables cuando la diferencia entre los valores de pK_a , evaluados a pH ácido y básico (p. ej. pK_{e1} y pK_{e2}), sea mayor a tres unidades de pH. De acuerdo con la Fig. 5 los valores calculados ($pK_{es1}=6.7$, $pK_{es2}=10.8$, $pK_{e1}=7.04$ y $pK_{e2}=10.4$) cumplen con dicho criterio.

Se determinó que esta enzima fue una típica proteasa alcalina cuyo pH óptimo es 10. Los valores de las constantes de disociación obtenidos por los tres métodos diferentes correlacionan muy bien entre sí. Los valores de pK_a obtenidos a pH alcalino (8-12), es decir para la segunda constante de disociación de la enzima libre y del complejo enzima sustrato (pK_{e2} y pK_{es2}) son cercanos a los de la tirosina ($pK_a=9.8-10.5$) y/o arginina ($pK_a=11.6-12.6$). Las mayores diferencias entre los métodos lineales y el no lineal se obtuvieron para las constantes de disociación a valores de pH ácido (pK_{e1} y pK_{es1}). A este respecto, las serina y treonina proteasas así como las aspartil proteasas, utilizan un residuo de ácido aspártico e histidina para llevar a cabo la catálisis. El pK_a de un residuo de histidina ($pK_a=5.5-7$) o un ácido aspártico ($pK_a=3-5$) puede oscilar dependiendo del ambiente en el que se encuentre en la enzima. De esta forma los valores de pK_{e1} y pK_{es1} obtenidos del análisis lineal concuerdan con los valores de

pK_a del aspártico y/o histidina (Tabla 3). Por este motivo es importante hacer especial énfasis en realizar un análisis completo y adecuado al estimar los parámetros cinéticos por métodos lineales antes de realizar el ajuste no lineal, para no sobre interpretar los datos experimentales. Sin embargo, para validar la participación de estos aminoácidos en la catálisis enzimática se requiere realizar experimentos adicionales utilizando compuestos que reaccionen de manera específica con estos aminoácidos (tirosina, arginina o histidina) mediante nitración, cloración o iodación de residuos de tirosina u oxidación de grupos sulfuro o realizar mutagénesis sitio dirigida para cambiar estos aminoácidos y con ello determinar si se modifica la actividad enzimática al variar el pH del ensayo, así como la afinidad y la capacidad catalítica de la enzima.

Referencias

1. Renganathan Jayakumar , Shanmugam Jayashree, Balumuri Annapurna, Sundaram Seshadri (2012) Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-012-9902-6.
2. Jyothi Bezawada, S. Yan, Rojan P. John, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli (2011) Biotechnology Research International doi:10.4061/2011/238549.
3. Segel IH (1975) Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York.p.957

NORADRENALINA GENERA UN MICROAMBIENTE INDUCTOR DE METÁSTASIS VÍA LA CINASA SRC

Rodríguez-Gama, Alejandro¹ y Ortega-Granillo, Augusto²

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las hormonas son componentes importantes del sistema nervioso simpático, sirven para comunicar señales a los distintos tejidos de un organismo. La noradrenalina (NA) es una hormona liberada en situaciones de estrés y pertenece a la familia de las catecolaminas. Los receptores β -adrenérgicos (ADRB), se encargan de transducir el estímulo de NA mediante proteínas G. La unión del ligando a su receptor aumenta la concentración de AMP cíclico (cAMP); esto activa a la cinasa de proteínas A (PKA) que amplifica la señal.

De entre las proteínas efectoras de las vías de señalización se encuentra Src, esta proteína es regulada a distintos niveles en la célula. En su extremo N-terminal tiene una región que se une covalentemente a la membrana plasmática, lo que limita su localización. Además tiene dos sitios de fosforilación que deben ser modificados para alcanzar la conformación activa. Src tiene un papel importante en proliferación, adhesión y motilidad celular; hace más de 100 años que el Dr. Peyton Raus describió la participación de una forma mutada de Src en el establecimiento del sarcoma de pollo. Actualmente se sabe que esto se debe a la pérdida de regulación en la expresión y actividad enzimática de Src, por ello se le considera un protooncogen.

La oncogénesis ocurre con mayor frecuencia en tejidos con alta tasa de recambio, esto favorece la acumulación de mutaciones. Además, las células cancerosas pueden presentar dos características potencialmente peligrosas: la proliferación desmedida, así como la capacidad metastásica. En condiciones fisiológicas y patológicas el tejido de ovario está constantemente expuesto a una concentración de NA mayor a la del torrente sanguíneo. En investigaciones previas se ha descrito una relación entre estímulos del sistema nervioso simpático como noradrenalina y un incremento en la patogénesis, migración celular y angiogénesis en tejido tumoral (1). A principios de 2013, Armaiz-

Pena et al., describieron un nuevo mecanismo de activación de Src dependiente de PKA en células de cáncer de ovario estimuladas con NA; además, evaluaron la repercusión en la transición al fenotipo metastásico (2).

La señalización mediada por NA, produce cambios en la expresión y el estado de fosforilación del proteoma. Después de analizar las cinasas responsables de estos cambios, se identificó a Src como un principal modulador de la respuesta (2). Pese a que Src puede ser activado por distintas familias de receptores, este trabajo demostró que la activación de Src en respuesta a NA ocurre solamente vía ADRB2.

Src tiene múltiples residuos fosforilables, pero la fosforilación de una tirosina es responsable de inducir un fenotipo metastásico. Sin embargo, este fenotipo se pierde al silenciar PKA (cinasa de serina y treonina). Después de analizar la discrepancia entre la actividad de PKA y la fosforilación en tirosina de Src, se propuso un mecanismo de autotransfosforilación.

Por otro lado, con la finalidad de promover una investigación formal en el uso de inhibidores β -adrenérgicos contra la promoción del cáncer, se realizó un análisis estadístico de una base de datos de la FDA (Food and Drug Administration). El análisis mostró que pacientes con cáncer de ovario bajo tratamiento con inhibidores de ADRBs tienen mayor esperanza de vida.

Mediante los acercamientos *in vivo*, *in silico* e *in vitro*, el trabajo de Armaiz-Pena valida futuras investigaciones sobre el uso de inhibidores de ADRBs como tratamiento contra la progresión del cáncer. La descripción de la activación de Src bajo un estímulo de NA, plantea una nueva perspectiva sobre la participación de estímulos neuroendócrinos en el desarrollo de fenotipos malignos (Fig.1). También abre la posibilidad de considerar a Src como un blanco terapéutico para disminuir la progresión de la metástasis. 

Referencias

1. Thaker PH, Han LY, a Kamat A, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, a Bankson J, Ravoory M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, a Newman R, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez-Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* 12: 939–944.
2. Armaiz-Pena GN, Allen JK, Cruz A, Stone RL, Nick AM, Lin YG, Han LY, Mangala LS, Villares GJ, Vivas-Mejia P, Rodriguez-Aguayo C, Nagaraja AS, Gharpure KM, Wu Z, English RD, Soman KV, Shazhad MMK, Zigler M, Deavers MT, Zien A, Soldatos TG, Jackson DB, Wiktorowicz JE, Torres-Lugo M, Young T, De Geest K, Gallick GE, Bar-Eli M, Lopez-Berestein G, Cole SW, Lopez GE, Lutgendorf SK, Sood AK (2013) Src activation by β -adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nat Commun* 4: 1403–1414.

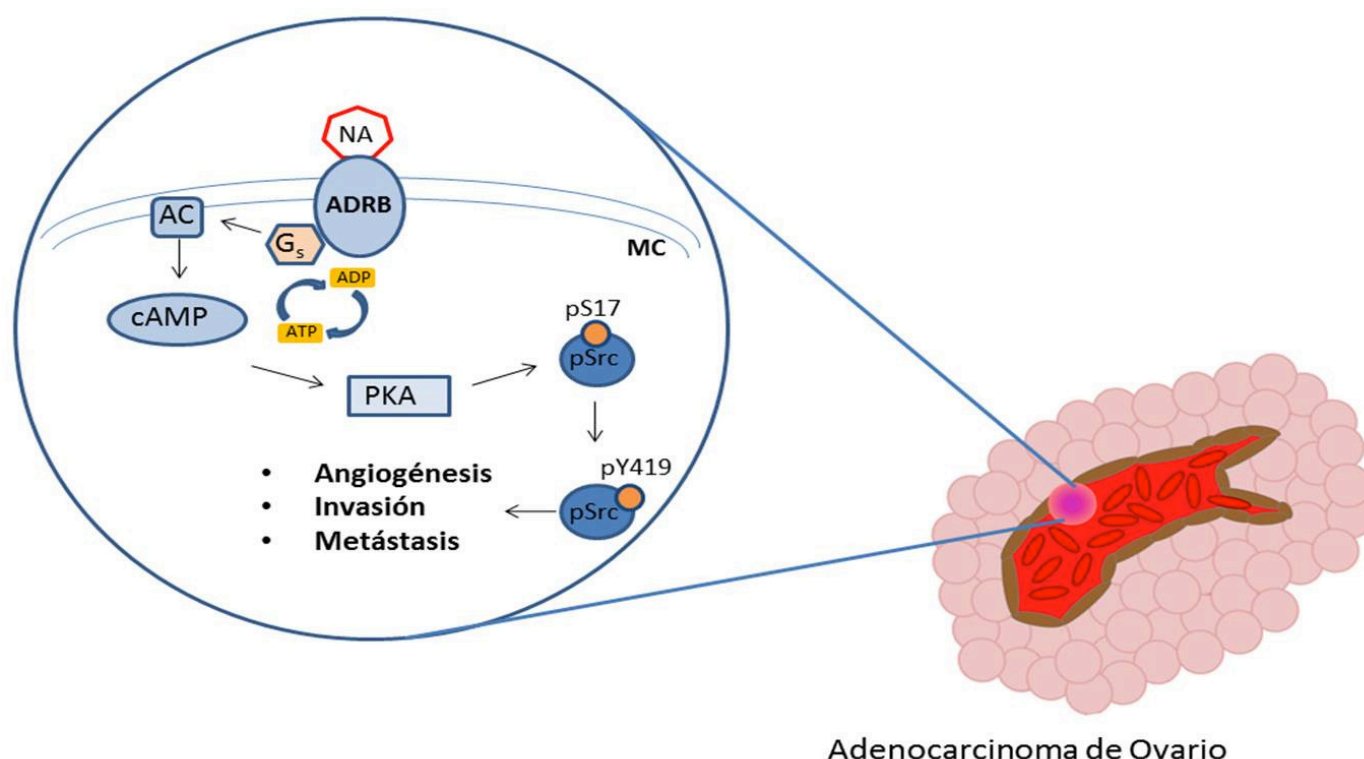
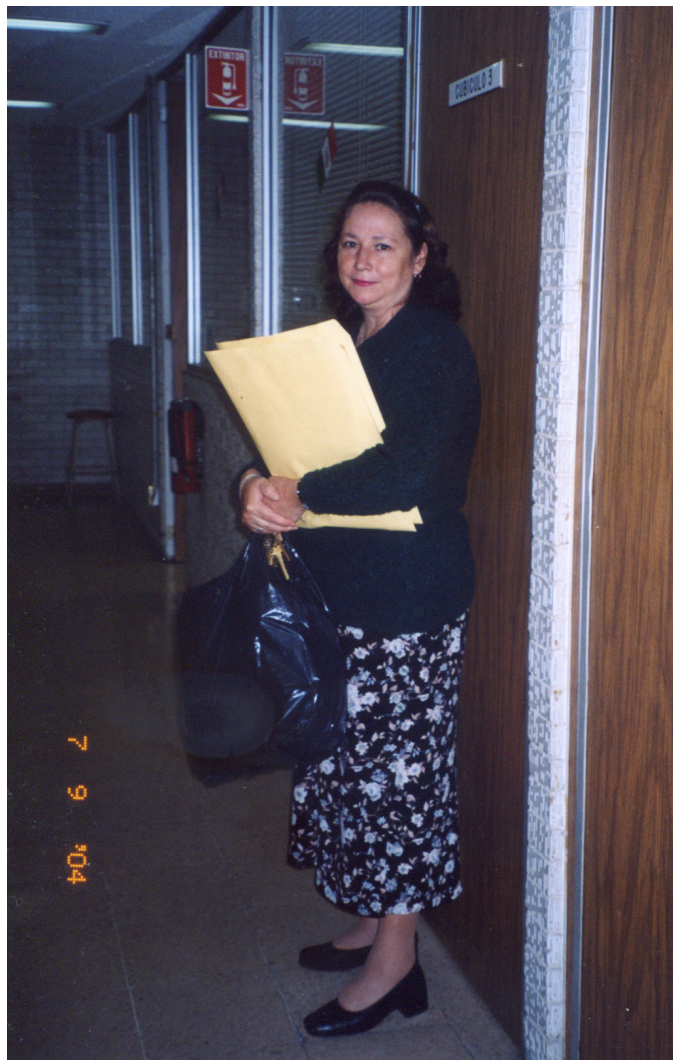


Figura 1. Mecanismo de inducción de metástasis por noradrenalina. La NA es reconocida por receptores β -adrenérgicos (β -ADR). La proteína Gs es activada por el receptor, lo cual promueve la activación de la adenilato ciclasa (AC). Esta enzima aumenta la concentración de cAMP, que activa a PKA, que a su vez fosforila un residuo de Src (S17). Esto desencadena la autotransfosforilación de otro residuo de Src (Y142). El estado de fosforilación consecuente es responsable de los efectos en la transición al fenotipo metastásico. MC. Membrana celular.

GRACIAS MARIVEL, NUESTRA ASISTENTE EDITORIAL



–Doctor Víctor, ¿vendrá a la junta de la Revista? Me enteré por Angy que estaba de viaje y pensé que no podría llegar, ya que son las 11 de la mañana- me dijo Marivel, con voz forzosamente baja, muy tímida, tratando de endulzar cada sílaba y como no queriendo sonar impositiva o inquisitiva. –Si llego Marivel, de hecho estoy saliendo en unos minutos para el aeropuerto ¡ahí nos vemos!- le dije apresuradamente. Marivel insistió conociendo la ciudad y haciendo gala de sus instintos maternos, como frecuentemente lo hacía –Estará muy carrereado doctor Víctor, pero está bien, cuídese mucho.

–Marivel ¿Cómo va lo de su enfermedad?- pregunte antes de terminar la llamada –Nada bien,

pero estoy tranquila, resignada y confiada en el tratamiento, dispuesta a luchar por mí y por mis hijos- Fue contundente y elocuente, aunque con un grado muy grande de tristeza, se notaba su entereza, pero al mismo tiempo la preocupación por sus hijos. –Duro Marivel, saldrá adelante- traté de sonar convincente, que no se notará mi pesimismo.

Seguramente sintió que se aproximaba el fin de la conversación, conociéndome, como me conocía, de cortar las llamadas muy rápido, usando frases muy cortas y contundentes. Apresuradamente me dijo –Por cierto doctor Víctor, -bajé los hombros sabiendo que me embestiría con su clásica forma de presión, respiré profundo y balbucee –Dígame Marivel- sabiendo con certeza la petición que haría, –Le recuerdo la Editorial, perdón que le insista pero ya casi está armado el número. Terminó la frase casi en suplica y como si manejara con delicadeza una pieza de cristal muy valiosa. –Está bien Marivel, ya casi la tengo- le mentí, ni siquiera había decidido el tema, seguramente ella predcía también mi frecuente respuesta, se apresuró a decir: –Perdón que le insista se que está usted muy ocupado, –No se preocupe Marivel, ya sé que la presiona a usted la Dra. Saldaña- sonreí, –No doctor, no es así- me dijo tratando de sonar como si no estuviera mintiendo, –No se preocupe ya sé que es su amiga y que la protege, pero está bien, así son las amigas siempre cómplices- me divertí, casi podía ver su cara sonrojada y llena de pena, terminé diciendo –Es broma Marivel, me aplicaré para tenerla a tiempo, –Cuídese mucho, un beso y nos vemos al rato. Esta conversación la tuvimos el pasado 10 de septiembre.

El vuelo se retrasó y como Marivel predijo, no pude llegar a la junta del Comité Editorial; Angélica apenas le pudo avisar una hora antes, seguramente pensó –Se lo dije doctor Víctor, sabía que no podría llegar-. No la volví a ver, ni a hablar con ella, no pude darle el beso y el abrazo que sería de despedida, vi su contestación de un correo a un autor, el viernes anterior a su fallecimiento, trabajó como Asistente Editorial de la Revista de Educación Bioquímica hasta momentos antes de su muerte, aun con una enfermedad crónico-degenerativa maligna y sabiendo el diagnóstico y pronóstico que enfrentaba.

Recuerdo cuando entrevisté a Marivel como candidata para obtener el puesto de Asistente Editorial de la Revista, ya el Dr. Marco Antonio Juárez había dado su visto bueno. Me comentó su trabajo en las empresas privadas, bajo sueldo, mucho trabajo, poco satisfactorio, muy rutinario. Tenía pocas herramientas de trabajo en computación, no muy buen manejo de internet, pero mucho empeño y un trato muy cálido, algo necesario para la interacción con autores, revisores, editores y lectores. Me aseguró que el Dr. Juárez le ayudaría con los programas y el internet, lo cual hizo puntualmente siempre. Su rostro se iluminó y no dejó de agradecerme la decisión, me aseguró que trabajaría para sacar adelante a sus hijos Paulina y Carlos. Se despidió afectuosamente, llena de agradecimiento, deseándome un buen viaje a una escalada en Argentina, misma que conmemoro con una taza de escalador en roca con mi nombre, que aún conservo y atesoro. La tarde era fría y pronto cayó la noche, cuando mandé el correo electrónico de aceptación a Marco, me sentí satisfecho.

Marivel trabajó desde marzo de 2001 para la REB, algunas veces con dificultades por compartir su tiempo con otras actividades dentro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Su opinión y expresión siempre positiva y conciliadora contrastaban con las no poco frecuentes intensas discusiones al seno del Comité Editorial. Su tranquilidad y su disposición de dar más tiempo a un revisor que aún no contestaba o a un autor que le llamó y prometió enviar la respuesta, lograba cierta estabilidad entre las prisas editoriales y el trato humano, casi maternal.

Los autores, revisores, lectores y editores siempre nos dirigíamos a ella con cariño, era difícil enojarse con ella. Recuerdo que una investigadora me reclamó airadamente sobre la falta de información sobre un trabajo publicado, cuando encontré que el error era de Marivel y le indiqué

que le llamaría la atención al respecto, me dijo – No exageres, todos cometemos errores. Sin duda estaba dispuesta a marcarme un error a mí, pero que a Marivel no se le tocara, estoy seguro que no la conocí, sino sólo por teléfono y por correo. Así era nuestra Marivel.

Siempre se esforzaba por confortarnos y que la reuniones del Comité Editorial fueran acogedoras, atenta a los detalles de minutas y expedientes y pendiente de tener siempre listo un café o un té. La última junta que la vi, le ofrecí nuevamente las posibilidades de ayuda y apoyo, me lo agradeció y me explicó que el Dr. Edgar Zenteno y ahora del Dr. Juan Pablo Pardo desde la Jefatura del Departamento de Bioquímica le estaban apoyando en todo lo posible. Me indicó su firme convicción de seguir trabajando para la Revista incluso desde su casa como lo hizo durante la recuperación de su biopsia diagnóstica. Me aclaró plenamente su fe en estar mejor y la decisión de hacer el tratamiento necesario para poder salir adelante por ella y por sus hijos, su razón de vida. Finalmente me indicó que estaba resignada y tranquila, en su mirada y expresión se podía saber que así era, sus ojos tristes y su expresión melancólica cambió cuando le dije que iría a escalar, la abracé y le di un beso, ella fue quien me dijo –Cuídese mucho y diviértase-, preocupada por los demás y olvidando momentáneamente su enfermedad y el duro camino que le esperaba.

Su muerte nos tomó a todos por sorpresa, incluyéndola, el Comité Editorial se sumó a dar las condolencias a sus hijos, extrañaremos sus atenciones, agradecemos su trabajo.

Adiós Marivel, cuídese mucho.

José Víctor Calderón Salinas
Editor en Jefe

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

- 1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando departamento, institución, ciudad, estado y país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.
- 2) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.
- 3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.
- 4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.
- 5) Referencias. Se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener para los artículos: apellidos e iniciales de todos los autores, año

de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo: Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Gen* 113:25-34. Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma: Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, Ann Arbor, Michigan, USA, pp 81-104. Los libros podrán incluir las páginas totales o las consultadas y se citarán de acuerdo con este ejemplo: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 6) Figuras y Tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

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 con la abreviatura, la primera letra mayúscula y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la Revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión.

Los manuscritos serán evaluados por lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.