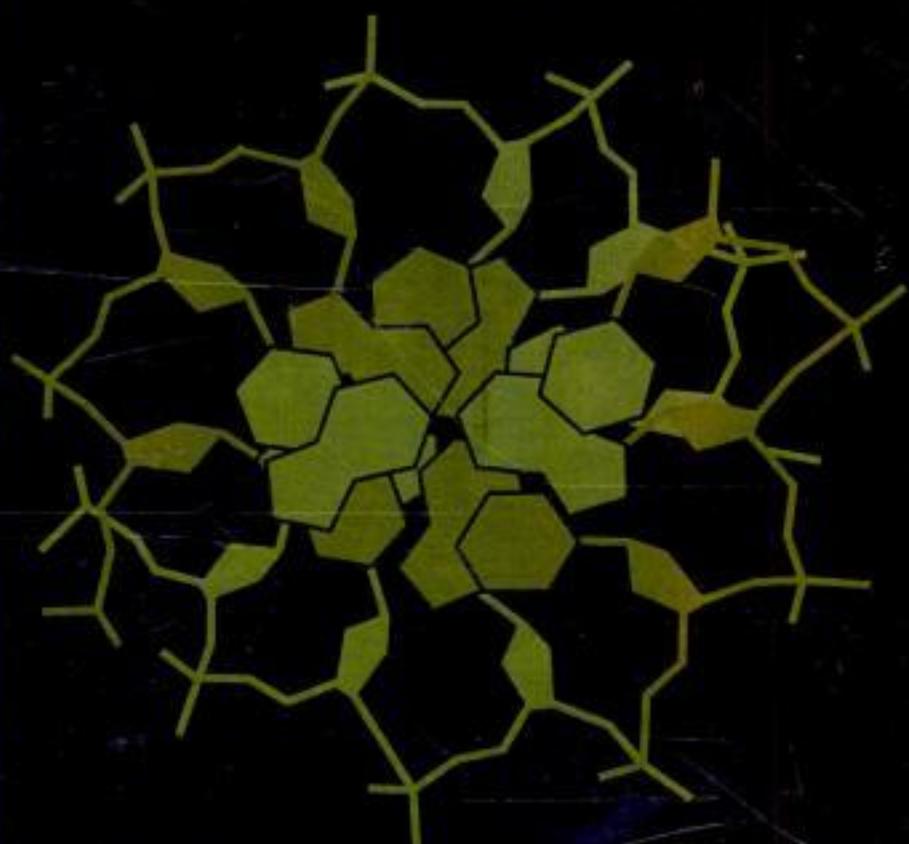


Biología

Bioguímica

EDICIÓN



Copyrighted material

Bioquímica

SEXTA EDICIÓN



Jeremy M. Berg

John L. Tymoczko

Lubert Stryer



EDITORIAL
REVERTÉ

Barcelona · Bogotá · Buenos Aires · Caracas · México

Copyrighted material

Título de la obra original:
Biochemistry, Sixth Edition

Edición original en lengua inglesa publicada por:
W. H. FREEMAN AND COMPANY, New York and Basingstoke

Copyright © 2007 by W. H. Freeman and Company
All Rights Reserved

Versión española por:

Prof. Dr. José M. Macarulla

Catedrático de Bioquímica y de Biología Molecular
Gran Cruz de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio

Con la colaboración de los Catedráticos y Profesores
de Bioquímica enumerados en el Prólogo

Maquetación:

REVERTÉ-AGUILAR, SL

Propiedad de:

EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Loreto, 13-15, Local B

08029 Barcelona - España

Tel: (34) 93 419 33 36

Fax: (34) 93 419 51 89

reverte@reverte.com

www.reverte.com

Reservados todos los derechos. La reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, queda rigurosamente prohibida, salvo excepción prevista en la ley. Asimismo queda prohibida la distribución de ejemplares mediante alquiler o préstamo públicos. La comunicación pública y la transformación de cualquier parte de esta publicación (incluido el diseño de la cubierta) sin la previa autorización de los titulares de la propiedad intelectual y de la Editorial. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y siguientes del Código Penal). El Centro Español de Derechos Reprográficos (CEDRO) vela por el respeto a los citados derechos.

Edición en español:

© Editorial Reverté, S. A., 2008

ISBN: 978-84-291-7600-1

Impreso en España - Printed in Spain

Depósito Legal: B-39253-2007

Impresión: Alvagraf, S. L.
La Llagosa (Barcelona)

Registro bibliográfico (ISBD)

BERG, JEREMY M.

[Biochemistry. Español]

Bioquímica / Jeremy M. Berg y John L. Tymoczko, Lubert Stryer; versión española por: Prof. Dr. José M. Macarulla. — Barcelona : Reverté, 2008

XXXVIII, 1.026 p. : il. col. ; 28 cm

Glosario, Índice,

DL B. 39253-2007. — ISBN 978-84-291-7600-1

1. Bioquímica. I. Stryer, Lubert. II. Tymoczko, John L. III. Macarulla, José M., trad. IV. Título.

577.1

A nuestros profesores y a nuestros estudiantes

This one



D3FT-UTB-CG8A

Sobre los autores

JEREMY M. BERG se licenció y graduó en Química en Stanford (donde investigó con Keith Hodgson y Lubert Stryer) y se doctoró en Química en Harvard con Richard Holm. Posteriormente disfrutó de una beca postdoctoral para trabajar en Biofísica con Carl Pabo en la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins. Desde 1986 hasta 1990 fue Profesor Titular del Departamento de Química de la Johns Hopkins. Posteriormente se trasladó a la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins en calidad de catedrático y director del Departamento de Biofísica y Biofísica Química, donde permaneció hasta 2003. En 2003 fue nombrado Director del Instituto Nacional de Ciencias Médicas en el Instituto Nacional de la Salud. Ha recibido el Premio de Química Pura otorgado por la *American Chemical Society* (1994), el Premio Eli Lilly de Investigación Básica en Química Biológica (1995), el premio al joven científico más sobresaliente del año en Maryland (1995) y el Premio Harrison Howe (1997). Estando en la Johns Hopkins recibió el Premio de Docencia W. Barry Wood (cuyo ganador es escogido por los estudiantes de Medicina), el Premio de Docencia a estudiantes de Postgrado y el Premio de Catedrático Docente en Ciencias Preclínicas. Es coautor, junto con Stephen Lippard, del libro de texto *Principles of Bioinorganic Chemistry*.

JOHN L. TYMOCZKO posee la Cátedra Towsley de Biología en el Carleton College, donde ha impartido docencia desde 1976. Actualmente enseña Bioquímica, Laboratorio de Bioquímica, Oncogenes y Biología Molecular del Cáncer y Ejercicios de Bioquímica, y comparte la docencia de un curso introductorio: Flujos Energía en Sistemas Biológicos. El Profesor Tymoczko se licenció en la Universidad de Chicago en 1970 y se doctoró en Bioquímica en la Universidad de Chicago con Shutsung Liao en el Instituto Ben May de Investigación sobre el Cáncer. Posteriormente, obtuvo un puesto postdoctoral con Hewson Swift, del Departamento de Biología de la Universidad de Chicago. Su investigación se ha centrado en receptores esteroideos, partículas de ribonucleoproteína y enzimas proteolíticos.

LUBERT STRYER posee la Cátedra Winzer de Biología Celular (en calidad de catedrático emérito) en la Escuela de Medicina y es Catedrático Emérito de Neurobiología en la Universidad de Standford, en cuya Facultad ha permanecido desde 1976. Obtuvo su graduado en la Escuela Médica de Harvard. El Profesor Stryer ha recibido multitud de galardones por su investigación sobre la interacción entre la luz y los seres vivos, entre los que se incluyen el Premio Eli Lilly de Investigación Básica en Química Biológica y el Premio a los Inventores más Distinguidos de la Asociación de Poseedores de la Propiedad Intelectual. Fue elegido miembro de la Academia Nacional de Ciencias en 1984. Actualmente preside el Consejo Asesor Científico de dos empresas biotecnológicas (Affymax, Inc. y Senomyx, Inc.) y es miembro del Consejo de Administración de los fondos McKnight dotados para las neurociencias. La publicación de la primera edición de *Biochemistry* en 1975 transformó la enseñanza de la Bioquímica.

PREFACIO

Cuanto más estudiamos, más relaciones descubrimos entre los elementos de nuestro mundo bioquímico. A la hora de escribir la sexta edición, nos hemos esforzado al máximo para presentar estas relaciones de una forma que ayude a aquellos que estudian Bioquímica por primera vez a comprender la asignatura y a hacerse una idea de cuán importante es para sus vidas.

Énfasis sobre la importancia fisiológica

La Bioquímica está volviendo a sus raíces para renovar el estudio de su papel en la fisiología, de la mano de las herramientas de la biología molecular y de la información obtenida a partir de la secuenciación de los genes. En la sexta edición hacemos hincapié en que la comprensión de las vías bioquímicas es la base para la comprensión de los sistemas fisiológicos. Las vías bioquímicas cobran más sentido para los estudiantes cuando éstos comprenden cómo se relacionan estas vías con la fisiología de actividades tan familiares como la digestión, la respiración y el ejercicio físico. En esta edición, particularmente en los capítulos sobre el metabolismo, hemos adoptado diversas medidas para asegurar que los estudiantes adquieran una perspectiva del panorama completo:

- Las discusiones sobre la regulación del metabolismo resaltan las **condiciones cotidianas** que determinan la regulación: ejercicio o reposo, alimentación o ayuno.
- Las nuevas **figuras que integran las vías** muestran de qué forma colaboran diversas rutas en unas condiciones determinadas, como puede ser durante el ayuno.
- A lo largo del libro se han añadido más **ejemplos importantes desde el punto de vista fisiológico**.

Esta perspectiva fisiológica también resulta evidente en el nuevo capítulo dedicado al desarrollo de fármacos. A veces, el uso de un compuesto foráneo para inhibir un enzima específico presenta consecuencias fisiológicas sorprendentes que desvelan nuevos principios fisiológicos.

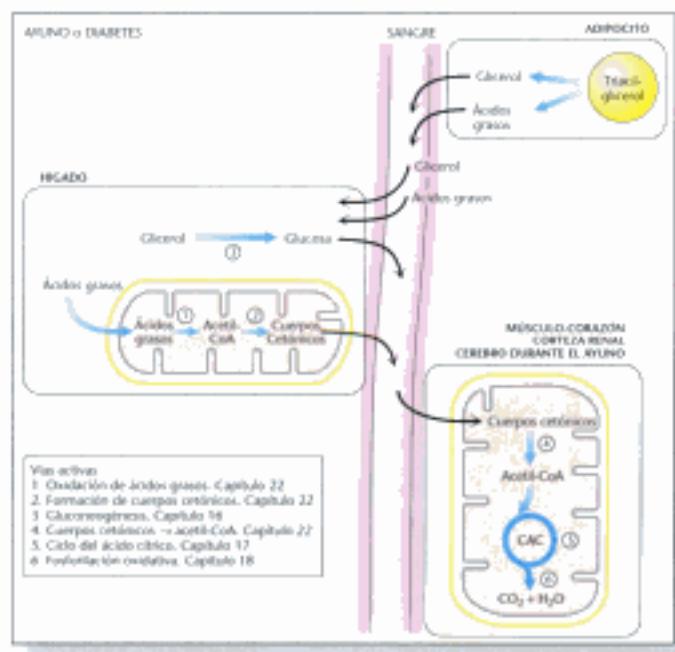


Figura 22.21 Integración de la vía: el hígado suministra cuerpos cetónicos a los tejidos periféricos. En el ayuno o en la diabetes no tratada, el hígado transforma los ácidos grasos en cuerpos cetónicos que se usan como combustible por diversos tejidos. La producción de cuerpos cetónicos tiene especial relevancia en la inanición, cuando pasan a ser el combustible prioritario.

Una perspectiva molecular de la evolución

En gran medida, las perspectivas evolutivas hacen posible e incrementan el estudio de la Bioquímica. Tal y como señaló Theodosius Dobzhansky, "en biología, nada tiene sentido si no es a la luz de la evolución". Durante el transcurso de la evolución, las mutaciones han alterado numerosas proteínas y motivos bioquímicos de forma que llevan a cabo funciones distintas al tiempo que mantienen sus elementos bioquímicos básicos. Mediante el estudio de proteínas emparentadas resaltamos tanto las características químicas esenciales como las especializaciones necesarias para determinadas funciones. A partir del análisis de las secuencias de genes y proteínas se esclarecen los senderos que ha seguido la evolución.

A medida que el análisis de secuencias va cobrando importancia, el panorama de la Bioquímica está cambiando y de ser una ciencia que se desarrolla casi por completo en el laboratorio se está convirtiendo en una disciplina que también puede estudiarse mediante ordenadores, utilizando la información recopilada a partir de la genómica y la proteómica. Este cambio se pone de manifiesto en la edición actual y puede ser claramente observado en el Capítulo 6: "El estudio de la evolución y la bioinformática", que desarrolla las bases conceptuales para la comparación de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos. Con frecuencia a lo largo del libro, la comparación de proteínas es una fuente de información, especialmente a la hora de destacar las relaciones entre la estructura y la función.

Nuevos capítulos. Hemoglobina y desarrollo de fármacos

Dos nuevos capítulos ilustran la relación entre la estructura y la función utilizando un ejemplo clásico y otro contemporáneo.

Capítulo 7: Hemoglobina: Retrato de una proteína en acción. Este ejemplo clásico, utilizado para transmitir la relación entre estructura y función vuelve con un tratamiento ampliado. La nueva información incluye:

- El transporte de oxígeno durante el reposo y durante el ejercicio
- La fisiología del transporte de oxígeno y de CO₂
- La base molecular de la anemia falciforme y de la talasemia
- Equilibrio en la producción de las cadenas α y β
- Globinas descubiertas recientemente

Capítulo 35: Desarrollo de fármacos. El conocimiento de las vías bioquímicas es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos como el Lipitor, la Viagra y el Vioxx. En este nuevo capítulo, mediante numerosos casos prácticos se ilustra:

- Cómo se relacionan los fármacos con otros temas del libro (cinética, inhibidores enzimáticos, receptores de membrana, regulación del metabolismo, síntesis de lípidos y transducción de señales)
- Cómo responden las defensas del organismo ante compuestos foráneos, especialmente las defensas suministradas por las vías bioquímicas del metabolismo de xenobióticos
- La importancia de la administración, distribución, metabolismo, excreción (ADME) y toxicología en el desarrollo de fármacos
- Cómo funciona el proceso de desarrollo de fármacos, desde la identificación de la diana hasta los ensayos clínicos
- Cómo se utilizan los conceptos y herramientas de la genómica en el desarrollo de fármacos

Nuevas aplicaciones clínicas

 Hemos añadido una serie de ejemplos nuevos procedentes de las ciencias médicas a la ya abundante selección de tales ejemplos, identificados mediante el ícono mostrado más arriba. (El listado completo puede verse en la p. x). Los temas nuevos incluyen:

- Enfermedades debidas al plegamiento defectuoso de las proteínas (Capítulo 2)
- Terapia génica en humanos (Capítulo 5)
- Agrecaños y osteoartritis (Capítulo 11)
- El empleo de la eritropoyetina (EPO) para el tratamiento de la anemia y el abuso por parte de los atletas (Capítulo 11)
- El empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores del factor de crecimiento epidérmico para el tratamiento de los cánceres de colon y de mama (Capítulo 14)
- El papel del ejercicio en la generación de defensas contra los radicales superóxido (Capítulo 18)
- Enfermedades debidas a defectos en la ubiquitinación (enfermedad de Parkinson, síndrome de Angelman) (Capítulo 23)
- El empleo del inhibidor del proteosoma bortezomib para el tratamiento del mieloma múltiple (Capítulo 23)
- Adenosina desaminasa y la inmunodeficiencia combinada grave (Capítulo 25)
- Discusión más extensa sobre la gota (Capítulo 25)
- Ácido fólico y espina bífida (Capítulo 25)
- Diabetes de tipo II (Capítulo 27)
- Genes supresores de tumores y p53 (Capítulo 28)
- Quimioterapia dirigida contra las vías de reparación del DNA (Capítulo 28)

- Enfermedades debidas a una maduración del RNA defectuosa, como las talasemias y la retinitis pigmentosa (Capítulo 29)
- Inmunidad congénita (Capítulo 33)

Avances recientes

La sexta edición se ha actualizado a fondo en toda su extensión, incluyendo nuevas discusiones sobre los siguientes avances recientes:

- El **modelo de nucleación-condensación** para el plegamiento de las proteínas (Capítulo 2)
- El empleo de **espectrometría de masas MALDI-TOF** para identificar los componentes de complejos proteicos de gran tamaño (Capítulo 3)
- Actualización del **proyecto genoma humano** (Capítulo 5)
- **Genómica comparativa** (Capítulo 5)
- Alteración de genes mediante **RNA de interferencia** (Capítulo 5)
- Empleo de búsquedas **BLAST** (Capítulo 6)
- **Balsas lipídicas** (Capítulo 12)
- Mecanismos de acción de diversos tipos de conductos de membrana y sistemas de bombeo, como el **receptor de la acetilcolina** (Capítulo 13)

- **Acuaporina** (Capítulo 13)
- La **vía del receptor de la insulina** (Capítulo 14)
- La estructura y función del **receptor EGF** (Capítulo 14)
- La estructura de la **translocasa ATP-ADP** (Capítulo 18)
- Papel de la **glucógeno sintasa quinasa** en la regulación del glucógeno (Capítulo 21)
- Papel de la **perlipina A** en la movilización de ácidos grasos (Capítulo 22)
- La estructura recientemente revisada de la **ácido graso sintasa** (Capítulo 22)
- **Iniciación de la replicación** en procariotas y en eucariotas (Capítulo 28)
- Componentes de la DNA polimerasa (Capítulo 28)
- El **modelo del trombón** para la elongación del DNA (Capítulo 28)
- **Estructura de los promotores eucarióticos** (Capítulo 29)
- **Iniciación de la transcripción** en eucariotas (Capítulo 29)
- El **dominio carboxilo terminal (CTD)** de la RNA polimerasa (Capítulo 29)
- El papel de las **proteínas SNARE** en el envío de las proteínas a su punto de destino (Capítulo 30)
- La estructura de los **receptores del gusto que detectan los sabores dulces** (Capítulo 32)

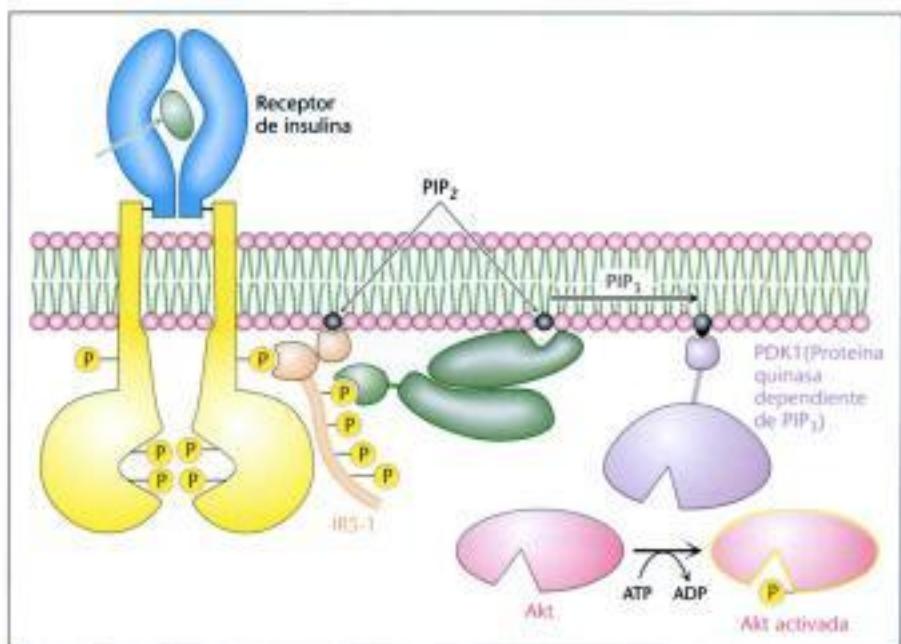


Figura 14.20 Señalización por Insulina. La unión de insulina produce la fosforilación cruzada y la activación del receptor de insulina. Los lugares de fosforilación en el receptor actúan como sitios de unión para sustratos del receptor de la insulina tales como IRS-1. La quinasa del lípido, fosfoinositido 3-quinasa se une a un lugar fosforilado en el IRS-1 a través de su dominio de regulación, que convierte el PIP₂ en PIP₃. La unión al PIP₃ activa la proteína quinasa dependiente de PIP₃, la cual fosforila y activa quinasas tales como Akt1. La Akt1 activada puede difundir a través de la célula para continuar con la vía de transducción de señales.

Visualización de la estructura molecular

Al igual que en la quinta edición, Jeremy Berg, uno de los autores, ha seleccionado y elaborado todas las estructuras moleculares. La sexta edición incluye nuevas herramientas para ayudar a los estudiantes a leer y comprender las estructuras moleculares:

- Un primer modelo molecular explica los distintos tipos de modelos proteicos y analiza sus puntos fuertes y débiles (apéndices de los capítulos 1 y 2).
- Los pies de figura indican a los estudiantes, de forma explícita, las características fundamentales de un modelo.
- Se representa una mayor variedad de tipos de estructuras moleculares, incluyendo representaciones más claras de las proteínas de membrana.
- En la mayoría de los modelos moleculares se indica al final del pie de figura el nombre del fichero en el *Protein Data Bank*. Este nombre de fichero (también conocido como PDB ID) permite al lector un fácil acceso al fichero utilizado para generar la estructura a partir del sitio web del *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>). En este sitio web se ofrece toda una gama de herramientas para visualizar y analizar la estructura.

- Ahora, en el sitio web aparecen figuras animadas que corresponden a la mayoría de las estructuras moleculares en formato Jmol, que permite a los estudiantes mover las moléculas en las tres dimensiones y visualizar representaciones alternativas mientras se está conectado a Internet.

Problemas del final del capítulo

Además de los problemas generales, los problemas del final del capítulo incluyen tres categorías para fomentar el desarrollo de habilidades específicas.

- Los **problemas de mecanismos** requieren que el estudiante sugiera o elabore un mecanismo químico.
- Los **problemas de interpretación de datos** hacen preguntas sobre un conjunto de resultados presentados en forma de tabla o de gráfico. Estos problemas dan a los estudiantes una idea sobre cómo se consiguen conclusiones científicas.
- Los **problemas de integración de capítulos** requieren que los estudiantes utilicen información procedente de varios capítulos para lograr una solución. Estos problemas refuerzan en el estudiante la noción de que los diversos aspectos de la bioquímica se encuentran interrelacionados.

Al final del libro se presentan las soluciones resumidas de estos problemas; las soluciones más detalladas se encuentran disponibles en otro libro: el *Student Companion*.

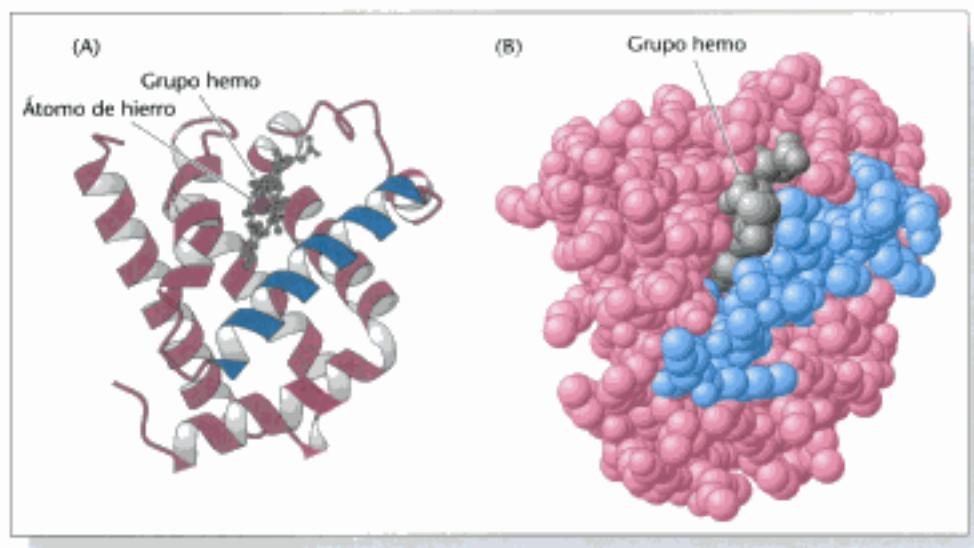


Figura 2.48 Estructura tridimensional de la mioglobina. (A) El diagrama de cintas muestra que la proteína está formada principalmente por α -hélices. (B) El modelo espacial compacto, en la misma orientación, muestra como la proteína está fuertemente compactada. Nótese que el grupo hemo está cobijado en una hendidura dentro de la proteína compacta con un único extremo expuesto al exterior. Una de las hélices es azul para permitir la comparación de las dos representaciones de la estructura. [Tomado de 1AGN.pdb.]

Evolución molecular



Este ícono indica el comienzo de muchas discusiones que resaltan los aspectos comunes de las proteínas u otros aspectos evolutivos a nivel molecular que proporcionan una plataforma que ayuda a los estudiantes a organizar la información.

- ¿Por qué este conjunto de 20 aminoácidos? (p. 33)
- ¿Es universal el código genético? (p. 126)
- Muchos exones codifican dominios proteicos (p. 128)
- Hemoglobinas fetales (p. 192)
- Globinas adicionales (p. 197)
- Trifadas catalíticas en enzimas hidrolíticas (p. 248)
- Principales tipos de proteínas que escinden péptidos (p. 251)
- Centros activos basados en el zinc en las anhidrasas carbónicas (p. 258)
- Un núcleo catalítico común en los enzimas de restricción de tipo II (p. 266)
- Dominios de las NTPasas con bucle P (p. 270)
- Un núcleo catalítico común en las proteína quinases (p. 288)
- ¿Por qué existen varios grupos sanguíneos en humanos? (p. 315)
- Membranas de las arqueas (p. 331)
- ATPasas de tipo P (p. 354 y p. 358)
- Dominios cassette de unión al ATP (p. 358)
- Empleo de la comparación de secuencias para comprender los conductos de Na^+ y Ca^{2+} (p. 366)
- Proteínas G pequeñas (p. 398)
- Evolución de las vías metabólicas (p. 429)
- ¿Por qué es la glucosa un combustible importante? (p. 435)
- Un centro de unión común en las deshidrogenasas (p. 448)
- La superfamilia de transportadores MF (facilitadores principales) (p. 457)
- Isoenzimas de la lactato deshidrogenasa (p. 469)
- Parentesco evolutivo entre la glicolisis y la gluconeogénesis (p. 469)
- Descarboxilación del α -cetoglutarato y del piruvato (p. 485)
- Evolución de la succinil-CoA sintetasa (p. 487)
- Historia evolutiva del ciclo del ácido cítrico (p. 495)
- Origen endosimbiótico de las mitocondrias (p. 504)
- Conservación de la estructura del citocromo c (p. 520)
- Características comunes de la ATP sintasa y las proteínas G (p. 527)
- Proteínas desacoplantes relacionadas (p. 533)
- Evolución de los cloroplastos (p. 543)
- Orígenes evolutivos de la fotosíntesis (p. 560)
- Evolución de la vía C₄ (p. 576)
- Aumento de la complejidad en la regulación de la glucógeno fosforilasa (p. 604)
- La familia de la α -amilasa (p. 606)
- Un motivo recurrente en la activación de grupos carboxilo (p. 623)
- Evolución del ciclo de la urea (p. 644)
- Análogos procarióticos de la vía de la ubiquitina y el proteosoma (p. 655)
- Una familia de enzimas dependientes del piridoxal (p. 660)
- El dominio NTPasa con bucle P en la nitrogenasa (p. 682)
- La aspartato aminotransferasa, prototipo de las enzimas dependientes de PLP (p. 687)
- Retroinhibición (p. 698)
- Etapas recurrentes en la síntesis del anillo de purina (p. 715)
- Ribonucleótido reductasas (p. 720)
- Aumento en los niveles de urato durante la evolución de los primates (p. 726)
- La superfamilia del citocromo P450 (p. 752)
- DNA polimerasas (p. 794)
- Helicasas (p. 798)
- Timina y la fidelidad del mensaje genético (p. 809)
- Parentesco evolutivo entre las recombinasas y las topoisomerasas (p. 814)
- Evolución de la maduración catalizada por el espliceosoma (p. 850)
- Clases de aminoacil-tRNA sintetasas (p. 865)
- Composición del ribosoma primordial (p. 869)
- Proteínas G homólogas (p. 877)
- Una familia de proteínas con dominios comunes para la unión del ligando (p. 899)
- Evolución independiente de los lugares de unión al DNA de las proteínas reguladoras (p. 900)
- Islas de CpG (p. 907)
- Elementos de respuesta al hierro (p. 916)
- La familia de receptores de sustancias aromáticas (p. 923)
- Evolución de los fotorreceptores (p. 936)
- El plegamiento de las inmunoglobulinas (p. 952)
- Parentesco entre la actina y la hexoquinasa y otras proteínas procarióticas (p. 986)
- Tubulinas en la familia de NTPasas con bucle P (p. 990)

Aplicaciones clínicas



En el texto, este ícono indica el comienzo de una aplicación clínica. Cuando se ha considerado oportuno, aparecen en el texto otras correlaciones clínicas más breves.

Enfermedades debidas al plegamiento defectuoso de las proteínas (p. 53)
Enfermedades debidas a errores en la modificación de proteínas (p. 57)
Detección de antígenos con ELISA (p. 87)
Insuficiencia de vasopresina (p. 90)
Terapia génica en humanos (p. 158)
Anemia falciforme (p. 195)
Talasemia (p. 196)
Acción de la penicilina (p. 232)
Inhibidores de la proteasa (p. 253)
Anhidrasa carbónica y osteopetrosis (p. 254)
Empleo de isozimas para el diagnóstico de lesiones tisulares (p. 283)
Enfisema (p. 292)
Prevención de trombosis (p. 295)
Hemofilia (p. 297)
Regulación de la coagulación de la sangre (p. 297)
Agregano y osteoartritis (p. 313)
Grupos sanguíneos (p. 315)
Uso y abuso de la eritropoyetina (EPO) (p. 316)
Enfermedad de las células I (p. 318)
Selectinas y la respuesta inflamatoria (p. 321)
Virus de la gripe (p. 321)
Uso clínico de liposomas (p. 335)
Aspirina e ibuprofeno (p. 339)
Digitalis y fallo cardíaco congestivo (p. 357)
Resistencia a múltiples fármacos (p. 358)
Vías de transducción de señales y cáncer (p. 400)
Anticuerpos monoclonales como fármacos anticancerígenos (p. 401)
Inhibidores de la proteína quinasa como fármacos anticancerígenos (p. 401)
Cólera y toxina (p. 401)
Carencias vitamínicas (p. 423)
Intolerancia a la lactosa (p. 451)
Toxicidad de la galactosa (p. 451)
Cáncer y glicólisis (p. 457)
Insuficiencia de fosfatasa y acidosis láctica (p. 492)
Beriberi y envenenamiento por mercurio y arsénico (p. 494)
Enfermedades mitocondriales (p. 534)
Anemia hemolítica (p. 586)
Insuficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (p. 587)
Trastornos del almacenamiento del glucógeno (p. 611)
Insuficiencia de carnitina (p. 624)
Síndrome de Zellweger (p. 630)
Cetoacidosis diabética (p. 633)
Uso de inhibidores de la ácido graso sintetasa como fármacos (p. 640)

Efectos de la aspirina en las vías de señalización (p. 644)
Enfermedades debidas a una ubiquitinación defectuosa (p. 653)
Degradación de proteínas y la respuesta inflamatoria (p. 664)
Trastornos heredados del ciclo de la urea (hiperamonemia) (p. 664)
Errores congénitos en la degradación de aminoácidos (p. 672)
Niveles elevados de homocisteína y enfermedad vascular (p. 693)
Trastornos hereditarios del metabolismo de las porfirinas (p. 704)
Fármacos anticancerígenos que bloquean la síntesis de timidilato (p. 722)
Adenosina desaminasa e inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (p. 725)
Gota (p. 726)
Síndrome de Lesch-Nyhan (p. 726)
Ácido fólico y espina bífida (p. 727)
Síndrome de insuficiencia respiratoria aguda y enfermedad de Tay-Sachs (p. 738)
Uso diagnóstico de los niveles de colesterol en sangre (p. 745)
Hipercolesterolémia y aterosclerosis (p. 747)
Tratamiento clínico de los niveles de colesterol (p. 748)
Raquitismo y vitamina D (p. 754)
Inanición prolongada (p. 772)
Diabetes (p. 773)
Regulación del peso corporal (p. 774)
Efectos metabólicos del etanol (p. 777)
Antibióticos dirigidos contra la DNA girasa (p. 792)
Enfermedad de Huntington (p. 805)
Reparación defectuosa del DNA y cáncer (p. 810)
Detección de carcinógenos (test de Ames) (p. 811)
Antibióticos que inhiben la transcripción (p. 831)
Linfoma de Burkitt y leucemia de las células B (p. 839)
Enfermedades debidas a la maduración defectuosa del RNA (p. 847)
Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (p. 884)
Difteria (p. 885)
La ricina, un inhibidor letal de la síntesis de proteínas (p. 885)
Esteroides anabólicos (p. 910)
SERMs y cáncer de mama (p. 910)
Ceguera a los colores (p. 936)
Empleo de la capsaicina para el tratamiento del dolor (p. 941)
Inmunidad congénita (p. 946)
Supresores del sistema inmunitario (p. 959)
MHC y rechazo a los trasplantes (p. 968)
Vacuna del SIDA (p. 969)
Enfermedades autoinmunitarias (p. 971)
Sistema inmunitario y cáncer (p. 971)
Miosinas y sordera (p. 984)
Quinesinas y trastornos del sistema nervioso (p. 989)
Taxol (p. 990)

Herramientas y técnicas

La sexta edición de *Bioquímica* ofrece tres capítulos que presentan las herramientas y técnicas de la bioquímica: "Investigación en proteínas y proteomas" (Capítulo 3), "La investigación de genes y genomas" (Capítulo 5) y "Investigación de la evolución y la bioinformática" (Capítulo 6). Cuando se considera oportuno, a lo largo del libro se presentan técnicas experimentales adicionales.

Investigación en proteínas y proteomas (Capítulo 3)

Purificación de proteínas (p. 67)
Centrifugación diferencial (p. 67)
Precipitación salina (p. 68)
Dialisis (p. 69)
Cromatografía de filtración en gel (p. 69)
Cromatografía de intercambio iónico (p. 69)
Cromatografía de afinidad (p. 70)
Cromatografía líquida de alta presión (p. 71)
Electroforesis en gel (p. 71)
Isoelectrofoque (p. 73)
Electroforesis bidimensional (p. 74)
Evaluación cualitativa y cuantitativa de la purificación de proteínas (p. 74)
Ultracentrifugación (p. 76)
Degradación de Edman (p. 78)
Secuenciación de proteínas (p. 78)
Producción de anticuerpos polyclonales (p. 84)
Producción de anticuerpos monoclonales (p. 85)
Ensayo de inmunoabsorción asociado a enzimas (ELISA) (p. 87)
Transferencia Western (p. 88)
Microscopía de fluorescencia (p. 89)
Marcaje con la proteína fluorescente verde (p. 89)
Microscopía inmunoelectrónica (p. 89)
Síntesis automática de péptidos en fase sólida (p. 90)
Espectrometría de masas (MALDI-TOF) (p. 93)
Análisis proteómico mediante espectrometría de masas (p. 94)
Cristalografía de rayos X (p. 96)
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (p. 98)
Espectroscopía NOESY (p. 99)

Técnicas de mutagénesis (p. 147)

Análisis de los niveles de expresión (chips génicos) (p. 151)

Creación de bibliotecas de cDNA (p. 152)

Introducción de genes en eucariotas (p. 154)

Animales transgénicos (p. 155)

Alteración de genes (p. 155)

Alteración de genes mediante el RNA de interferencia (p. 157)

Plásmidos que provocan tumores (p. 157)

La investigación de genes (otros capítulos)

Sedimentación en equilibrio de gradiente de densidad (p. 113)
Técnica de la impronta (*footprinting*) para aislar y caracterizar centros promotores (p. 824)

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (p. 906)

La investigación de la evolución y la bioinformática (Capítulo 6)

Métodos de comparación de secuencias (p. 166)

Métodos de alineamiento de secuencias (p. 166)

Estimación del significado estadístico de los alineamientos (mediante la técnica de barajado o *shuffling*) (p. 168)

Matrices de sustitución (p. 168)

Búsqueda en bases de datos mediante BLAST (p. 171)

Patrones de secuencias (p. 174)

Detección de motivos repetidos (p. 174)

Cartografiado de estructuras secundarias por comparación de secuencias de RNA (p. 176)

Construcción de árboles evolutivos (p. 177)

Química combinatoria (p. 178)

Otras técnicas

Secuenciación de carbohidratos por espectrometría de masas MALDI-TOF (p. 319)

Empleo de liposomas para investigar la permeabilidad de membranas (p. 334)

Empleo de diagramas de hidropatía para localizar hélices transmembrana (p. 340)

Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueado (FRAP) para medir difusión lateral en membranas (p. 342)

Técnica de *patch-clamp* para medir la actividad de los conductos (p. 363)

Medida del potencial redox (p. 506)

Obtención de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI) (p. 926)

 **Animaciones de técnicas:** En la dirección www.whfreeman.com/stryer se pueden encontrar explicaciones animadas de técnicas experimentales utilizadas en la investigación de genes y proteínas.

La investigación de proteínas (otros capítulos)

Fundamento de la fluorescencia de la proteína fluorescente verde (p. 58)
Cristalografía resuelta en el tiempo (p. 213)
Empleo de la espectroscopía de fluorescencia para analizar las interacciones enzima-sustrato (p. 213)
Utilización de inhibidores irreversibles para cartografiar el centro activo (p. 228)
Estudios enzimáticos con anticuerpos catalíticos (p. 232)

La investigación de genes y genomas (Capítulo 5)

Ánalisis mediante enzimas de restricción (pp. 135-137)
Técnicas de transferencia Southern y Northern (p. 137)
Método didexoxi de Sanger para la secuenciación del DNA (p. 138)
Síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida (p. 139)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. 140)
Tecnología del DNA recombinante (pp. 142-159)
Clonaje del DNA en bacterias (pp. 143-147)

Figuras animadas



Este ícono identifica las estructuras moleculares disponibles en formato Jmol y que se pueden rotar en el sitio Web que acompaña al libro: www.whfreeman.com/stryer.

- La estructura determina la función: Una proteína que rodea al DNA Figura 2.1
Cambio conformacional en la lactoferrina Figura 2.3
La ferritina, una proteína mayoritariamente α -helicoidal Figura 2.33
Una proteína que se une a ácidos grasos rica en hojas β Figura 2.40
Bucle sobre la superficie de un anticuerpo proteico Figura 2.42
Un superhélicoide de hélices α Figura 2.43
Héptadas repetidas en un superhélicoide de hélices α Figura 2.44
Estructura tridimensional de la mioglobina Figura 2.48
Distribución de aminoácidos en la mioglobina Figura 2.49
Distribución de aminoácidos invertida en la porina Figura 2.50
El motivo hélice-giro-hélice Figura 2.51
Dominios proteicos en la proteína de la superficie celular CD4 Figura 2.52
Estructura cuaternaria de la proteína Cro del bacteriófago λ Figura 2.53
El tetramero $\alpha_2\beta_2$ de la hemoglobina humana Figura 2.54
Conformaciones alternativas de una secuencia peptídica Figura 2.60
Reordenamiento químico en la proteína fluorescente verde (GFP) Figura 2.68
Motivos repetidos en la calmodulina Figura 3.25
Un anticuerpo: inmunoglobulina G Figura 3.27
Interacciones entre un antígeno (lisozima) y un anticuerpo Figura 3.28
Modelo de Watson-Crick para la doble hélice de DNA Figura 4.11
RNA polimerasa Figura 4.24
Una proteína sin homólogos naturales Figura 5.22
Ribonuclease de vaca y de humanos Figura 6.1
Angiogenina Figura 6.2
Hemoglobina humana (cadena α), mioglobina humana, y leghemoglobina del género *Lupinus* Figura 6.14
Actina y el fragmento grande de la proteína de choque térmico Hsp-70 Figura 6.15
Quimotripsina y subtilisina Figura 6.18
Mioglobina Figura 7.1
Cambios en la estructura cuaternaria de la hemoglobina provocados por la unión del oxígeno Figura 7.10
Modo de unión del 2,3-BPG a la desoxihemoglobina humana Figura 7.16
Hemoglobina S Figura 7.25
Estabilización de la α -hemoglobina libre Figura 7.27
Complejo formado por el enzima citocromo P450 y su sustrato alcano Figura 8.5
Lisozima con varios componentes del centro activo Figura 8.7
Quimotripsina Figura 9.6
Tripsina y quimotripsina Figura 9.12
Carboxipeptidasa II Figura 9.15
Tres tipos de proteasas y sus centros activos Figura 9.17
La proteasa de HIV y su cavidad de unión Figura 9.19
La proteasa de HIV, una aspartil-proteasa dímerica Figura 9.21
Anhidrasa carbónica II de humanos y su centro de unión del zinc Figura 9.22
 γ -anhidrasa carbónica Figura 9.31
EcoRV rodeando a una molécula de DNA que reconoce Figura 9.38
Interacciones de puente de hidrógeno entre la endonucleasa EcoRV y su DNA sustrato Figura 9.39
DNA reconocido y DNA inespecífico en el interior de la endonucleasa EcoRV Figura 9.41
Un núcleo estructural conservado en los enzimas de restricción de tipo II Figura 9.44
Adenilato quinasa y guanilato quinasa Figura 9.46
El dominio nuclear de las NMP quinasas Figura 9.47
Cambios conformacionales en la adenilato quinasa Figura 9.51
Tres proteínas que contienen dominios de NTPasa con bucle P Figura 9.52
ATCasa Figura 10.6
El centro activo de la ACTasa Figura 10.8
Proteína quinasa A unida a un inhibidor Figura 10.18
Conformaciones del quimotripsinógeno (en rojo) y de la quimotripsina (en azul) Figura 10.22
Interacción de la tripsina con su inhibidor Figura 10.24
Una molécula de fibrinógeno Figura 10.27
La región de unión a calcio de la protrombina Figura 10.32
Oligosacáridos unidos a la eritropoyetina Figura 11.21
Estructura de un dominio de unión a carbohidratos de tipo C perteneciente a una lectina animal Figura 11.26
Bacteriorrodopsina Figura 12.18
Porina bacteriana (*Rhodopseudomonas blasticus*) Figura 12.20
Unión de la prostaglandina H2 sintasa-1 a la membrana Figura 12.23
Conducto hidrofóbico de la prostaglandina H2 sintasa Figura 12.24
Bomba de calcio Figura 13.3
Cambios conformacionales en la bomba de calcio Figura 13.4
Transportador ABC Figura 13.8
Una lactosa permeasa unida a un análogo de la lactosa Figura 13.11
El conducto de potasio Figura 13.17
Un conducto de potasio activado por voltaje Figura 13.22
El receptor de acetilcolina Figura 13.27
Acuaporina Figura 13.33
El receptor 7TM Figura 14.4
Una proteína G heterotrímera Figura 14.6
Activación de la adenilato ciclase Figura 14.7
Mano EF Figura 14.15
Hélices α de unión de la calmodulina Figura 14.16
Insulina Figura 14.17
Activación del receptor de la insulina por fosforilación Figura 14.19
Dominio SH2 Figura 14.22
Factor de crecimiento epidérmico Figura 14.25
Dimerización del receptor EGF Figura 14.27
El receptor EGF inactivado Figura 14.28
Grb-2, una proteína adaptadora Figura 14.29
Src Figura 14.32

- Ajuste inducido en la hexoquinasa Figura 16.3
Triosa fosfato isomerasa Figura 16.4
Gliceralfidol 3-fosfato deshidrogenasa Figura 16.6
Región de unión al NAD⁺ en las deshidrogenasas Figura 16.12
Fosfofructoquinasa Figura 16.15
Dominio de unión a biotina de la piruvato-carboxilasa Figura 16.24
Estructura de dominios de la fosfofructoquinasa 2 Figura 16.29
Cambios conformacionales en la citrato sintasa tras la unión al oxalacetato Figura 17.10
Unión del citrato al complejo ferrosulfurado de la aconitasa Figura 17.12
Succinil-CoA sintetasa Figura 17.14
Q-citocromo c oxidoreductasa (*citocromo bc₁*) Figura 18.11
Citocromo c oxidasa Figura 18.13
Conservación de la estructura tridimensional del citocromo c Figura 18.21
ATP sintasa Figura 18.25
ATP-ADP translocasa Figura 18.38
Centro de reacción fotosintético en bacterias Figura 19.9
Fotosistema II Figura 19.13
Fotosistema I Figura 19.19
Ferredoxina Figura 19.21
Ferredoxina-NADP⁺ reducasa Figura 19.22
Un complejo captador de luz Figura 19.30
Rubisco Figura 20.3
Tiorredoxina Figura 20.15
Glucógeno fosforilasa Figura 21.6
Fosforilasa *a* y fosforilasa *b* Figura 21.9
Centro activo de la metilmalonil-CoA mutasa Figura 22.17
Ubiquitina Figura 23.2
Tetraubiquitina Figura 23.4
Proteosoma 20S Figura 23.5
Evolución del proteosoma Figura 23.8
Biosíntesis de tiamina Figura 23.9
Aspartato aminotransferasa Figura 23.12
Enzimas homólogos Figura 23.19
Proteína Fe Figura 24.2
Proteína MoFe Figura 24.3
Una DNA metilasa unida a su diana Figura 24.12
Triptófano sintetasa Figura 24.16
3-Fosfoglicerato deshidrogenasa Figura 24.18
Dominio regulatorio formado por dos subunidades de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa Figura 24.20
Glutatión peroxidasa Figura 24.26
Carbamoyl-fosfato sintetasa Figura 25.3
Conducto de la carbamoyl-fosfato sintetasa Figura 25.4
Subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa Figura 25.10
Estructura del dominio en forma de hélice de barco Figura 26.19
Formas B y A del DNA Figura 28.3
DNA Z Figura 28.8
Topoisomerasa I Figura 28.11
Topoisomerasa II Figura 28.13
DNA polimerasa Figura 28.15
Cambio conformacional en la DNA polimerasa tras la unión a dNTP Figura 28.19
Helicasa Figura 28.23
Residuos conservados entre las helicasas Figura 28.25
Una pinza que se desliza sobre el DNA Figura 28.26
Enzima de reparación del DNA AlkA Figura 28.43
Recombinasa Cre y topoisomerasa I Figura 28.50
RNA polimerasa Figura 29.1
Separación del híbrido RNA-DNA mediante una estructura de la RNA polimerasa Figura 29.9
Complejo formado por la proteína de unión a la caja TATA y el DNA Figura 29.21
Ensamblaje del complejo de iniciación Figura 29.22
Un intrón capaz de automadurar Figura 29.38
tRNA Figura 30.4
Apilamiento de hélices en el tRNA Figura 30.5
Centro activo de la treonil-tRNA sintetasa Figura 30.7
Centro de edición de la treonil-tRNA sintetasa Figura 30.8
Complejo de la treonil-tRNA sintetasa Figura 30.10
Tipos de aminoacil-tRNA sintetasas Figura 30.12
El ribosoma, a alta resolución Figura 30.13
Patrón de plegamiento del RNA ribosomal Figura 30.14
Lugares de unión al RNA de transferencia Figura 30.18
Factor de elongación Tu Figura 30.23
Interacciones entre el represor lac y el DNA Figura 31.2
Motivo hélice-giro-hélice Figura 31.3
Reconocimiento del DNA mediante hebras β Figura 31.4
Estructura del homeodominio Figura 31.5
Región básica-cremallera de leucina Figura 31.6
Dominios dedo de zinc Figura 31.7
El represor lac Figura 31.11
Un dímero de CAP unido al DNA Figura 31.16
Partícula central del nucleosoma Figura 31.20
Histonas homólogas Figura 31.21
Centros de unión a GAL4 Figura 31.23
Dos dominios del receptor hormonal nuclear Figura 31.26
Unión de ligandos al receptor hormonal nuclear Figura 31.27
Complejo receptor de estrógenos-tamoxifeno Figura 31.29
Acetiltransferasa de histonas Figura 31.30
Un bromodomino Figura 31.31
Ferritina Figura 31.36
Aconitasa Figura 31.39
Repetición de la anquirina Figura 32.35
Unidad de reconocimiento de PAMP del receptor de tipo Toll Figura 33.3
Immunoglobulina G Figura 33.5
Plegamiento de la inmunoglobulina Figura 33.12
Dominios variables de las cadenas L y H Figura 33.13
Complejo formado por el fragmento F_{ab} de un anticuerpo y su diana, la fosfoficolina Figura 33.14
Anticuerpos contra la lisozima Figura 33.15
Interacciones anticuerpo-lisozima Figura 33.16
Proteína MHC de clase I Figura 33.26
Lugar de unión de la proteína MHC de clase I Figura 33.27
Receptor de las células T Figura 33.29
Complejo receptor de las células T-MHC de clase I Figura 33.30
El coreceptor CD8 Figura 33.31
Proteína MHC de clase II Figura 33.36
El coreceptor CD4 Figura 33.37
Polimorfismo en las proteínas MHC de clase I Figura 33.40
Receptor de HIV Figura 33.42
Estructura de la miosina a alta resolución Figura 34.4
Cadenas ligeras de la miosina Figura 34.5
Helicóide de dos hebras superenrolladas de la miosina Figura 34.6
Dominio de la cabeza de la quinesina a alta resolución Figura 34.7
Modelo del dominio de la cabeza de la dinémina Figura 34.8
Movimiento del brazo de palanca Figura 34.9
Cuello de enlace Figura 34.11
Actina Figura 34.15
Actina y hexoquinasa Figura 34.16
Tubulina Figura 34.22
Flagelina Figura 34.26
Componentes del motor flagelar Figura 34.28

Recursos multimedia y suplementos

Sitio Web asociado en www.whfreeman.com/stryer

Para los estudiantes

- Figuras animadas. Cada ilustración de una estructura proteica que aparece en el texto se puede ver también de forma interactiva y en 3D en Internet, utilizando Jmol. Los estudiantes pueden utilizar el zoom y rotar las estructuras "animadas" para lograr una mejor comprensión de su naturaleza tridimensional y pueden experimentar con los diversos estilos de visualización (modelo espacial compacto, bolas y palos, lazos, esqueleto) mediante una interfaz de usuario fácil de usar.
- Las demostraciones interactivas basadas en estructuras en formato Jmol ilustran cómo la estructura ayuda a explicar datos experimentales (como el efecto de mutaciones, la variación de secuencia en proteínas homólogas, los efectos de modificaciones químicas y los resultados de experimentos espectroscópicos). *Las demostraciones han sido elaboradas por Neil D. Clarke, de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins.*
- Las demostraciones basadas en conceptos ayudan a los estudiantes a desarrollar un conocimiento intuitivo de algunos de los conceptos más difíciles que abarca el texto. *Las demostraciones han sido elaboradas por Neil D. Clarke, de la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins.*
- Las animaciones de técnicas ayudan a los estudiantes a comprender las técnicas experimentales utilizadas en la investigación de genes y proteínas.
- Herramienta de autoevaluación. Los estudiantes pueden comprobar sus conocimientos haciendo por Internet el examen de preguntas de múltiple elección que viene con cada capítulo, o bien haciendo una revisión de química general.
- Glosario de términos clave.
- Enlaces en la web. Este recurso conecta a los estudiantes con el mundo de la bioquímica, más allá de las aulas.

Para los profesores

Además de todo lo que se ha citado anteriormente:

- Todas las ilustraciones y tablas del libro de texto, incluyendo las estructuras del *Glosario de Compuestos* en formato jpeg y Power Point, optimizados para proyectarse en clase.
- Preguntas adaptadas al Sistema Personal para Responder Cuestiones en Clase mediante un mando a distancia (*clicker questions*). Más de 100 preguntas para utilizar en clase que funcionarán sin problemas con cualquier sistema personal de respuestas, incluyendo el i-clicker, el nuevo sistema para responder preguntas en clase mediante radiofrecuencias ofrecido por W. H. Freeman & Company (www.clicker.com)

- El Banco de Evaluación, de Harvey Nikkel (Grand Valley State University) y Susan Knock (Texas A&M University, Galveston), ofrece más de 1.500 preguntas en formato Word, que pueden ser editadas.

CD-ROM Instructor's Resource [0-7167-4590-9]

Este CD incluye todos los recursos para los profesores que contiene el sitio Web.

Transparencias [0-7167-6049-5]

200 ilustraciones a todo color sacadas del libro de texto y optimizadas para ser proyectadas en clase.

Student Companion [0-7167-7067-9]

Richard I. Gumpert, College of Medicine at Urbana-Champaign, University of Illinois
Frank H. Deis, Rutgers University
Nancy Counts Gerber, San Francisco State University.
Soluciones ampliadas a los problemas del libro de texto proporcionados por Roger E. Koeppe II, University of Arkansas
Para cada capítulo del libro de texto el *Student Companion* incluye:

- Objetivos de aprendizaje del capítulo y Resumen
- Problemas de autoevaluación, incluyendo preguntas de múltiple elección, preguntas de respuesta corta, preguntas de relacionar y problemas que plantean un reto, junto con las soluciones
- Soluciones ampliadas a los problemas del final de cada capítulo

Lecture Notebook [0-7167-7157-8]

Para los estudiantes que se encuentran demasiado ocupados copiando figuras, ecuaciones y diagramas como para seguir la lección, el *Notebook* es un compañero de clase indispensable, con:

- Ilustraciones y tablas en el orden en que aparecen en el libro de texto, con espacio de sobra para tomar notas
- Hojas perforadas con tres agujeros, de modo que los estudiantes pueden reorganizar el *Notebook* en el orden preciso para seguir las lecciones e insertar el material suministrado por el profesor

Agradecimientos

En primer lugar, los agradecimientos van dirigidos a nuestros estudiantes. No se ha escrito una palabra ni elaborado una ilustración sin tener en cuenta que estudiantes brillantes y comprometidos detectarían inmediatamente cualquier imprecisión y ambigüedad. También damos las gracias a nuestros colegas que nos han apoyado, aconsejado, enseñado o que, a veces, sencillamente se han aburrido con nosotros al desempeñar esta ardua labor. También estamos agradecidos a nuestros colegas de todo el mundo que han respondido pacientemente a nuestras preguntas y han compartido sus conocimientos sobre los descubrimientos recientes. Damos las gracias a Susan J. Baserga y Erica A. Champion, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale por sus notables contribuciones a la revisión del Capítulo 29. Alan Mellors, profesor emérito de la Universidad de Guelph, merece nuestro agradecimiento por leer las galeras de todos los capítulos y comprobar la precisión. También estamos especialmente agradecidos a aquellos que han participado en la revisión de esta nueva edición. Sus meditados comentarios, sugerencias y muestras de aliento han sido de gran ayuda para mantener la excelencia de pasadas ediciones. Estos revisores son:

Steven Ackerman <i>University of Massachusetts</i>	Bansidhar Datta <i>Kent State University</i>	Anne Grove <i>Louisiana State University</i>
John S. Anderson <i>University of Minnesota</i>	Frank H. Deis <i>Rutgers University</i>	Stuart Haring <i>University of Iowa Carver College of Medicine</i>
Kenneth Balazovich <i>University of Michigan</i>	Zachariah Dhanarajan <i>Florida A&M University</i>	Edward D. Harris <i>Texas A&M University</i>
Susan J. Baserga <i>Yale University School of Medicine</i>	Preeti Dhar <i>State University of New York, New Paltz</i>	Newton Hilliard, Jr. <i>Eastern New Mexico University</i>
Gail S. Begley <i>Northeastern University</i>	Huangen Ding <i>Louisiana State University</i>	Gerwald Jogl <i>Brown University</i>
Donald C. Beitz <i>Iowa State University</i>	Joseph Eichberg <i>University of Houston</i>	Konstantin V. Kandror <i>Boston University School of Medicine</i>
Peggy R. Borum <i>University of Florida</i>	Thomas Ellenberger <i>Harvard Medical School</i>	A. Wali Karzai <i>Stony Brook University</i>
J. Bradley <i>University of British Columbia</i>	Susan C. Evans <i>Ohio University</i>	Phillip E. Klebba <i>University of Oklahoma</i>
Randy Brewton <i>University of Tennessee</i>	Ray Fall <i>University of Colorado</i>	Aileen F. Knowles <i>San Diego State University</i>
Scott D. Briggs <i>Purdue University</i>	Wilson A. Francisco <i>Arizona State University</i>	John Koontz <i>University of Tennessee</i>
Martin L. Brock <i>Eastern Kentucky University</i>	Terrence G. Frey <i>San Diego State University</i>	Robert Kranz <i>Washington University</i>
Roger Brownsey <i>University of British Columbia</i>	K. Christopher Garcia <i>Stanford University School of Medicine</i>	Min-Hao Kuo <i>Michigan State University</i>
Michael F. Bruist <i>University of the Sciences in Philadelphia</i>	Ronald K. Gary <i>University of Nevada, Las Vegas</i>	Patrick D. Larkin <i>Texas A&M University, Corpus Christi</i>
John D. Brunstein <i>University of British Columbia</i>	Alexandros Georgakilas <i>East Carolina University</i>	Sylvia Lee-Huang <i>New York University School of Medicine</i>
Mauricio Bustos <i>University of Maryland, Baltimore County</i>	Burt Goldberg <i>New York University</i>	Glen B. Legge <i>University of Houston</i>
W. Malcolm Byrnes <i>Howard University College of Medicine</i>	Michael R. Green <i>University of Massachusetts Medical School</i>	Vince LiCata <i>Louisiana State University</i>
Larry D. Crouch <i>University of Nebraska Medical Center</i>	E. M. Gregory <i>Virginia Tech</i>	Robley J. Light <i>Florida State University</i>
David L. Daleke <i>Indiana University</i>	Charles B. Grissom <i>University of Utah</i>	Xuedong Liu <i>University of Colorado, Boulder</i>

Andy LiWang <i>Texas A&M University</i>	David C. Pendergrass <i>Kansas University</i>	Marc E. Tischler <i>University of Arizona</i>
Timothy M. Logan <i>Florida State University</i>	Cynthia B. Peterson <i>University of Tennessee</i>	Liang Tong <i>Columbia University</i>
Michael A. Massiah <i>Oklahoma State University</i>	Philip A. Rea <i>University of Pennsylvania</i>	Michael Uhler <i>University of Michigan</i>
Douglas D. McAbee <i>California State University, Long Beach</i>	Douglas D. Root <i>University of North Texas</i>	Ronald Vale <i>University of California, San Francisco</i>
James McAfee <i>Pittsburg State University</i>	Robert Rosenberg <i>Howard University</i>	Katherine Wall <i>University of Toledo</i>
Megan M. McEvoy <i>University of Arizona</i>	Richard L. Sabina <i>Medical College of Wisconsin</i>	Malcolm Watford <i>Rutgers University</i>
Bryant W. Miles <i>Texas A&M University</i>	Robert Sanders <i>University of Kansas</i>	Joachim Weber <i>Texas Tech University</i>
Patricia M. Moroney <i>Louisiana State University</i>	Jamie L. Schlessman <i>United States Naval Academy</i>	Ian A. Wilson <i>The Scripps Research Institute</i>
Mike Mossing <i>University of Mississippi</i>	Todd P. Silverstein <i>Willamette University</i>	Marc S. Wold <i>University of Iowa Carver College of Medicine</i>
Michael P. Myers <i>California State University, Long Beach</i>	Melanie A. Simpson <i>University of Nebraska, Lincoln</i>	Charles Yocum <i>University of Michigan</i>
Harry Noller <i>University of California, Santa Cruz</i>	Kerry S. Smith <i>Clemson University</i>	Robert Zand <i>University of Michigan</i>
MaryKay Orgill <i>University of Missouri</i>	Deborah A. Spikes <i>Stony Brook University</i>	Brent M. Znosko <i>Saint Louis University</i>
Oliver E. Owen <i>Retired clinical investigator, administrator, and academician</i>	Takita Felder Sumter <i>Winthrop University</i>	
	David C. Teller <i>University of Washington</i>	

Trabajar con nuestros colegas de W. H. Freeman & Company ha sido una experiencia maravillosa. Nos gustaría agradecer especialmente los esfuerzos de las siguientes personas. Nuestra editora de desarrollo, Susan Moran, ha contribuido inmensamente al éxito de este proyecto. Nuestra editora del proyecto, Georgia Lee Hadler, dirigió la trayectoria del proyecto, desde el manuscrito final hasta el producto final, con admirable eficacia. La meticulosa editora del manuscrito, Patricia Zimmerman, aumentó la consistencia literaria y la claridad del texto. La directora de diseño, Diana Blume, ha creado un diseño y una maquetación donde la organización es clara y la estética agradable. Nuestra editora de fotografías, Bianca Moscatelli, ha localizado nuevas imágenes con tesón. Bill Page, el coordinador de ilustraciones, supervisó sabiamente el aspecto final de las nuevas ilustraciones y Susan Weim, la directora de producción, sorteó con astucia todas las dificultades asociadas a la planificación, la composición y el proceso de fabricación. La contribución de la editora multimedia Alyssia Baker y de los editores ayudantes Nick Tymoczko y Deena Goldman en la dirección del programa de recursos multimedia y suplementos ha sido inestimable. También nos gustaría dar las gracias a Timothy Driscoll por su labor a la hora de convertir nuestras figuras animadas al formato Jmol.

Nuestra editora de adquisiciones, Kate Ahr, fue una directora de proyecto sobresaliente. Su entusiasmo, muestras de ánimo, paciencia y buen humor nos hizo continuar cuando estábamos cansados, frustrados y desanimados. Los expertos en marketing John Britch y Sarah Martin supervisaron la presentación de esta edición al mundo académico. También damos las gracias a los agentes de ventas de W. H. Freeman & Company por sus excelentes sugerencias y visión de mercado. Damos las gracias a Elizabeth Widdicombe, presidenta de W. H. Freeman & Company, por no perder nunca la fe en nosotros.

Por último, el proyecto no hubiese sido posible sin el apoyo constante de nuestras familias, especialmente nuestras esposas Wendie Berg y Alison Unger. Su paciencia, muestras de ánimo y entusiasmo han hecho posible esta empresa. También damos las gracias a nuestros hijos Alex, Corey y Mónica Berg y Janina y Nicholas Tymoczko por su indulgencia y buen humor y por ofrecernos constantemente una perspectiva de lo que realmente importa en la vida.

Prólogo a la 6^a edición española

A igual que en ediciones anteriores, nos complace incluir este breve prólogo a la 6^a edición del admirable libro del Profesor Stryer. El crecimiento exponencial de la Bioquímica vivido en estos últimos años ha impulsado a reducir el tiempo entre ediciones, a fin de incluir las aportaciones más recientes y relevantes en este hermoso campo de la ciencia. Recordaremos aquí algunos aspectos, citados en la 5^a edición, que tienen plena vigencia en la actualidad.

Primero: la colaboración de dos autores prestigiosos, los Profesores Berg y Timoczko, que actualizan el texto con cuestiones, problemas y figuras.

Segundo: existen desde el principio materiales docentes complementarios muy útiles para facilitar el aprendizaje, entre los que se incluyen las páginas Web y un libro de Problemas.

Al lector español o hispanohablante debemos decirle como siempre que las abreviaturas tienen rango de fórmulas y son por tanto intraducibles (se apoyan en el nombre inglés: el idioma oficial de la bioquímica). Así, por ejemplo, decimos **DNA** y no **ADN** (por *deoxyribonucleic acid*), llamamos **VLDL** a las lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoproteins*), etc. En general, estas siglas, aceptadas universalmente, aclaran muy bien el concepto que encarnan y facilitan intuir su sentido cuando éste no se recuerda con exactitud.

Sin embargo, en nuestras traducciones nos hemos resistido a utilizar excesivos anglicismos, tan comunes en otros textos hispanos, tales como, por ejemplo, llamar a las *mutaciones de punto*, *puntuales*, a los *RNA ribosómicos*, *ribosomales*, a las *proteínas víricas*, *virales*, para no llegar algún día - como dicen mis alumnos - a tratar los asuntos *animicos*, como *animales*. Pero hemos llegado demasiado tarde para salvar a las estructuras "*mitocondricas*" que ya son, para siempre, *mitocondriales*. A *los biocatalizadores* les seguimos llamando *los enzimas* (aunque respetamos naturalmente a quienes les adjudican el género femenino) y a los *conductos* a través de las membranas no les llamamos *canales* (un *semiconductor* se comprende bien, pero un "*semicanal*" ¿qué podría ser?) aunque sí, adoptamos otros términos, como "**patch clamp, cassette, espliecosoma, primasa...**" y otros mil barbarismos rápidamente difundidos y universalmente aceptados.

Confío en haber plasmado con fidelidad las ideas de los autores -más el espíritu que la simple letra- y deseo que esta obra excelente sirva de ayuda eficaz para muchos universitarios. Quiero agradecer a **Editorial Reverté** el grato encargo de esta traducción y al Secretario del Departamento y entrañable amigo, **Clemente Rodríguez**, la coordinación y corrección de esos trabajos en los que han participado con competencia, dedicación y generosidad imponentes varios catedráticos y profesores de bioquímica, cuya lista anexo y a quienes agradezco muy de veras su valiosa ayuda para culminar -espero que con éxito- esta grata labor.

José María Macarulla

Profesores que han colaborado

Itziar Alkorta	Begoña Ochoa
Alicia Alonso	Adelina Prado
Juan Manuel González Mañas	José Luis Rodríguez Arondo
Félix M ^a Goñi	Begoña Ruiz Larrea
Maria Jesús Llama	Juan Luis Serra
M ^a Teresa Macarulla	Miguel Trueba

Índice resumido

Parte I Diseño molecular de la vida

- 1 La bioquímica: una ciencia en desarrollo 1
- 2 Composición y estructura de las proteínas 25
- 3 Investigación en proteínas y proteomas 65
- 4 DNA, RNA y el flujo de la información genética 107
- 5 La investigación de genes y genomas 134
- 6 Investigación de la evolución y la bioinformática 164
- 7 La hemoglobina: instantánea de una proteína en acción 183
- 8 Enzimas: conceptos básicos y cinética 205
- 9 Estrategias catalíticas 241
- 10 Estrategias reguladoras 275
- 11 Carbohidratos 303
- 12 Lípidos y membranas celulares 326
- 13 Conductos y bombas de membrana 351
- 14 Vías de transducción de señales 381

Parte II Transducción y almacenamiento de la energía

- 15 Metabolismo: conceptos básicos y visión de conjunto 409
- 16 Glicólisis y gluconeogénesis 433
- 17 El ciclo del ácido cítrico 475
- 18 Fosforilación oxidativa 502
- 19 Las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis 541
- 20 El ciclo de Calvin y la vía de las pentosas fosfato 565
- 21 Metabolismo del glucógeno 592
- 22 Metabolismo de los ácidos grasos 617
- 23 Recambio de las proteínas y catabolismo de los aminoácidos 649

Parte III Síntesis de las moléculas de la vida

- 24 Biosíntesis de aminoácidos 679
- 25 Biosíntesis de nucleótidos 709
- 26 Biosíntesis de lípidos de membrana y de esteroides 732
- 27 Integración del metabolismo 760
- 28 Replicación, reparación y recombinación del DNA 783
- 29 Síntesis y maduración del RNA 821
- 30 Síntesis de proteínas 857
- 31 El control de la expresión génica 892

Parte IV Respuestas a cambios ambientales

- 32 Sistemas sensoriales 921
- 33 El sistema inmunitario 945
- 34 Motores moleculares 977
- 35 Desarrollo de fármacos 1001

Índice

Prefacio

V

Prólogo a la 6^a edición española

XVII

Parte I Diseño molecular de la vida

Capítulo 1 La bioquímica: una ciencia en desarrollo 1

- 1.1 En la diversidad biológica subyace la unidad bioquímica 1
- 1.2 El DNA ilustra la relación entre forma y función 4
El DNA está constituido por cuatro tipos de precursores 4
Dos hebras sencillas de DNA se emparejan para formar un doble helicoidal 5
La estructura del DNA explica la herencia y el almacenamiento de la información 5
- 1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas 6
La doble hélice puede formarse a partir de las hebras complementarias 6
Los enlaces covalentes y no covalentes son importantes para la estructura y estabilidad de las moléculas biológicas 7
La doble hélice es una expresión de las leyes de la química 10
Las leyes de la termodinámica rigen el comportamiento de los sistemas bioquímicos 11
En la formación de la doble hélice se libera calor 12
Las reacciones ácido-base son cruciales en muchos procesos bioquímicos 14
Las reacciones ácido-base pueden desorganizar la doble hélice 15
Los amortiguadores regulan el pH en los organismos y en el laboratorio 16
- 1.4 La revolución genómica está transformando la Bioquímica y la Medicina 17

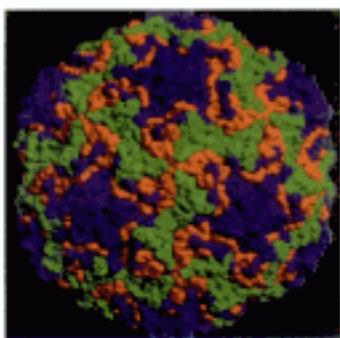
La secuenciación del genoma humano es un hito en la historia de la humanidad 18

- Las secuencias del genoma codifican las proteínas y los patrones de expresión 18
- La individualidad personal depende de la relación entre los genes y el entorno 20
- APÉNDICE: Representación de las estructuras moleculares I: Moléculas pequeñas 22

Capítulo 2 Composición y estructura de las proteínas 25

- 2.1 Las proteínas se construyen a partir de una colección de veinte aminoácidos 27
- 2.2 Estructura primaria: los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas 34
Las proteínas tienen secuencias de aminoácidos específicas determinadas por los genes 36

Las cadenas polipeptídicas son flexibles aunque están restringidas en su conformación	37
2.3 Estructura secundaria: las cadenas polipeptídicas se pueden plegar en estructuras regulares como la hélice alfa, la hoja plegada beta y giros y bucles	
La hélice α es una estructura helicoidal estabilizada por puentes de hidrógeno intracatenarios	40
Las hojas β se estabilizan por puentes de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas	40
Las cadenas polipeptídicas pueden cambiar de dirección por medio de giros inversos y bucles	42
Las proteínas fibrosas suministran un soporte estructural a las células y a los tejidos	44
2.4 Estructura terciaria: las proteínas solubles en agua se pliegan en estructuras compactas con un núcleo no polar	
2.5 Estructura cuaternaria: las cadenas polipeptídicas pueden ensamblarse en estructuras de múltiples subunidades	



2.6 La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional

Los aminoácidos tienen diferentes propensiones a formar hélices α , hojas β y giros β	50
Algunas enfermedades neurológicas están asociadas a plegamientos y agregaciones de proteínas erróneas	52
El plegamiento proteico es un proceso muy cooperativo	53
Las proteínas se pliegan por estabilización progresiva de intermediarios más que por búsqueda aleatoria	55
La predicción de la estructura tridimensional a partir de la secuencia continúa siendo un gran reto	57
La modificación y escisión de las proteínas les confieren nuevas capacidades	57
APÉNDICE: Visualización de estructuras moleculares II: Proteínas	61

Capítulo 3 Investigación en proteínas y proteomas 65

El proteoma es la representación funcional del genoma	66
3.1 La purificación de las proteínas es un primer paso esencial para el conocimiento de su función	
El experimento: ¿cómo reconocemos a la proteína que estamos buscando?	67

Para su purificación, las proteínas deben liberarse de la célula	67
Las proteínas se pueden purificar de acuerdo con su solubilidad, tamaño, carga y afinidad	68
Las proteínas se pueden separar e identificar por electroforesis en gel	71
El protocolo de purificación de proteínas se puede evaluar cuantitativamente	74
La ultracentrifugación es valiosa para separar las biomoléculas y determinar sus masas moleculares	76
3.2 Las secuencias de aminoácidos se pueden determinar por la degradación de Edman automatizada	78
Las proteínas se pueden fragmentar de modo específico en péptidos pequeños para facilitar su análisis	80
Las secuencias de aminoácidos son buenas fuentes de conocimiento	82
La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la secuenciación de las proteínas	83
3.3 La inmunología proporciona técnicas importantes para la investigación en proteínas	84
Se pueden generar anticuerpos contra proteínas específicas	84
Se pueden preparar fácilmente anticuerpos monoclonales de prácticamente cualquier especificidad deseada	85
Las proteínas se pueden detectar y cuantificar mediante un ensayo de inmunoabsorción asociada a enzima	87
La transferencia Western permite la detección de proteínas separadas por electroforesis en gel	88
Los marcadores fluorescentes hacen posible la visualización de proteínas en la célula	89
3.4 Los péptidos se pueden sintetizar utilizando metodología en fase sólida automatizada	90
3.5 La espectrometría de masas proporciona herramientas poderosas para la caracterización e identificación de proteínas	93
La masa de una proteína se puede determinar de modo preciso por espectroscopía de masas	93
Los componentes individuales de grandes complejos proteicos se pueden identificar por espectrometría de masas MALDI-TOF	94
3.6 La estructura tridimensional de las proteínas se puede determinar por cristalografía de rayos X y espectroscopía de NMR	96
La cristalografía de rayos X proporciona la estructura tridimensional con detalle atómico	96
La espectroscopía de resonancia magnética nuclear puede revelar las estructuras de las proteínas en disolución	98

Capítulo 4 DNA, RNA y el flujo de la información genética 107

4.1 Un ácido nucleico está formado por cuatro tipos de bases unidas a un eje de azúcar-fosfato	108
El RNA y el DNA difieren en un azúcar componente y en una de las bases	108

Los nucleótidos son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos	109	La PCR es una técnica poderosa para el diagnóstico médico, la medicina forense y los estudios de evolución molecular	141
4.2 Una pareja de cadenas de ácido nucleico con secuencias complementarias puede formar una estructura de doble hélice	111	5.2 La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado todos los aspectos de la biología	142
La doble hélice es estable gracias a puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas	111	Los enzimas de restricción y la DNA ligasa son herramientas básicas para la construcción de moléculas recombinantes de DNA	142
La doble hélice facilita la transmisión precisa de la información hereditaria	113	Los plásmidos y el fago lambda son los vectores a escoger para clonar DNA en bacterias	143
La doble hélice se puede fundir reversiblemente	114	Cromosomas artificiales de bacterias y de levaduras	145
Algunas moléculas de DNA son circulares y están superenrolladas	115	Se pueden clonar determinados genes a partir de fragmentos obtenidos por digestión del DNA genómico	146
Los ácidos nucleicos de hebra simple pueden adoptar estructuras complicadas	116	Mediante cambios dirigidos en el DNA es posible crear proteínas con nuevas funciones	147
4.3 Las polimerasas replican el DNA a partir de las instrucciones de moldes	117	5.3 Se han secuenciado y analizado genomas completos	149
Las DNA polimerasas catalizan la formación de enlaces fosfodiéster	117	Se han secuenciado los genomas de una serie de organismos que abarca desde bacterias hasta eucariotas pluricelulares	149
Los genes de algunos virus son de RNA	118	La secuenciación del genoma humano está terminada	150
4.4 La expresión génica es la transformación de la información del DNA en moléculas funcionales	119	La genómica comparativa se ha convertido en una poderosa herramienta de investigación	151
Varios tipos de RNA desempeñan un papel clave en la expresión génica	119	Es posible examinar de forma exhaustiva los niveles de la expresión génica	151
Todo el RNA celular se sintetiza por las RNA polimerasas	120	5.4 Los genes eucarióticos se pueden manipular con una precisión considerable	152
Las RNA polimerasas reciben instrucciones de DNA moldes	121	Es posible preparar DNA complementario a partir de mRNA y expresarlo en células hospedadoras	152
La transcripción comienza junto a centros promotores y finaliza en los centros de terminación	122	Es posible expresar de forma eficaz genes nuevos introducidos en células eucarióticas	154
El RNA de transferencia es la molécula adaptadora en la síntesis de proteínas	123	Los animales transgénicos albergan y expresan genes que han sido introducidos en su línea germinal	155
4.5 Los aminoácidos se codifican por grupos de tres bases comenzando desde un punto fijo	124	La desactivación de un gen proporciona claves sobre su función	155
Características principales del código genético	125	La interferencia por RNA es una herramienta más para interrumpir la expresión de los genes	157
El RNA mensajero contiene señales de iniciación y de parada para la síntesis de proteínas	126	Es posible utilizar plásmidos que producen tumores para introducir nuevos genes en células vegetales	157
El código genético es prácticamente universal	126	La terapia génica en humanos abre nuevos horizontes en medicina	158
4.6 La mayoría de los genes de eucariotas son mosaicos de intrones y exones	127		
El procesamiento del RNA genera el RNA maduro	128		
Muchos exones codifican dominios de proteínas	128		
Capítulo 5 La investigación de genes y genomas	134	Capítulo 6 Investigación de la evolución y la bioinformática	164
5.1 La investigación de los genes se basa en unas herramientas básicas	135	6.1 Los homólogos descienden de un antepasado común	165
Los enzimas de restricción cortan el DNA en fragmentos específicos	135	6.2 La homología puede detectarse mediante el análisis estadístico de secuencias alineadas	166
Los fragmentos de restricción pueden separarse por electroforesis en gel y visualizarse	136	El significado estadístico de los alineamientos puede valorarse reordenando los componentes al azar	168
El DNA se puede secuenciar mediante la interrupción controlada de la replicación	138	Los parentescos evolutivos lejanos pueden detectarse mediante la utilización de matrices de sustitución	168
Se pueden sintetizar sondas de DNA y genes mediante métodos en fase sólida automatizados	139	Para descubrir secuencias homólogas se pueden utilizar los bancos de datos	171
Mediante la reacción en cadena de la polimerasa es posible amplificar enormemente secuencias seleccionadas de DNA	140		

6.3 El estudio de las estructuras tridimensionales potencia nuestro conocimiento de los parentescos evolutivos	172	7.4 Las mutaciones en genes que codifican las subunidades de la hemoglobina pueden producir enfermedades	194
La estructura terciaria se conserva más que la primaria	173	La anemia falciforme es el resultado de la agregación de moléculas de desoxihemoglobina mutadas	195
El conocimiento de las estructuras tridimensionales puede ayudar a la evaluación de los alineamientos de secuencias	174	La talasemia se origina por un desequilibrio en la producción de las cadenas de hemoglobina	196
Al alinear las secuencias consigo mismas se pueden detectar motivos repetidos	174	Se impide la acumulación de cadenas a libres de hemoglobina	197
La evolución convergente ilustra soluciones semejantes para los desafíos bioquímicos	175	En el genoma humano están codificadas globinas suplementarias	197
La comparación de las secuencias del RNA puede arrojar nueva luz para penetrar en las estructuras secundarias	176	APÉNDICE: Los modelos para la unión pueden formularse en términos cuantitativos: La representación de Hill y el modelo concertado	199
6.4 Sobre la base de la información de las secuencias se pueden construir los árboles evolutivos	177		
6.5 Técnicas modernas hacen posible el estudio experimental de la evolución	178	Capítulo 8 Enzimas: conceptos básicos y cinética	205
A veces pueden amplificarse y secuenciarse moléculas muy antiguas de DNA	178	8.1 Los enzimas son catalizadores eficaces y muy específicos	206
La evolución molecular puede estudiarse de forma experimental	178	Muchos enzimas requieren cofactores para su actividad	207
		Los enzimas interconvierten diferentes formas de energía	207
Capítulo 7 La hemoglobina: instantánea de una proteína en acción	183	8.2 La energía libre es una función termodinámica útil para la comprensión de los enzimas	208
7.1 La mioglobina y la hemoglobina unen el oxígeno a los átomos de hierro del hemo	184	Los cambios de energía libre proporcionan información sobre la espontaneidad, pero no sobre la velocidad de una reacción	208
La estructura de la mioglobina impide la liberación de especies reactivas de oxígeno	185	El cambio de energía libre estándar de una reacción está relacionado con la constante de equilibrio	208
La hemoglobina humana es un conjunto de cuatro subunidades parecidas a la mioglobina	186	Los enzimas modifican sólo la velocidad de reacción y no alteran el equilibrio de la reacción	210
7.2 La hemoglobina se une al oxígeno de forma cooperativa	187	8.3 Los enzimas aceleran las reacciones facilitando la formación del estado de transición	211
La unión del oxígeno modifica ostensiblemente la estructura cuaternaria de la hemoglobina	188	La primera etapa de la catálisis enzimática es la formación de un complejo enzima-sustrato	213
La cooperatividad de la hemoglobina puede explicarse satisfactoriamente por varios modelos	189	Los centros activos de los enzimas tienen algunas características comunes	214
Los cambios estructurales de los grupos hemo se transmiten por la interfase $\alpha_1\beta_1-\alpha_2\beta_2$	190	Para la catálisis es importante la energía de unión entre el enzima y el sustrato	215
La presencia de 2,3-bisfosfoglicerato en los hematíes es decisiva para determinar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno	190	8.4 El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchos enzimas	216
7.3 El efecto Bohr: los hidrogeniones y el dióxido de carbono estimulan la liberación de oxígeno	192	La cinética es el estudio de las velocidades de reacción	216
		La presunción del estado estacionario facilita una descripción de la cinética del enzima	217
		Los valores de K_M y V_{max} se determinan mediante diferentes métodos	220
		Los valores de K_M y V_{max} son características importantes de los enzimas	220
		El criterio k_{cat}/K_M es una medida de la eficiencia catalítica	221
		La mayoría de las reacciones bioquímicas incluye múltiples sustratos	223
		Los enzimas alostéricos no siguen la cinética de Michaelis-Menten	224

8.5 Los enzimas pueden inhibirse mediante moléculas específicas	225	Las endonucleasas de restricción de tipo II tienen un núcleo catalítico común y probablemente están relacionadas mediante transferencia horizontal de genes	266
Los inhibidores reversibles se distinguen cinéticamente	226		
Los inhibidores irreversibles se pueden utilizar para trazar el mapa del centro activo	228		
Los análogos del estado de transición son eficaces inhibidores de los enzimas	231		
Los anticuerpos catalíticos demuestran la importancia de la unión selectiva del estado de transición para la actividad enzimática	232		
La penicilina inactiva irreversiblemente a un enzima clave en la síntesis de la pared celular bacteriana	232		
APÉNDICE: Los enzimas se clasifican en base al tipo de reacción que catalizan	236		
Capítulo 9 Estrategias catalíticas	241		
Muchos enzimas utilizan unos pocos principios catalíticos básicos	242		
9.1 Las proteasas facilitan una reacción especialmente difícil	243		
La quimotripsina posee un residuo de serina sumamente reactivo	243	Las NMP quinasas son una familia de enzimas que contienen estructuras de bucle P	267
La acción de la quimotripsina tiene lugar en dos pasos enlazados mediante un intermediario unido covalentemente	244	Los auténticos sustratos para prácticamente todos los enzimas dependientes de NTP son los complejos de los nucleótidos trifosfato y el magnesio o manganeso	268
La serina forma parte de una triada catalítica que incluye también a la histidina y al aspartato	245	La unión del ATP induce grandes cambios conformacionales	269
Las triadas catalíticas se encuentran en otros enzimas hidrolíticos	248	Los dominios NTPasa con bucles P están presentes en una serie de proteínas importantes	270
La triada catalítica se ha analizado minuciosamente mediante mutagénesis dirigida	250		
Las cisteinoproteasas, aspartilproteasas y metaloproteasas son otras clases importantes de enzimas que escinden péptidos	251		
Los inhibidores de las proteasas son fármacos importantes	253		
9.2 Las anhidrasas carbónicas aceleran una reacción rápida	254		
Las anhidrasas carbónicas contienen un ion zinc esencial para la actividad catalítica	255	10.1 La aspartato transcarbamila se inhibe alostéricamente por el producto final de su propia vía	276
La catálisis supone la activación del agua por el zinc	256	Los enzimas regulados alostéricamente no siguen cinéticas de Michaelis-Menten	277
La regeneración rápida de la forma activa del enzima se facilita mediante una lanzadera de protones	257	La ATCase consta de subunidades catalíticas y reguladoras separables	277
La evolución convergente ha generado centros activos basados en el zinc en diferentes anhidrasas carbónicas	258	Las interacciones alostéricas en la ATCase están mediadas por grandes cambios en su estructura cuaternaria	278
9.3 Las enzimas de restricción llevan a cabo la escisión del DNA mediante reacciones muy específicas	259	Los reguladores alostéricos modulan el equilibrio entre T y R	281
La escisión del DNA se realiza por una molécula de agua activada por magnesio, mediante un desplazamiento en línea del oxígeno 39 del fósforo	260	10.2 Los isozimas aportan modos específicos de regulación a los diferentes tejidos y en distintas fases del desarrollo	283
Los enzimas de restricción necesitan magnesio para la actividad catalítica	262	La fosforilación es un medio muy eficaz para regular las actividades de proteínas diana	284
El aparato catalítico completo se reúne sólo en los complejos de moléculas de DNA reconocido para asegurar la especificidad	263	El AMP cíclico activa la proteína quinasa A mediante la alteración de su estructura cuaternaria	287
		El ATP y la proteína diana se unen a una profunda hendidura de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A	288
		10.3 La modificación covalente es una forma de regular la actividad enzimática	283
		La fosforilación es un medio muy eficaz para regular las actividades de proteínas diana	284
		El AMP cíclico activa la proteína quinasa A mediante la alteración de su estructura cuaternaria	287
		El ATP y la proteína diana se unen a una profunda hendidura de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A	288
		10.4 Muchos enzimas se activan por escisiones proteolíticas específicas	288
		El quimotripsinógeno se activa por la escisión específica de un solo enlace peptídico	289
		La activación proteolítica del quimotripsinógeno da lugar a la formación de un centro para unir sustrato	290
		La generación de tripsina a partir de tripsinógeno conduce a la activación de otros zimógenos	291
		Algunos enzimas proteolíticos tienen inhibidores específicos	291
		La coagulación sanguínea se consigue mediante una cascada de activaciones de zimógenos	293
		La trombina convierte el fibrinógeno en un círculo de fibrina	293

Una modificación dependiente de vitamina K prepara a la protrombina para su activación	295	La longitud de la cadena y grado de insaturación de los ácidos grasos pueden variar considerablemente	328
La hemofilia ha desvelado una de las primeras etapas de la coagulación	296	12.2 En las membranas hay tres tipos principales de lípidos	329
El proceso de coagulación debe regularse con precisión	296	Los fosfolípidos son los lípidos más importantes de las membranas	329
Capítulo 11 Carbohidratos	303	Los lípidos de membrana pueden contener también hidratos de carbono	331
11.1 Los monosacáridos son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo	304	El colesterol es un lípido basado en un núcleo esteroideo	331
Las pentosas y hexosas se cielan para formar anillos de piranosa y furanosa	306	Las membranas de las arqueas (arqueobacterias) están formadas por éteres lipídicos con cadenas ramificadas	331
Los anillos de piranosa y de furanosa pueden adoptar diferentes conformaciones	308	Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas que poseen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica	332
Los monosacáridos se unen a alcoholos y aminas por medio de enlaces glicosídicos	309	12.3 Los fosfolípidos y glicolípidos forman fácilmente bicapas en medios acuosos	333
Los azúcares fosforilados son intermediarios clave en la generación de energía y en la biosíntesis	310	Los fosfolípidos pueden formar vesículas lipídicas	334
11.2 Los carbohidratos complejos se forman por unión de monosacáridos	310	Las bicapas lipídicas son muy impermeables a los iones y a la mayoría de las moléculas polares	335
La sacarosa, lactosa y maltosa son los disacáridos más comunes	310	12.4 Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos que tienen lugar en las membranas	336
El glucógeno y el almidón son almacenes de glucosa movilizables	311	Las proteínas se asocian con la bicapa lipídica mediante formas muy variadas	336
La celulosa, el principal polímero estructural de las plantas, está formada por cadenas lineales de unidades de glucosa	312	Las proteínas interaccionan con las membranas de maneras muy diversas	336
Los glicosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos aniónicos formadas por repetición de unidades de disacáridos	312	Algunas proteínas se asocian con las membranas mediante grupos hidrofóbicos unidos de forma covalente	340
Unos enzimas específicos son responsables del ensamblaje de los oligosacáridos	314	Se puede predecir la presencia de hélices transmembrana a partir de la secuencia de aminoácidos	340
11.3 Los carbohidratos pueden unirse a proteínas para formar glicoproteínas	316	12.5 Los lípidos y muchas proteínas difunden rápidamente en el plano de la membrana	342
Los carbohidratos pueden unirse a las proteínas a través de residuos de asparagina (enlaces N-) o bien serina o treonina (enlaces O-)	316	El modelo del mosaico fluido admite el movimiento lateral pero no la translocación a través de la membrana	343
La glicosilación de las proteínas tiene lugar en el interior del retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi	317	La fluididad de la membrana está controlada por la composición de sus ácidos grasos y su contenido en colesterol	343
Los errores en la glicosilación pueden ocasionar situaciones patológicas	318	Todas las membranas biológicas son asimétricas	345
Los oligosacáridos pueden "secuenciararse"	319	12.6 Las células eucarióticas contienen compartimentos delimitados por membranas internas	345
11.4 Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos específicos	320	Capítulo 13 Conductos y bombas de membrana	351
Las lectinas propician interacciones entre las células	320	La expresión de los transportadores define en gran medida la actividad metabólica de un determinado tipo celular	352
El virus de la gripe se une a residuos de ácido siálico	321	13.1 El transporte de moléculas a través de las membranas puede ser activo o pasivo	352
Capítulo 12 Lípidos y membranas celulares	326	Muchas moléculas requieren proteínas transportadoras para atravesar las membranas	352
Las diversas membranas biológicas tienen una serie de características comunes	327	Se puede cuantificar la energía libre almacenada en los gradientes de concentración	353
12.1 Los ácidos grasos son componentes clave de los lípidos	327		
Los nombres de los ácidos grasos se basan en el de sus hidrocarbonos parentales	327		

13.2 Dos familias de proteínas de membrana emplean la hidrólisis del ATP para bombear iones y moléculas a través de las membranas

Las ATPasas tipo P acoplan la fosforilación y los cambios conformacionales para bombear iones calcio a través de las membranas

La digital inhibe específicamente la bomba de Na^+ y K^+ porque bloquea su desfosforilación

Las ATPasas de tipo P están conservadas desde un punto de vista evolutivo y desarrollan una amplia gama de funciones

La multirresistencia a fármacos y la fibrosis quística han llamado la atención sobre una familia de proteínas de membrana con dominios de unión a ATP de tipo cassette

13.3 La lactosa permeasa es un arquetipo de transportadores secundarios que utilizan un gradiente de concentración para potenciar la formación de otro gradiente

13.4 Conductos específicos pueden realizar rápidamente el transporte de iones a través de las membranas

Los potenciales de acción están mediados por cambios transitorios en la permeabilidad al Na^+ y K^+

Las medidas de conductancia por "patch-clamp" revelan la actividad de conductos individuales

La estructura de un conducto iónico de potasio es un arquetipo de muchas estructuras de conductos iónicos

La estructura del conducto de potasio revela la base de su especificidad iónica

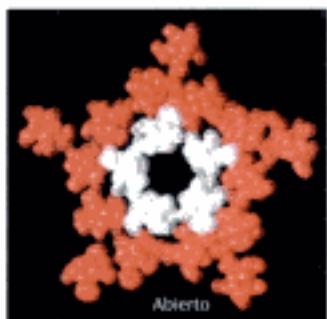
La estructura del conducto de potasio explica las rápidas velocidades del transporte

El control de la apertura, regulado por voltaje, requiere importantes cambios conformacionales en dominios específicos del conducto iónico

Un conducto puede inactivarse por oclusión del poro: El modelo de la cadena de presidiario (ball-and-chain model)

El receptor de acetileolina es el arquetipo para los conductos regulados por ligando

Los potenciales de acción integran el funcionamiento concertado de muchos conductos iónicos



13.5 Los nexus ("gap junctions") permiten el flujo de iones y moléculas pequeñas entre células comunicantes

13.6 Unos conductos específicos aumentan la permeabilidad al agua de algunas membranas

354

Capítulo 14 Vías de transducción de señales 381

La transducción de señales depende de circuitos moleculares

354

14.1 Las proteínas G heterotriméricas transmiten señales y se desactivan a sí mismas

357

La unión del ligando a los receptores 7TM conduce a la activación de las proteínas G

358

Las proteínas G activadas transmiten las señales mediante su unión a otras proteínas

358

El AMP cíclico estimula la fosforilación de muchas moléculas diana mediante la activación de la proteína quinasa A

358

Las proteínas G se desactivan de forma espontánea mediante la hidrólisis del GTP

360

Algunos receptores 7TM activan la cascada de los fosfoinosítidos

362

El ion calcio es un segundo mensajero universal

362

Los iones calcio activan la proteína reguladora calmodulina

14.2 Señalización por insulina: las cascadas de fosforilación son primordiales en muchos procesos de transducción de señales

363

El receptor de insulina es un dímero que se cierra en torno a una molécula de insulina unida

364

La unión de la insulina provoca la fosforilación cruzada y la activación del receptor de insulina

365

La quinasa del receptor de insulina activada inicia una cascada de quinasas

367

La señal de la insulina termina por la acción de las fosfatases

368

14.3 Señalización por EGF: los sistemas de transducción de señales están preparados para responder

369

La unión del EGF induce la dimerización del receptor de EGF

370

El extremo carboxilo terminal del receptor de EGF se fosforila

372

La señalización mediante EGF conduce a la activación de Ras, una proteína G pequeña

372

La proteína Ras activada inicia una cascada de proteína quinasas

372

La señalización por EGF la finalizan fosfatases de proteínas y la actividad GTPasa intrínseca de Ras

14.4 Muchos elementos de las diferentes vías de transducción de señales son recurrentes con variaciones

14.5 Los defectos en las vías de transducción de señales pueden provocar cáncer y otras enfermedades

Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para inhibir las vías de transducción de señales activadas en los tumores

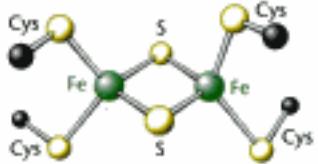
Los inhibidores de proteína quinasas pueden ser fármacos anticancerígenos eficaces

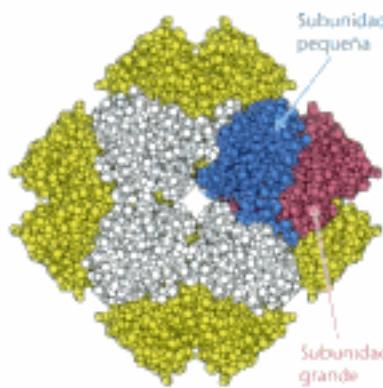
El cólera y la tosferina se deben a una actividad alterada de la proteína G

374

401

Parte II Transducción y almacenamiento de la energía	
Capítulo 15 Metabolismo: conceptos básicos y visión de conjunto	409
15.1 El metabolismo está constituido por muchas reacciones acopladas e interconectadas	410
El metabolismo consta de reacciones que liberan energía y reacciones que la requieren	410
Una reacción termodinámicamente favorable puede dirigir otra desfavorable	411
15.2 El ATP es la divisa universal de energía libre en los sistemas biológicos	412
La hidrólisis del ATP es exergónica	412
La hidrólisis del ATP dirige el metabolismo desplazando el equilibrio de las reacciones acopladas	413
El elevado potencial de grupos fosforilo del ATP se debe a diferencias estructuradas entre el ATP y sus productos de hidrólisis	415
El potencial de transferencia de fosforilos es una forma importante en la transformación de la energía celular	416
15.3 La oxidación de las moléculas carbonadas es una fuente importante de energía celular	417
Los compuestos de alto potencial de transferencia de fosforilos pueden acoplar la oxidación del carbono con la síntesis de ATP	418
Los gradientes de iones a través de membranas proporcionan una forma importante de energía celular que puede acoplarse con la síntesis de ATP	418
La energía de los alimentos se extrae en tres etapas	419
15.4 Las vías metabólicas presentan muchos motivos recurrentes	420
Los transportadores activados son un ejemplo del diseño modular y de la economía del metabolismo	420
Muchos de los transportadores activados son derivados de vitaminas	423
Las reacciones clave se repiten a lo largo del metabolismo	425
Los procesos metabólicos se regulan de tres formas principales	428
Hay aspectos del metabolismo que pueden haber evolucionado a partir del mundo del RNA	429
Capítulo 16 Glicolisis y gluconeogénesis	433
La glucosa se genera a partir de los carbohidratos de la dieta	434
La glucosa es un combustible importante para la mayoría de los organismos	435
16.1 En muchos organismos la glicolisis es una vía de conversión de energía	435
La hexoquinasa retiene la glucosa en la célula y comienza la glicolisis	435
La fructosa 1,6-bisfosfato se forma a partir de glucosa 6-fosfato	437
El azúcar de seis carbonos se escinde en dos fragmentos de tres carbonos	438
Mecanismo: la triosa fosfato isomerasa recupera un fragmento de tres carbonos	439
La oxidación de un aldehído hasta un ácido potencia la formación de un compuesto con un alto potencial de transferencia del fosforilo	440
Mecanismo: la fosforilación está acoplada a la oxidación del glicerolaldehído 3-fosfato por medio de un tioéster intermedio	442
El ATP se forma por transferencia de fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato	443
Se genera otro ATP con la formación de piruvato	444
En la conversión de glucosa en piruvato se forman dos moléculas de ATP	446
El NAD ⁺ se regenera mediante el metabolismo del piruvato	446
Las fermentaciones aportan energía utilizable en ausencia de oxígeno	448
El centro de unión del NAD ⁺ es similar en muchas deshidrogenasas	448
La fructosa y la galactosa se convierten en intermediarios de la glicolisis	449
Muchos adultos son intolerantes a la leche porque tienen una deficiencia de lactasa	451
Cuando falta la transferasa, la galactosa resulta muy tóxica	451
16.2 La vía glicolítica está rigurosamente controlada	452
La glicolisis en el músculo está regulada para satisfacer las necesidades de ATP	452
La regulación de la glicolisis en el hígado refleja la versatilidad bioquímica de esa víscera	455
Una familia de transportadores posibilita la entrada y salida de glucosa en las células animales	456
El cáncer y el ejercicio continuado afectan a la glicolisis de forma semejante	457
16.3 La glucosa puede sintetizarse a partir de precursores no carbohidratados	458
La gluconeogénesis no es la simple inversión de la glicolisis	460
La conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato comienza con la formación de oxalacetato	461
El oxalacetato se transporta al citoplasma y se convierte en fosfoenolpiruvato	462
La conversión de fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato y ortofosfato es un paso irreversible	463
La generación de glucosa libre es un importante punto de control	463
En la síntesis de glucosa a partir de piruvato se consumen seis enlaces fosfato de alta energía	464
16.4 La gluconeogénesis y la glicolisis se regulan de forma reciproca	464
La carga energética va a determinar si será más activa la glicolisis o la gluconeogénesis	465

El balance entre la glicolisis y la gluconeogénesis en el hígado es sensible a la concentración sanguínea de glucosa	466	Capítulo 18 Fosforilación oxidativa	502
Los ciclos de sustrato amplifican las señales metabólicas y producen calor	467	La fosforilación oxidativa acopla la oxidación de combustibles de carbono a la síntesis de ATP con un gradiente de protones	502
El lactato y la alanina formados en el músculo en contracción son utilizados por otros órganos	468	18.1 La fosforilación oxidativa en eucariotas tiene lugar en las mitocondrias	503
La glicolisis y la gluconeogénesis están entrecruzadas evolutivamente	469	Las mitocondrias están delimitadas por una membrana doble	503
Capítulo 17 El ciclo del ácido cítrico	475	Las mitocondrias son el resultado de un proceso endosimbiótico	504
El ciclo del ácido cítrico aporta electrones de alta energía	476	18.2 La fosforilación oxidativa depende de la transferencia de electrones	506
17.1 La piruvato deshidrogenasa conecta la glicolisis con el ciclo del ácido cítrico	477	El potencial de transferencia electrónica de un electrón se mide como potencial redox	506
Mecanismo: la síntesis de acetilcoenzima A a partir del piruvato requiere tres enzimas y cinco coenzimas.	478	Una diferencia de potencial de 1,14 voltios entre el NADH y el oxígeno molecular impulsa el transporte de electrones a través de la cadena y permite la formación de un gradiente de protones	508
Los enlaces flexibles permiten a la lipoamida desplazarse entre distintos centros activos	480	18.3 La cadena respiratoria está formada por cuatro complejos: tres bombas de protones y una conexión física con el ciclo del ácido cítrico	509
17.2 El ciclo del ácido cítrico oxida unidades de dos carbonos	482	Los electrones de alto potencial del NADH entran en la cadena respiratoria por la NADH-Q oxidoreductasa	510
La citrato sintasa produce citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA	482	El ubiquinol es el punto de entrada para los electrones procedentes del FADH ₂ de las flavoproteínas	512
Mecanismo: el mecanismo de la citrato sintasa evita que se produzcan reacciones no deseadas	482		512
El citrato se isomeriza a isocitrato	484	Los electrones fluyen desde el ubiquinol al citocromo c a través de la Q-citocromo c oxidoreductasa	512
El isocitrato se oxida y descarboxila hasta α-cetoglutarato	484	El ciclo Q canaliza los electrones desde un transportador de dos electrones a uno de un electrón y bombea protones	513
Por la descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato se forma succinil-coenzima A	485	La citocromo c oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua	514
A partir del succinil-coenzima A se genera un compuesto con alto potencial de transferencia de grupos fosfato	485	Los derivados tóxicos del oxígeno molecular como el radical superóxido se neutralizan mediante enzimas protectores	517
Mecanismo: la succinil-CoA sintetasa transforma los tipos de energía bioquímica	486	Los electrones se pueden transferir entre grupos que no están en contacto	519
El oxalacetato se regenera por oxidación del succinato	487	La conformación del citocromo c ha permanecido prácticamente constante durante más de mil millones de años	520
El ciclo del ácido cítrico produce electrones con alto potencial de transferencia, GTP y CO ₂	488	18.4 Un gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP	520
17.3 La entrada en el ciclo del ácido cítrico y sus reacciones están controladas	490	La ATP sintasa está formada por una unidad transportadora de protones y una unidad catalítica	522
El complejo piruvato deshidrogenasa se regula alostéricamente mediante fosforilación reversible	490	El flujo de protones a través de la ATP sintasa provoca la liberación del ATP fuertemente unido: el mecanismo de cambio de unión	523
El ciclo del ácido cítrico está controlado en varios puntos	492		
17.4 El ciclo del ácido cítrico es una fuente de precursores biosintéticos	493		
El ciclo del ácido cítrico debe ser capaz de reponerse con rapidez	493		
La interrupción del metabolismo del piruvato es la causa del beriberi y del envenenamiento por mercurio y arsénico	494		
El ciclo del ácido cítrico puede haber evolucionado a partir de vías preexistentes	495		
17.5 El ciclo del glicoxilato permite a las plantas y bacterias crecer en acetato	495		

Catálisis rotacional en el motor molecular más pequeño del mundo	524	19.4 El gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide conduce la síntesis de ATP	553
El flujo de protones alrededor del anillo e impulsa la síntesis de ATP	525	La ATP sintasa de los cloroplastos se parece mucho a la mitocondrial y a la procariótica	554
La ATP sintasa y las proteínas G tienen varias características comunes	527	El flujo cíclico de electrones a través del fotosistema I da lugar a la producción de ATP en vez de NADPH	555
18.5 Muchas lanzaderas permiten el movimiento a través de las membranas mitocondriales	527	La absorción de ocho fotones produce una molécula de O ₂ , dos moléculas de NADPH y tres de ATP	556
Los electrones del NADH citoplasmático entran en las mitocondrias mediante lanzaderas	527	19.5 Los pigmentos auxiliares canalizan la energía hacia los centros de reacción	557
La entrada del ADP en las mitocondrias está acoplada a la salida del ATP por medio de la ATP-ADP translocasa	529	La transferencia de energía por resonancia permite que ésta se desplace del lugar inicial de absorción al centro de reacción	557
Los transportadores mitocondriales de metabolitos tienen una estructura tripartita común	530	Los complejos captadores de luz contienen clorofilas y carotenoides auxiliares	558
18.6 La regulación de la respiración celular está gobernada en primera instancia por la necesidad de ATP	530	Los componentes de la fotosíntesis están muy organizados	559
La oxidación completa de la glucosa origina aproximadamente 30 moléculas de ATP	531	Muchos herbicidas inhiben las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis	560
La velocidad de la fosforilación oxidativa está determinada por las necesidades de ATP	532	19.6 La capacidad de transformar la energía luminosa en energía química es muy antigua	560
El desacoplamiento regulado provoca la generación de calor	532	Capítulo 20 El ciclo de Calvin y la vía de las pentosas fosfato	565
La fosforilación oxidativa se puede inhibir en muchos de sus pasos	533	20.1 El ciclo de Calvin sintetiza hexosas a partir de dióxido de carbono y agua	566
Se están descubriendo enfermedades mitocondriales	534	El dióxido de carbono reacciona con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato	567
Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la apoptosis	535	 A 3D ribbon diagram of the Rubisco enzyme. It consists of two large, yellow-green subunits arranged in a circular, bowl-like shape. In the center, there is a smaller, blue and red subunit complex. A label 'Subunidad pequeña' points to the blue/red part, and another label 'Subunidad grande' points to one of the yellow-green subunits.	
La transmisión de energía mediante gradientes de protones es un concepto clave en la Bioenergética	535		
Capítulo 19 Las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis	541		
La fotosíntesis transforma la energía lumínica en energía química	542		
19.1 La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos	542		
Los procesos iniciales de la fotosíntesis tienen lugar en las membranas tilacoidiales	543		
Los cloroplastos aparecieron en un proceso endosimbiótico	543		
19.2 La absorción de la luz por la clorofila induce la transferencia de electrones	544		
Un par especial de clorofilas inicia la separación de cargas	545		
El flujo cíclico de electrones reduce al citocromo del centro de reacción	547		
19.3 En la fotosíntesis productora de oxígeno, dos fotosistemas generan un gradiente de protones y NADPH	548		
El fotosistema II transfiere electrones del agua a la plastoquinona y genera un gradiente de protones	548	La actividad de la rubisco depende del magnesio y el carbamato	568
El citocromo <i>b</i> / <i>f</i> conecta el fotosistema II al fotosistema I	551	Una imperfección catalítica: la rubisco también cataliza una reacción oxigenasa inútil	569
El fotosistema I utiliza la energía de la luz para generar ferredoxina reducida, un potente reductor	551	A partir del fosfoglicerato se obtienen hexosas fosfato y se regenera la ribulosa 1,5-bisfosfato	570
La ferredoxina-NADP ⁺ reductasa convierte el NADP ⁺ en NADPH	552	Para conducir el dióxido de carbono al nivel de una hexosa se utilizan tres moléculas de ATP y dos de NADPH	572
		El almidón y la sacarosa son los principales carbohidratos almacenados en las plantas	573

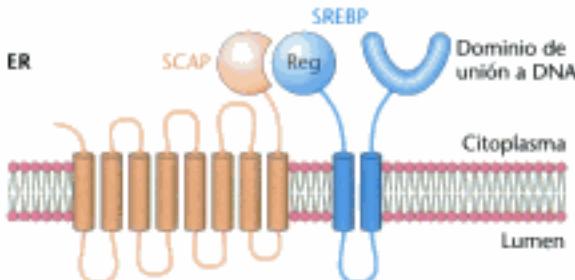
20.2 La actividad del ciclo de Calvin depende de las condiciones ambientales	574	21.2 La fosforilasa se regula por interacciones alostéricas y por fosforilación reversible	598
La rubisco se activa mediante los cambios en las concentraciones de protones e ion magnesio inducidos por la luz	574	La fosforilasa de músculo se regula por la carga energética intracelular	598
La tiorredoxina desempeña un papel clave en la regulación del ciclo de Calvin	574	La fosforilasa de hígado genera glucosa para su uso en otros tejidos	600
La vía C ₄ de las plantas tropicales acelera la fotosíntesis al concentrar el dióxido de carbono	575	La fosforilasa quinasa se activa por fosforilación y por los iones calcio	600
El metabolismo ácido de las crasuláceas les permite crecer en ecosistemas áridos	577		
20.3 La vía de las pentosas fosfato genera NADPH y sintetiza azúcares de cinco carbonos	577	21.3 La adrenalina y el glucagón indican la necesidad de degradar el glucógeno	601
En la conversión de glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato se generan dos moléculas de NADPH	577	Las proteínas G transmiten la señal para el inicio de la degradación del glucógeno	601
La vía de las pentosas fosfato y la glicolisis están relacionadas por la transacetolasa y la transaldolasa	579	La degradación del glucógeno debe desactivarse rápidamente cuando resulte necesario	603
Mecanismo: la transacetolasa y la transaldolasa estabilizan intermediarios carbaníonicos utilizando mecanismos distintos	581	La regulación de la glucógeno fosforilasa se hizo más compleja a medida que el enzima evolucionó	604
20.4 El metabolismo de la glucosa 6-fosfato a través de la vía de las pentosas fosfato está coordinado con la glicolisis	583	21.4 El glucógeno se sintetiza y degrada por vías diferentes	604
La actividad de la vía de las pentosas fosfato está controlada por el nivel de NADP ⁺	583	La UDP-glucosa es una forma activada de la glucosa	604
El flujo de glucosa 6-fosfato depende de las necesidades de NADPH, ribosa 5-fosfato y ATP	583	La glucógeno sintasa cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-glucosa a una cadena en crecimiento	605
A través del espejo: el ciclo del Calvin y la vía de las pentosas fosfato son imágenes especulares	585	Un enzima ramificante forma los enlaces α-1,6	606
20.5 La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa desempeña un papel clave en la protección frente a las especies reactivas del oxígeno	586	La glucógeno sintasa es el enzima regulador clave en la síntesis de glucógeno	607
La deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa origina un tipo de anemia hemolítica inducida por fármacos	586	El glucógeno es una forma eficiente de almacenamiento de glucosa	607
En ocasiones, una deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa puede ser una ventaja evolutiva	587		
Capítulo 21 Metabolismo del glucógeno	592	21.5 La degradación y la síntesis del glucógeno se regulan reciprocamente	607
El metabolismo del glucógeno consiste en la liberación y el almacenamiento de glucosa de forma regulada	593	La proteína fosfatasa 1 invierte los efectos reguladores de las quinasas en el metabolismo del glucógeno	608
21.1 La degradación del glucógeno requiere la intervención de varios enzimas	593	La insulina estimula la síntesis del glucógeno al inactivar a la glucógeno sintasa quinasa	610
La fosforilasa cataliza la escisión fosforolítica del glucógeno para dar glucosa 1-fosfato	594	El metabolismo del glucógeno en el hígado regula el nivel de glucosa en sangre	610
Para la degradación del glucógeno se necesita también un enzima desramificante	594	Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno pueden entenderse en términos bioquímicos	611
La fosfoglucomutasa convierte la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato	595		
El hígado contiene glucosa 6-fosfatasa, un enzima hidrolítico ausente en el músculo	596		
Mecanismo: el piridoxal fosfato participa en la escisión fosforolítica del glucógeno	596		
		Capítulo 22 Metabolismo de los ácidos grasos	617
		La degradación y la síntesis de los ácidos grasos consisten básicamente en reacciones químicas opuestas	618



22.1 Los triacilgliceroles son depósitos de energía muy concentrada	619	22.5 La acetil-coenzima A carboxilasa ejerce una función esencial en el control del metabolismo de los ácidos grasos	640
Los lípidos de la dieta se digieren mediante las lipasas pancreáticas	619	La acetil-CoA carboxilasa se regula por las condiciones de la célula	640
Los lípidos de la dieta se transportan en los quilomicrones	620	La acetil-CoA carboxilasa se regula por diversas hormonas	641
22.2 La utilización de los ácidos grasos como combustible requiere un procesamiento de tres etapas	621	22.6 La elongación y la insaturación de los ácidos grasos se realizan por sistemas enzimáticos accesorios	642
Los triacilgliceroles se hidrolizan por una lipasa estimulada por hormonas	621	Enzimas unidas a membranas generan ácidos grasos insaturados	642
Los ácidos grasos se unen al coenzima A antes de oxidarse	622	Las hormonas eicosanoides derivan de ácidos grasos poliinsaturados	643
La carnitina transporta los ácidos grasos de cadena larga activados hasta la matriz mitocondrial	623	Capítulo 23 Recambio de las proteínas y catabolismo de los aminoácidos	649
En cada ciclo de la oxidación de los ácidos grasos se genera acetil-CoA, NADH y FADH ₂	624	23.1 Las proteínas se degradan a aminoácidos	650
La oxidación completa del palmitato proporciona 106 moléculas de ATP	625	La digestión de las proteínas de la dieta comienza en el estómago y se completa en el intestino	650
22.3 Los ácidos grasos insaturados o con cadena impar requieren etapas adicionales de degradación	626	Las proteínas celulares se degradan a velocidades diferentes	651
Para la oxidación de los ácidos grasos insaturados se requiere una isomerasa y una reductasa	626	23.2 El recambio proteico está estrechamente regulado	651
Los ácidos grasos de cadena impar producen propionil-coenzima A en la tiolisis del último ciclo de oxidación	627	La ubiquitina etiqueta a las proteínas para su destrucción	651
La vitamina B ₁₂ contiene un anillo de corriña y un átomo de cobalto	628	El proteasoma digiere las proteínas marcadas con ubiquitina	653
Mecanismo: la metilmalonil-CoA mutasa cataliza el reordenamiento que genera succinil-CoA	629	La degradación de las proteínas puede utilizarse para regular funciones biológicas	654
Los ácidos grasos también se oxidan en los peroxisomas	630	La vía de la ubiquitina y el proteasoma tienen sus equivalentes procarióticos	655
Si predomina la degradación de las grasas, se forman cuerpos cetónicos a partir del acetil-coenzima A	631	23.3 El primer paso en la degradación de aminoácidos es la eliminación del nitrógeno	656
Los cuerpos cetónicos son un combustible importante en ciertos tejidos	632	Los grupos alfa-amino se convierten en ion amonio por desaminación oxidativa del glutamato	656
Los animales no pueden convertir los ácidos grasos en glucosa	634	Mecanismo: en las aminotransferasas, el piridoxal fosfato forma bases de Schiff intermedias	657
22.4 Los ácidos grasos se sintetizan y se degradan por vías diferentes	635	La aspartato aminotransferasa es un ejemplo de transaminasa dependiente de piridoxal	659
La formación de malonil-coenzima A es la etapa limitante en la síntesis de ácidos grasos	635	Los enzimas dependientes de piridoxal fosfato catalizan un amplio espectro de reacciones	659
Los intermediarios en la síntesis de los ácidos grasos están unidos a una proteína portadora de acilos	635	La serina y la treonina pueden desaminarse directamente	660
La síntesis de ácidos grasos consiste en la repetición de una serie de reacciones de condensación, reducción, deshidratación y reducción	636	Los tejidos periféricos transportan el nitrógeno al hígado	660
En los animales los ácidos grasos se sintetizan a partir de un complejo enzimático multifuncional	637	23.4 En la mayoría de los vertebrados terrestres el ion amonio se convierte en urea	661
La síntesis de palmitato requiere 8 moléculas de acetil-CoA, 14 moléculas de NADPH y 7 de ATP	638	El ciclo de la urea comienza con la formación de carbamilfosfato	661
El citrato transporta grupos acetilos desde la mitocondria hasta el citoplasma para la síntesis de los ácidos grasos	638	El ciclo de la urea está ligado a la gluconeogénesis	663
Diversas fuentes suministran NADPH para la síntesis de ácidos grasos	639	Los enzimas del ciclo de la urea están relacionados evolutivamente con enzimas presentes en otras vías metabólicas	664
Los inhibidores de la ácido graso sintasa pueden ser fármacos útiles	639		

Defectos hereditarios del ciclo de la urea producen hiperamonemia y pueden ocasionar lesiones cerebrales	664	El glutamato es el precursor de glutamina, prolina y arginina	688
La urea no es la única manera de eliminar el exceso de nitrógeno	666	El 3-fosfoglicerato es el precursor de serina, cisteína y glicina	688
23.5 Los átomos de carbono de los aminoácidos degradados aparecen en los principales intermediarios metabólicos	666	El tetrahidrofolato transporta fragmentos monocarbonados activados con diversos grados de oxidación	689
El piruvato es el punto de entrada al metabolismo de muchos aminoácidos	666	La S-adenosilmetionina es el principal dador de grupos metilo	691
El oxalacetato es el punto de entrada al metabolismo para el aspartato y la asparragina	668	La cisteína se sintetiza a partir de serina y homocisteína	693
El α -cetoglutarato es el punto de entrada al metabolismo para los aminoácidos de cinco átomos de carbono	668	Existe una correlación entre niveles elevados de homocisteína y enfermedades vasculares	693
El succinil-coenzima A es el punto de entrada para varios aminoácidos no polares	668	El quirimato y el corismato son intermediarios en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos	693
La degradación de la metionina requiere la formación de un donante de metilos clave, la S-adenosilmetionina	669	La triptófano sintetasa ilustra la canalización de sustratos durante la catálisis enzimática	696
Los aminoácidos de cadena ramificada originan acetil-CoA, acetacetato y propionil-CoA	670	24.3 La biosíntesis de aminoácidos está regulada por retroinhibición	697
Para la degradación de los aminoácidos aromáticos se requieren oxigenasas	671	Las vías ramificadas requieren una regulación compleja	697
23.6 Los errores innatos del metabolismo pueden alterar la degradación de los aminoácidos	672	La actividad de la glutamina sintetasa está modulada por una cascada enzimática	699
Parte III Síntesis de las moléculas de la vida		24.4 Los aminoácidos son los precursores de muchas biomoléculas	700
Capítulo 24 Biosíntesis de aminoácidos	679	El glutatión, un γ -glutamil-péptido, actúa como amortiguador de sulfhidrilos y como antioxidante	701
La síntesis de aminoácidos requiere soluciones para tres problemas bioquímicos fundamentales	680	El óxido nítrico, una molécula mensajera de vida media muy breve, se forma a partir de la arginina	702
24.1 Fijación del nitrógeno: los microorganismos utilizan ATP y un potente reductor para reducir el nitrógeno atmosférico a amoniaco	680	Las porfirinas se sintetizan a partir de glicina y succinil-coenzima A	702
El cofactor hierro-molibdeno de la nitrogenasa se une al nitrógeno atmosférico y lo reduce	681	Algunos trastornos congénitos del metabolismo de la porfirina provocan su acumulación	704
El ion amonio se incorpora a un aminoácido por medio de glutamato y glutamina	683	Capítulo 25 Biosíntesis de nucleótidos	709
24.2 Los aminoácidos se construyen a partir de intermediarios del ciclo del ácido cítrico y de otras vías importantes	685	Los nucleótidos se pueden sintetizar mediante vías <i>de novo</i> o mediante vías de recuperación	710
Los seres humanos pueden sintetizar algunos aminoácidos pero deben obtener el resto a partir de la dieta	685	25.1 En la síntesis de <i>de novo</i>, el anillo de pirimidina se construye a partir de bicarbonato, aspartato y glutamina	710
El aspartato, la alanina y el glutamato se forman mediante la adición de un grupo amino a un α -cetoácido	686	El bicarbonato y otros compuestos de carbono oxigenados se activan por fosforilación	711
Una etapa común determina la quiralidad de todos los aminoácidos	686	La cadena lateral de la glutamina se puede hidrolizar para generar amoniaco	711
La formación de asparragina a partir de aspartato requiere un intermediario adenilado	687	Los intermediarios se pueden desplazar entre los centros activos por canalización	711
		El orotato incorpora un anillo de ribosa del PRPP para formar un nucleótido de pirimidina, que se convierte en uridilato	712
		Los nucleótidos mono, di y trifosfato son interconvertibles	713
		La CTP se forma mediante aminación de UTP	713

25.2 Las bases púricas se pueden sintetizar de novo o se pueden reciclar mediante vías de recuperación	714	Los esfingolípidos confieren diversidad a la estructura y función de los lípidos	738
Las vías de recuperación disminuyen el gasto de energía intracelular	714	El síndrome de la dificultad respiratoria y la enfermedad de Tay-Sachs son resultado de trastornos del metabolismo lipídico	738
El sistema de anillos de la purina se ensambla sobre la ribosa fosfato	714		
El anillo de purina se ensambla mediante etapas sucesivas en las que la activación por fosforilación va seguida de una sustitución	715		
El AMP y el GMP se forman a partir de IMP	717		
25.3 Los desoxirribonucleótidos se sintetizan por reducción de ribonucleótidos mediante un mecanismo en el que intervienen radicales	718	26.2 El colesterol se sintetiza a partir de acetil-coenzima A en tres etapas	739
Mecanismo: un radical tirosilo es fundamental para la actividad de la ribonucleótido reductasa	718	La síntesis de mevalonato, que se activa a isopentenilpirofosfato, inicia la síntesis de colesterol	739
El timidilato se forma por metilación del desoxiuridilato	720	El escualeno (C_{30}) se sintetiza a partir de seis moléculas de isopentenilpirofosfato (C_5)	740
La dihidrofolato reductasa cataliza la regeneración del tetrahidrofolato, un transportador de fragmentos monocarbonados	721	El escualeno se cicla para formar colesterol	741
Varios fármacos anticancerígenos eficaces bloquean la síntesis de timidilato	722	26.3 La compleja regulación de la biosíntesis del colesterol tiene lugar a varios niveles	742
25.4 Las etapas clave de la biosíntesis de nucleótidos se regulan mediante retroinhibición	723	Las lipoproteínas transportan colesterol y triacilgliceroles por todo el organismo	743
La biosíntesis de la pirimidina se regula mediante la aspartato transcarbamila	723		
La síntesis de los nucleótidos de purina se controla por retroinhibición en varios lugares	723		
La síntesis de desoxirribonucleótidos se controla mediante la regulación de la ribonucleótido reductasa	724		
25.5 Alteraciones en el metabolismo de los nucleótidos pueden provocar situaciones patológicas	725		
La pérdida de la actividad adenosina desaminasa provoca una inmunodeficiencia combinada grave	725	Las concentraciones sanguíneas de ciertas lipoproteínas pueden ser útiles para el diagnóstico	745
La gota está provocada por niveles elevados de urato en sangre	726	Las lipoproteínas de baja densidad desempeñan un papel clave en el metabolismo del colesterol	745
El síndrome de Lesch-Nyhan es una dramática consecuencia de las mutaciones en un enzima de las vías de recuperación	726	El receptor de LDL es una proteína transmembrana con seis regiones funcionales diferentes	746
La carencia de ácido fólico provoca defectos congénitos como la espina bífida	727	La carencia del receptor de LDL origina hipercolesterolemia y aterosclerosis	747
Capítulo 26 Biosíntesis de lípidos de membrana y de esteroides	732	El mantenimiento clínico de las concentraciones de colesterol puede comprenderse a nivel bioquímico	748
26.1 El fosfatidato es un intermediario común en la síntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles	733	26.4 Entre los derivados importantes del colesterol se incluyen las sales biliares y las hormonas esteroideas	748
La síntesis de fosfolípidos requiere un intermediario activado	734	Los anillos de los esteroides se identifican con letras y los átomos de carbono, con números	750
Los esfingolípidos se sintetizan a partir de ceramida	736	Los esteroides se hidroxilan mediante las citocromo P450 monooxigenasas que utilizan NADPH y O_2	750
Los gangliósidos son esfingolípidos ricos en carbohidratos que contienen azúcares ácidos	738	El sistema citocromo P450 es omnipresente y realiza una función de protección	751
		La pregnenolona, un precursor de otros muchos esteroides, se forma a partir del colesterol por ruptura de su cadena lateral	752
		La progesterona y los corticosteroides se sintetizan a partir de la pregnenolona	752
		Los andrógenos y los estrógenos se sintetizan a partir de pregnenolona	753

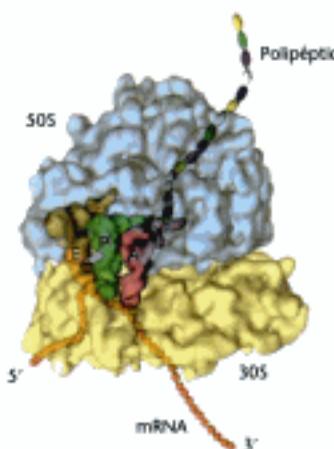


La vitamina D deriva del colesterol por la acción de la luz que rompe uno de sus anillos	754	Las topoisomerasas preparan a la doble hélice para su desenrollamiento	790
Capítulo 27 Integración del metabolismo	760	Las topoisomerasas de tipo I relajan estructuras superenrolladas	790
27.1 El metabolismo consta de vías metabólicas fuertemente interconectadas	761	Las topoisomerasas de tipo II pueden introducir superenrollamientos negativos acoplándolos a la hidrólisis del ATP	791
En la regulación metabólica se repiten determinados mecanismos recurrentes	761	28.3 La replicación del DNA tiene lugar por la polimerización de desoxirribonucleósidos trifosfato a lo largo de un molde	793
Las principales vías metabólicas tienen centros de control específicos	762	Las DNA polimerasas necesitan un molde y un cebador	793
La glucosa 6-fosfato, el piruvato y el acetil-CoA son las conexiones clave del metabolismo	765	Todas las DNA polimerasas presentan características estructurales comunes	793
27.2 Cada órgano tiene un perfil metabólico característico	766	En la reacción de la polimerasa intervienen dos iones metálicos unidos	794
27.3 La toma de alimento y el ayuno inducen cambios metabólicos	770	La especificidad de la replicación está determinada por la complementariedad de formas de las bases	794
Las adaptaciones metabólicas al ayuno prolongado reducen al mínimo la degradación de proteínas	772	Un cebador de RNA sintetizado por la primasa permite el comienzo de la síntesis de DNA	795
Los desajustes metabólicos en la diabetes derivan de una relativa deficiencia de insulina y exceso de glucagón	773	Una de las hebras del DNA se sintetiza de forma continua mientras que la otra se sintetiza a base de fragmentos	796
La homeostasis calórica es una forma de regular el peso corporal	774	La DNA ligasa une los extremos del DNA en regiones de doble hebra	796
27.4 La selección de combustibles durante el ejercicio viene determinada por la intensidad y la duración de la actividad	775	La separación de las hebras del DNA requiere helicasas específicas y la hidrólisis de ATP	797
27.5 El etanol altera el metabolismo energético del hígado	777	28.4 La replicación del DNA exige una extremada coordinación	798
El metabolismo del etanol origina un exceso de NADH	777	La replicación del DNA requiere polimerasas con un elevado nivel de progresividad	798
El consumo excesivo de etanol interfiere en el metabolismo de las vitaminas	778	Las hebras guía y retardada se sintetizan de forma coordinada	799
Capítulo 28 Replicación, reparación y recombinación del DNA	783	La replicación del DNA en <i>Escherichia coli</i> comienza por un sitio único	801
28.1 El DNA puede adoptar diversas formas estructurales	784	La síntesis del DNA en eucariotas comienza en múltiples sitios	802
El DNA-A es una doble hélice más corta y más ancha que la del DNA-B, la forma más frecuente	784	Los telómeros son estructuras características de los extremos de cromosomas lineales	803
Los surcos mayor y menor están recubiertos por grupos capaces de formar puentes de hidrógeno	785	Los telómeros se replican mediante la telomerasa, una polimerasa especializada que lleva su propio molde de RNA	804
El estudio de cristales de DNA puso de manifiesto variaciones locales en la estructura del DNA	786	28.5 Se pueden reparar muchos tipos de lesiones en el DNA	804
El DNA-Z es una doble hélice levógira en la que los fosfatos se disponen en forma de zigzag a lo largo del esqueleto del polinucleótido	787	Pueden aparecer errores en la replicación del DNA	804
28.2 El DNA de doble hebra se puede enrollar sobre sí mismo para formar estructuras superenrolladas	788	Algunas enfermedades genéticas se deben a la expansión de repeticiones de tres nucleótidos	805
El número de enlace del DNA, una propiedad topológica, determina el grado de superenrollamiento	789	Las bases se pueden lesionar por agentes oxidantes, agentes alquilantes y la luz	805
		Las lesiones en el DNA pueden detectarse y repararse mediante una gran diversidad de sistemas	807
		En el DNA, la presencia de timina en lugar de uracilo permite la reparación de las citosinas desaminadas	809
		Muchos tipos de cáncer se deben a una reparación defectuosa del DNA	810
		Muchos carcinógenos potenciales se pueden detectar por su acción mutagénica en bacterias	811

28.6 La recombinación del DNA desempeña importantes funciones en la replicación, reparación y otros procesos	812	Al producto de la RNA polimerasa II, el transcripto pre-mRNA, se le añade un capuchón en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3'	840
La proteína RecA puede iniciar la recombinación promoviendo una invasión de hebra	812	La corrección del RNA introduce cambios en las proteínas codificadas por el mRNA	842
Algunas reacciones de recombinación se realizan a través de intermediarios con uniones de Holliday	813	En los precursores del mRNA, las secuencias situadas en los extremos de los intrones especifican los lugares de corte y empalme	843
Algunas recombinasas están relacionadas evolutivamente con las topoisomerasas	814	El corte y empalme consiste en dos reacciones de transesterificación secuenciales	843
Capítulo 29 Síntesis y maduración del RNA	821	En los espliceosomas, los RNAs nucleares pequeños catalizan la maduración de los precursores del mRNA	844
La síntesis del RNA consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación	822	La transcripción y la maduración del mRNA están acopladas	846
29.1 La transcripción está catalizada por la RNA polimerasa	823	Las mutaciones que afectan a la maduración del pre-mRNA provocan enfermedades	847
Para iniciar la transcripción, la RNA polimerasa se une a los centros promotores del DNA molde	824	La mayor parte de los pre-mRNAs humanos pueden madurar de formas alternativas para producir proteínas diferentes	847
La subunidad sigma de la RNA polimerasa reconoce los centros promotores	825	29.4 El descubrimiento del RNA catalítico resultó esclarecedor tanto desde el punto de vista del mecanismo como de la evolución	848
Para que tenga lugar la transcripción, la RNA polimerasa debe desenrollar la doble hélice del DNA molde	827		
Las cadenas de RNA se forman a partir de cero y crecen en el sentido 5' → 3'	827	Capítulo 30 Síntesis de proteínas	857
La elongación tiene lugar en burbujas de transcripción que se desplazan a lo largo del DNA molde	828	30.1 La síntesis de proteínas requiere la traducción de secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos	858
Secuencias pertenecientes al RNA recién transcripto dan la señal para la terminación	829	La síntesis de proteínas largas requiere una frecuencia de error pequeña	858
En algunos genes, la proteína rho ayuda a terminar la transcripción	830	Las moléculas de RNA de transferencia tienen un diseño común	859
Algunos antibióticos inhiben la transcripción	831	El aminoácido activado y el anticodón del tRNA están en los extremos opuestos de la molécula con forma de L	861
En procariotas, los precursores del RNA de transferencia y ribosomal experimentan procesos de fragmentación y modificaciones químicas después de la transcripción	832		
29.2 En eucariotas, la transcripción está muy regulada	833	30.2 Las aminoacil-tRNA sintetasas interpretan el código genético	862
En las células eucariotas, el RNA se sintetiza mediante tres tipos de RNA polimerasas	834	Los aminoácidos se activan al comienzo por adenilación	862
En la región promotora de la RNA polimerasa II se pueden encontrar tres elementos comunes	836	Las aminoacil-tRNA sintetasas tienen lugares de activación muy selectivos para los aminoácidos	863
El complejo proteico TFIID inicia el ensamblaje del complejo de transcripción activo	836	La revisión hecha por las aminoacil-tRNA sintetasas aumenta la fidelidad en la síntesis de las proteínas.	864
Multitud de factores de transcripción interaccionan con los promotores eucarióticos	838	Las sintetasas reconocen diversos rasgos de las moléculas de RNA de transferencia	865
Las secuencias intensificadoras pueden estimular la transcripción en puntos de partida situados a miles de bases de distancia	838	Las aminoacil-tRNA sintetasas pueden dividirse en dos clases	865
29.3 Los productos de la transcripción de las tres polimerasas eucarióticas experimentan un proceso de maduración	839	30.3 Un ribosoma es una partícula ribonucleoproteica (70S) formada por una subunidad pequeña (30S) y otra grande (50S)	866
La RNA polimerasa I produce tres RNAs ribosómicos	839	Los RNAs ribosómicos (5S, 16S y 23S rRNAs) desempeñan un papel fundamental en la síntesis de las proteínas	867
La RNA polimerasa III produce el RNA de transferencia	840	Las proteínas se sintetizan en la dirección del extremo amínico al carboxílico	869

El RNA mensajero se traduce en la dirección de 5' a 3'

869



La señal de partida es AUG (o GUG) precedida por varias bases que se aparean con el rRNA de 16S
La síntesis de proteínas en las bacterias se inicia con el formilmetionil-RNA de transferencia
Los ribosomas tienen tres lugares de unión para los tRNAs conformados por las subunidades 30S y 50S
Cuando se forma del enlace peptídico, la cadena polipeptídica en crecimiento es transferida de un tRNA a otro.
Sólo las interacciones codón–anticodón determinan el aminoácido que se incorpora
Algunas moléculas de RNA de transferencia reconocen más de un codón a causa del balanceo en el apareamiento de las bases

870

871

871

872

873

874

875

876

876

876

877

878

879

880

880

882

30.7 Muchos antibióticos y toxinas pueden inhibir la síntesis de las proteínas

884

La toxina de la difteria bloquea la síntesis de proteínas en eucariotas al inhibir la translocación

885

La ricina es una N-glicosidasa que inhibe la síntesis de proteínas

885

Capítulo 31 El control de la expresión génica

892

31.1 Muchas de las proteínas que se unen al DNA reconocen secuencias específicas

893

El motivo hélice-giro-hélice es frecuente en muchas proteínas procarióticas que se unen al DNA

894

Las proteínas eucarióticas que se unen al DNA utilizan toda una gama de estructuras para unirse al DNA

895

31.2 En procariotas, las proteínas que se unen al DNA lo hacen, de forma específica, a los centros reguladores de los operones

896

Un operón está formado por elementos de regulación y por genes que codifican proteínas

897

En ausencia de lactosa, la proteína represora lac se une al operador y bloquea la transcripción

897

La unión de ligandos puede provocar cambios estructurales en proteínas reguladoras

898

En procariotas, el operón es una unidad de regulación habitual

899

La transcripción se puede estimular mediante proteínas que establecen contactos con la RNA polimerasa

900

31.3 La mayor complejidad de los genomas eucarióticos requiere mecanismos intrincados de regulación génica

901

En eucariotas, multitud de factores de transcripción interactúan con los centros de regulación

902

Los factores de transcripción eucarióticos son modulares

902

Los dominios de activación interactúan con otras proteínas

902

Los nucleosomas son complejos de DNA e histonas

903

El DNA eucariótico se enrolla en torno a las histonas para formar los nucleosomas

904

El control de la expresión génica puede requerir la reestructuración de la cromatina

905

Los centros intensificadores pueden estimular la transcripción en determinados tipos celulares

906

La metilación del DNA puede alterar los patrones de expresión génica

907

Los esteroides y otras moléculas hidrofóbicas similares atraviesan la membrana y se unen a receptores capaces de unirse al DNA

907

Los receptores nucleares de hormonas regulan la transcripción incorporando coactivadores al complejo de transcripción

909

Ciertos fármacos actúan sobre los receptores de hormonas esteroideas

910

La estructura de la cromatina se modula mediante modificaciones covalentes de las colas de las histonas	910	32.4 El oído depende de la detección rápida de estímulos mecánicos	937
Las desacetilasas de histonas contribuyen a reprimir la transcripción	912	Las células auditivas emplean un haz conectado de estereocilios para detectar movimientos muy pequeños	937
31.4 La expresión génica se puede controlar a niveles postranscripcionales	913	Se han identificado conductos mecanosensibles en <i>Drosophila</i> y vertebrados	939
En procariotas, la atenuación es un mecanismo que regula la transcripción modulando la estructura secundaria del RNA naciente	913	32.5 El tacto incluye la sensibilidad a la presión, a la temperatura y a otros factores	939
En animales, los genes relacionados con el metabolismo del hierro se regulan a nivel de la traducción	914	Estudios sobre la capsaicina, el principio activo de las guindillas, revelan la existencia de un receptor sensible a las altas temperaturas y otros estímulos dolorosos	940
		Quedan por estudiar otros sistemas sensoriales	941
Parte IV Respuestas a cambios ambientales			
Capítulo 32 Sistemas sensoriales	921	Capítulo 33 El sistema inmunitario	945
32.1 El olfato detecta una amplia variedad de compuestos orgánicos	922	Desde el punto de vista evolutivo, la inmunidad innata es un mecanismo de defensa ancestral	946
La capacidad olfativa está mediada por una familia extensa de receptores con siete hélices transmembrana	923	La respuesta del sistema inmunitario adaptativo utiliza los principios de la evolución	947
Las sustancias olorosas están codificadas por un mecanismo combinatorio	924	33.1 Los anticuerpos poseen dos unidades distintas: una que se une al antígeno y otra efectora	949
Imágenes obtenidas mediante resonancia magnética funcional revelan regiones del cerebro que procesan información sensorial	926	33.2 El plegamiento de inmunoglobulina está formado por un armazón con estructura de sándwich beta que contiene bucles hipervariables	952
32.2 El gusto se puede considerar una combinación de sentidos que funcionan a través de mecanismos diferentes	926	33.3 Los anticuerpos se unen a moléculas específicas por medio de sus bucles hipervariables	953
La secuenciación del genoma humano ha permitido el descubrimiento de una gran familia de receptores 7TM para el sabor amargo	927	Los estudios de rayos X han puesto de manifiesto cómo se unen los anticuerpos a los antígenos	953
Los compuestos dulces provocan una respuesta por parte de receptores heterodiméricos 7TM	929	Los antígenos grandes se unen a los anticuerpos por medio de numerosas interacciones	954
El umami, sabor del glutamato y del aspartato, se detecta por un receptor heterodimérico relacionado con el receptor del sabor dulce	930	33.4 La diversidad surge por los reordenamientos de los genes	956
Los sabores salados se detectan inicialmente por el paso de iones sodio a través de conductos iónicos	930	Los genes J (que juntan) y los genes D (que diversifican) aumentan la diversidad de anticuerpos	956
El sabor agrio procede de los efectos de los hidrogeniones (ácidos) en los conductos	931	Mediante la asociación combinatoria y la mutación somática se pueden generar más de 10^9 anticuerpos distintos	958
32.3 Las moléculas fotorreceptoras del ojo detectan la luz visible	931	La oligomerización de anticuerpos expresados en la superficie de células B inmaduras desencadena la secreción de anticuerpos	958
La rodopsina, un receptor 7TM especializado, absorbe la luz visible	932	Gracias a la translocación de los genes V_H se forman distintos tipos de anticuerpos	960
La absorción de la luz induce una isomerización específica del 11-cis-retinal unido	933	33.5 Las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad exponen antígenos peptídicos en la superficie de las células para que los receptores de las células T los reconozcan	961
La disminución de los niveles de calcio inducida por la luz coordina la recuperación	934	Los péptidos expuestos por las proteínas MHC ocupan un profundo surco flanqueado por hélices alfa	962
La visión en color está mediada por tres receptores en los conos, que son homólogos de la rodopsina	935	Los receptores de las células T son proteínas parecidas a los anticuerpos que presentan regiones variables y constantes	963
Redistribuciones en los genes de los pigmentos verde y rojo provocan la "ceguera a los colores"	936	El CD8 de las células T citotóxicas actúa de forma coordinada con los receptores de las células T	964

Las células T ayudantes estimulan a las células que exhiben péptidos foráneos unidos a proteínas MHC de clase II	965	Capítulo 35 Desarrollo de fármacos	1001
Las células T ayudantes dependen del receptor de las células T y de CD4 para reconocer péptidos foráneos en las células que presentan抗igenos	966	35.1 El desarrollo de fármacos requiere numerosas pruebas	1002
Las proteínas MHC son muy variadas	968	Los nuevos fármacos deben ser moduladores potentes de sus dianas	1002
Los virus de la inmunodeficiencia humana inutilizan el sistema inmunitario al destruir las células T ayudantes	969	Los fármacos deben poseer las propiedades adecuadas para llegar a sus dianas	1003
33.6 Las respuestas inmunitarias frente a antígenos propios se anulan	970	La toxicidad puede limitar la eficacia de un fármaco	1008
En el timo, las células T se someten a una selección positiva y a una selección negativa	970		
Las enfermedades autoinmunitarias surgen a partir de la generación de respuestas inmunitarias frente a antígenos propios	971		
El sistema inmunitario desempeña un papel en la prevención del cáncer	971		
Capítulo 34 Motores moleculares	977		
34.1 La mayoría de las proteínas de los motores moleculares son miembros de la superfamilia de las NTPasas con lazo P	978	35.2 Se pueden descubrir nuevos fármacos de forma fortuita, por análisis sistemático o mediante el diseño	1009
Un motor proteico está formado por un núcleo ATPasa y una estructura extendida	978	Las observaciones fortuitas pueden desembocar en el descubrimiento de fármacos	1009
La unión y la hidrólisis del ATP inducen cambios conformativos y de afinidad de unión en los motores proteicos	980	Las bibliotecas de análisis sistemáticos de compuestos pueden proporcionar fármacos o pistas farmacológicas	1011
34.2 Las miosinas se desplazan a lo largo de filamentos de actina	982	Se pueden diseñar fármacos a partir de la información estructural en tres dimensiones de sus dianas	1014
El músculo es un complejo de miosina y actina	982	35.3 El análisis del genoma es muy prometedor para el descubrimiento de fármacos	1017
La actina es un polímero polar, autoensamblable y dinámico	985	Se pueden identificar en el proteoma humano posibles dianas	1017
Los movimientos de las proteínas motrices aisladas se pueden observar directamente	986	Se pueden desarrollar modelos animales para ensayar la validez de posibles dianas farmacológicas	1018
La liberación de fosfato dispara al golpe de potencia de la miosina	987	Se pueden identificar dianas potenciales en los genomas de patógenos	1018
La longitud del brazo de palanca determina la velocidad del motor	988	Las diferencias genéticas influyen en las respuestas individuales a los fármacos	1019
34.3 La quinesina y la dineína se desplazan a lo largo de los microtúbulos	989	35.4 La preparación de nuevos medicamentos tiene lugar en varias etapas	1020
Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos	989	Los ensayos clínicos son muy lentos y caros	1020
El movimiento de la quinesina es altamente progresivo	991	El desarrollo de la resistencia a fármacos limita la utilidad de los medicamentos frente a agentes infecciosos y al cáncer	1021
34.4 El movimiento bacteriano se genera mediante un motor rotativo	993	Apéndices	A1
Las bacterias nadan mediante la rotación de sus flagelos	993	Glosario de compuestos	B1
La rotación de los flagelos bacterianos se genera por un flujo de protones	994	Respuestas a los problemas	C1
La quimiotaxis bacteriana depende de la inversión de la rotación flagelar	995	Índice alfabético	D1

Copyrighted material

La bioquímica: una ciencia en desarrollo



Las enfermedades y el genoma. Los estudios sobre el genoma humano están descubriendo los orígenes de las enfermedades y otros misterios bioquímicos. Los cromosomas humanos, a la izquierda, contienen las moléculas de DNA que constituyen el genoma humano. El patrón de tinción sirve para identificar regiones específicas de un cromosoma. A la derecha se muestra un diagrama del cromosoma humano 7 en el que la banda q31,2 se señala mediante una flecha. Un gen de esta región codifica una proteína cuya disfunción es responsable de la fibrosis quística. [(izquierda) Alfred Pasieka/ Peter Arnold.]

La bioquímica es la ciencia que estudia la química de los procesos vitales. Desde que en 1828 se descubrió que las moléculas biológicas, como la urea, se podían sintetizar a partir de componentes no vivos, los científicos han explorado la química de la vida con gran intensidad. Mediante estas investigaciones se han resuelto muchos de los misterios fundamentales del funcionamiento de los seres vivos a nivel bioquímico. Sin embargo, queda mucho por investigar. Es frecuente que cada descubrimiento plantee tantas cuestiones nuevas como las que resuelve. Además, vivimos en una época con oportunidades sin precedentes para poder aplicar nuestros enormes conocimientos de bioquímica a problemas propios de campos como la medicina, la odontología, la agricultura, la práctica forense, la antropología, las ciencias medioambientales y muchos otros. Empezamos nuestro viaje por la bioquímica con uno de los más llamativos descubrimientos del siglo pasado: la gran unidad bioquímica de todos los seres vivos.

Contenido

- 1.1 En la diversidad biológica subyace la unidad bioquímica
- 1.2 El DNA ilustra la relación entre forma y función
- 1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas
- 1.4 La revolución genómica está transformando la bioquímica y la medicina

1.1 En la diversidad biológica subyace la unidad bioquímica

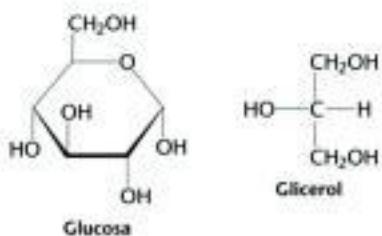
El mundo biológico es maravillosamente diverso. El reino animal es rico en especies que abarcan desde los insectos casi microscópicos hasta los elefantes y las ballenas. El reino vegetal incluye especies tan pequeñas y relativamente sencillas como las algas y otras tan grandes y complejas como las secuoyas gigantes. A diferencia de los animales, que necesitan comer para vivir, las plantas tienen la llamativa capacidad de

utilizar la luz solar para transformar el dióxido de carbono del aire en tejidos vivientes. Esta diversidad se hace aún mayor cuando descendemos al mundo microscópico. Los organismos unicelulares, tales como los protozoos, las levaduras y las bacterias, existen en gran diversidad en el agua, el suelo y sobre o dentro de organismos mayores. Algunos organismos incluso son capaces de sobrevivir y aun prosperar en entornos aparentemente hostiles tales como los manantiales termales o los glaciares.

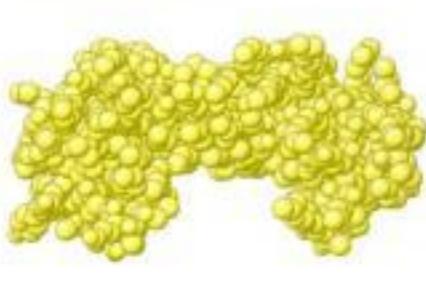
El microscopio ha revelado un aspecto clave unificador bajo esta diversidad: los organismos mayores están formados por *células*, que recuerdan, de algún modo, a los organismos microscópicos unicelulares.

El hecho de que los animales, las plantas y los microorganismos se constituyan por células sugiere que los distintos seres vivos pueden tener más en común de lo que aparentan por su aspecto externo. El desarrollo de la bioquímica ha refrendado y expandido esta hipótesis: todos los organismos tienen muchos aspectos bioquímicos comunes (Figura 1.1).

Tal como se ha mencionado, la bioquímica estudia la química de los procesos vitales. Estos procesos implican la interacción de dos clases diferentes de moléculas: las *macromoléculas biológicas*: moléculas grandes, como las proteínas y los ácidos nucleicos, y las llamadas *metabolitos*: moléculas de bajo peso molecular, como la glucosa o el glicerol, que se transforman químicamente durante los procesos biológicos. Los miembros de estas dos clases de moléculas son comunes, con ligeras variantes, en todos los seres vivos. Así, por ejemplo, el DNA, abreviatura de *desoxyribonucleic acid*, o ácido desoxirribonucleico almacena la información genética en todos los organismos celulares. Las *proteínas*, las macromoléculas clave que participan en la mayoría de los procesos biológicos, se construyen a partir de una serie de 20 monómeros que coinciden en todos los organismos. Además, las proteínas que



Sulfolobus acidocaldarius



Arabidopsis thaliana



Homo sapiens

Figura 1.1 Diversidad y semejanza biológicas. La forma de una molécula crucial en la regulación genética (la proteína de unión a la caja TATA) es similar en tres organismos completamente distintos, separados el uno del otro por miles de millones de años de evolución. [(A la izquierda) Dr. T. J. Beveridge/Visuals Unlimited; (en el centro) Holt Studios/Photo Researchers; (a la derecha) Time Life Pictures/Getty Images.]

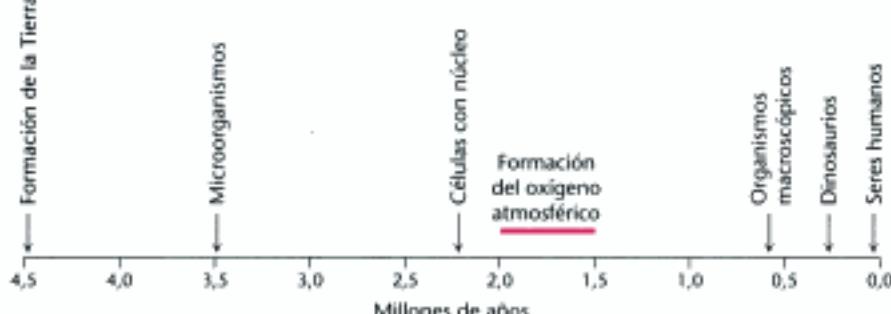


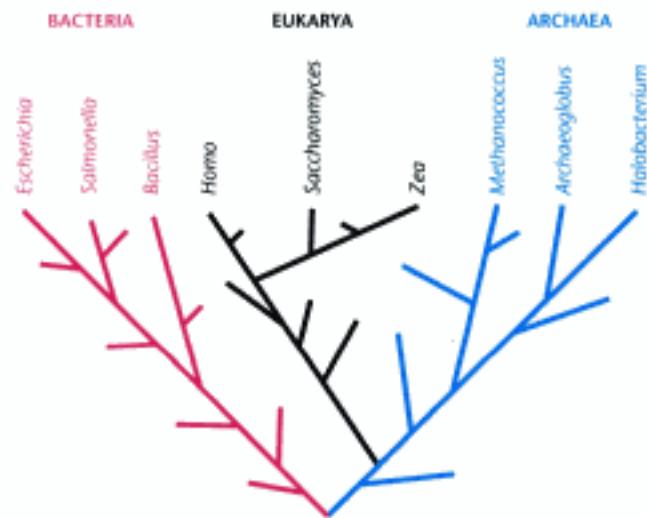
Figura 1.2 Posible desarrollo de la evolución bioquímica. Se indican algunos sucesos clave. Obsérvese que la vida apareció sobre la Tierra hace aproximadamente tres mil quinientos millones de años, mientras que los seres humanos han aparecido muy recientemente.

ejercen funciones similares en organismos diferentes son frecuentemente muy semejantes en sus estructuras tridimensionales (Figura 1.1).

Los procesos metabólicos clave también son comunes en muchos organismos. Así, por ejemplo, la serie de transformaciones químicas que permiten convertir la glucosa y el oxígeno en dióxido de carbono y agua son prácticamente idénticas en bacterias simples, como *Escherichia coli* (*E. coli*) hasta en seres humanos. Incluso los procesos que parecen ser completamente distintos tienen a menudo aspectos bioquímicos comunes; por ejemplo, los procesos bioquímicos por los que las plantas capturan la energía lumínica y la convierten en otras formas más útiles son asombrosamente similares a la forma en qué los animales capturan la energía a partir de la degradación de la glucosa.

Estas observaciones sugieren de forma abrumadora que todos los seres vivos de la Tierra tienen un antepasado común y que los organismos modernos han evolucionado a partir de él hasta sus formas actuales. Los hallazgos geológicos y bioquímicos brindan una línea temporal a esta vía evolutiva (Figura 1.2). En función de sus características bioquímicas, los diversos organismos del mundo moderno se pueden dividir en tres grupos fundamentales llamados *dominios*: *Eukarya* (eucariotas), *Bacteria* (bacterias) y *Archaea* (arqueobacterias). El dominio eucariota abarca todos los organismos pluricelulares incluido el ser humano, así como muchos organismos microscópicos y unicelulares tales como las levaduras. La característica definitoria de los *eucariotas* es la presencia de un núcleo muy bien definido en cada célula. Los organismos unicelulares tales como las bacterias, que no tienen núcleo, se denominan *procariotas*. Los procariotas fueron reclasificados en dos dominios distintos como resultado del descubrimiento de Carl Woese, en 1977, que constató que ciertos organismos semejantes a bacterias son, desde el punto de vista bioquímico, muy distintos de otras especies bacterianas previamente caracterizadas. Estos organismos, que hoy se sabe que han divergido de las bacterias en etapas muy tempranas de la evolución, son las arqueobacterias o *árqueas*. En base a la información genética se pueden deducir los caminos evolutivos desde un antepasado común hasta organismos modernos. En la figura 1.3 se muestra un ejemplo de estos caminos.

Gran parte de este libro estudia las reacciones químicas, las macromoléculas biológicas asociadas y los metabolitos que aparecen en los procesos biológicos comunes a todos los seres vivos. Este abordaje resulta posible debido a la unidad de la vida a nivel bioquímico. Al mismo tiempo, distintos organismos tienen necesidades específicas, dependiendo del nicho biológico particular en el que se han desarrollado y en el que viven. Por comparación y contraste de los detalles en las vías bioquímicas particulares de diferentes organismos podemos deducir cómo se han resuelto los desafíos biológicos a nivel bioquímico. En la mayoría de los casos estos desafíos suponen la adaptación de moléculas preexistentes a nuevas funciones en vez del desarrollo de macromoléculas totalmente nuevas.



Nuestros conocimientos de bioquímica se han visto enriquecidos con la posibilidad de examinar las estructuras tridimensionales de las biomoléculas con mucho detalle. Algunas de estas estructuras son sencillas y elegantes, mientras que otras resultan increíblemente complicadas pero, en cualquier caso, estas estructuras aportan un andamiaje esencial para comprender su función. Empezaremos estudiando las relaciones entre estructura y función del material genético, el DNA.

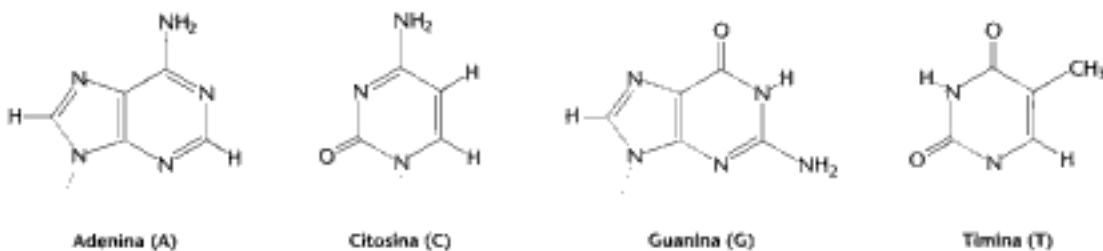
1.2 El DNA ilustra la relación entre forma y función

Un aspecto bioquímico fundamental, común a todos los organismos formados por células, es la utilización del DNA como almacén de la información genética. El descubrimiento de que el DNA desempeña una función crucial tuvo lugar en los estudios sobre bacterias en la década de los 40. Este hallazgo fue seguido del descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA en 1953, un hecho que sentó las bases para muchos avances en bioquímica y otros muchos campos, hasta el momento presente.

La estructura del DNA ilustra con brillantez un principio básico común a todas las biomoléculas: la estrecha relación entre estructura y función. Las extraordinarias propiedades de esta sustancia química le permiten funcionar como un vehículo robusto y eficiente en el almacenamiento de la información. Comenzaremos con un análisis de la estructura covalente del DNA y su extensión en las tres dimensiones.

El DNA está constituido por cuatro tipos de precursores

El DNA es un *polímero lineal* formado por cuatro monómeros distintos. Posee un esqueleto fijo del cual sobresalen distintos sustituyentes (Figura 1.4). Este esqueleto está constituido por unidades repetitivas de azúcar-fosfato. Los azúcares son moléculas de desoxirribosa que dan nombre al DNA. Cada azúcar está unido a dos grupos fosfato mediante diferentes enlaces. Además cada azúcar está orientado de la misma manera, de modo que cada hebra de DNA es polar, con un extremo diferenciado del otro. A cada desoxirribosa se puede unir una de estas cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), o timina (T).



Estas bases están conectadas a los componentes glicídicos del esqueleto de DNA mediante los enlaces señalados en rojo en la Figura 1.4. Aunque las cuatro bases son planas, en otros aspectos se diferencian significativamente. Así pues, los monómeros del DNA están formados por unidades de azúcar-fosfato, con una de las cuatro bases unidas al azúcar, y dispuestas en cualquier orden a lo largo de una hebra de DNA.

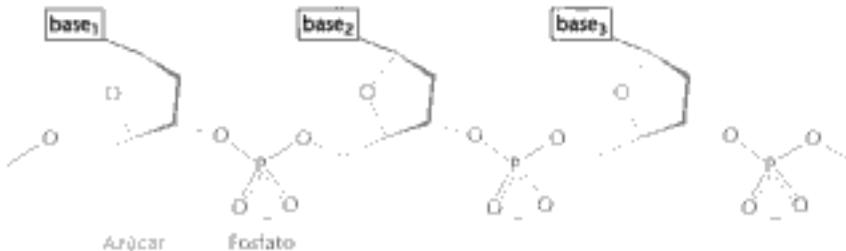


Figura 1.4 Estructura covalente del DNA. Cada unidad de la estructura polimérica está constituida por un azúcar (desoxirribosa), un fosfato y una base variable que sobresale del esqueleto azúcar-fosfato.



Figura 1.5 El doble helicóide. Estructura de doble helicóide del DNA propuesta por Watson y Crick. El esqueleto de azúcar-fosfato de las dos cadenas se muestra en rojo y azul y las bases en verde, morado, naranja y amarillo. Las dos hebras son antiparalelas y transcurren en direcciones opuestas respecto al eje de la doble hélice como indican las flechas.

Dos hebras sencillas de DNA se emparejan para formar un doble helicoides

La mayor parte de las moléculas de DNA poseen no una sino dos hebras (Figura 1.5). En 1953, James Watson y Francis Crick dilucidaron el ordenamiento de esas hebras y propusieron una estructura tridimensional para las moléculas de DNA. Esta estructura es un *doble helicoide*, formado por las dos hebras superenrolladas, dispuestas de tal manera que el esqueleto de azúcar-fosfato se encuentra en el exterior y las bases en el interior. La clave de esta estructura está en que se forman *pares de bases específicos* (pb) unidos por *puentes de hidrógeno* (Sección 1.3): la adenina empareja con la timina (A-T) y la guanina empareja con la citosina (G-C), como se muestra en la Figura 1.6. Los puentes de hidrógeno son mucho más débiles que los *enlaces covalentes*, tales como los enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno que definen la estructura de las propias bases. Dichos enlaces son cruciales para los sistemas bioquímicos, porque son lo suficientemente débiles para romperse de modo reversible en los procesos bioquímicos; si bien son lo suficientemente fuertes, cuando se forman varios a la vez, como para ayudar a estabilizar determinadas estructuras tales como la del propio helicoide.

La estructura del DNA explica la herencia y el almacenamiento de la información.

La estructura propuesta por Watson y Crick tiene dos propiedades de vital importancia para el papel del DNA como material hereditario. Primero, la estructura es compatible con cualquier secuencia de bases. Los pares de bases tienen esencialmente la misma forma (Figura 1.6) y por tanto encajan igual de bien en el centro de la estructura del doble helicoide. Si no existen impedimentos, la secuencia de bases a lo largo de una hebra de DNA puede ser una forma eficiente de almacenar la información y, de hecho, constituye el almacén de información genética. La secuencia del DNA determina las secuencias del ácido ribonucleico o RNA y de las moléculas proteicas que realizan la mayoría de las actividades en el interior de las células.

Segundo, debido al emparejamiento de las bases, la secuencia de éstas en una hebra determina, por completo, la secuencia en la otra hebra. Tal como Watson y Crick tan tímidamente escribieron: "No se nos escapa que el emparejamiento específico que hemos propuesto sugiere de inmediato un posible mecanismo de copia del ma-

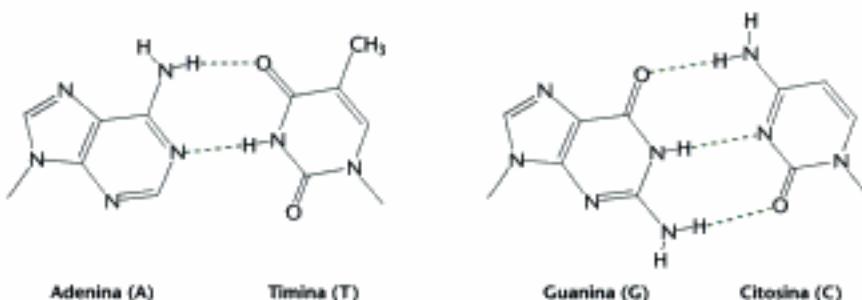


Figura 1.6 Pares de bases de Watson y Crick. La adenina empareja con la timina (A-T), y la guanina con la citosina (G-C). Las líneas de trazo verde representan puentes de hidrógeno.

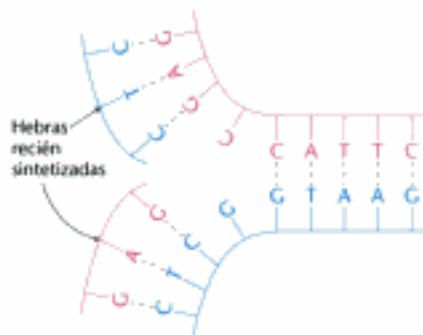


Figura 1.7 Replicación del DNA. Si una molécula de DNA se separa en sus dos hebras, cada una puede actuar como molde para la génesis de su hebra complementaria.

aterial genético". Así, si la doble hélice de DNA se separa en dos hebras sencillas, cada hebra puede actuar como molde para la generación de su pareja mediante la formación de pares de bases específicos (Figura 1.7). La estructura tridimensional del DNA ejemplifica de modo bellísimo la estrecha relación entre la forma y la función de las moléculas.

1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas

Hemos visto que una visión química sobre la capacidad de establecer puentes de hidrógeno por parte de las bases del DNA conduce a una profunda comprensión de un proceso biológico fundamental. Como trabajo preliminar para el resto del libro, empezaremos el estudio de la bioquímica exponiendo aquellos conceptos seleccionados de la química y mostraremos cómo estos conceptos resultan aplicables a los sistemas biológicos. Estos conceptos incluyen los tipos de enlaces químicos; la estructura del agua, el disolvente en el que tienen lugar la mayoría de los procesos bioquímicos; la Primera y Segunda Leyes de la Termodinámica; y los principios de la química ácido-base. Utilizaremos estos conceptos para estudiar un proceso bioquímico modelo, a saber, la formación de la doble hélice de DNA a partir de las dos hebras que la componen. Este proceso es sólo uno de los muchos ejemplos para ilustrar estos principios. No hay que olvidar que aunque la discusión específica se refiere a la formación de la doble hélice del DNA, los conceptos estudiados son totalmente generales y se aplicarán a otras muchas clases de moléculas y procesos que se verán en el resto del libro.

La doble hélice puede formarse a partir de las hebras complementarias

El descubrimiento de que el DNA de fuentes naturales existe en forma de doble hélice con las parejas de bases de Watson y Crick sugería, pero no demostraba, que las dobles hélices se podrían formar espontáneamente fuera de los seres vivos. Supongamos que se sintetizan por métodos químicos dos cadenas cortas de DNA con secuencias complementarias de modo que, en principio, puedan formar un emparejamiento de bases según Watson y Crick. Tales secuencias son CGATTAAT y ATTAATCG. La estructura de estas moléculas en disolución puede estudiarse mediante diversas técnicas. Por separado, cada secuencia existe casi exclusivamente como una molécula de una sola hebra. Sin embargo, cuando las dos secuencias se mezclan, se forma una doble hélice al emparejarse las bases de Watson y Crick (Figura 1.8). Esta reacción tiene lugar casi por completo. Si las dos hebras están presentes al principio a la misma concentración, 1 mM, entonces más del 99,99% de esas hebras adopta la forma de doble hélice a 25 °C y en presencia de NaCl 1 M.

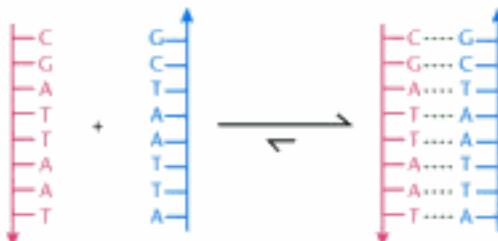


Figura 1.8 Formación de una doble hélice. Cuando se mezclan dos hebras de DNA con las secuencias complementarias adecuadas, éstas se asocian espontáneamente para formar una doble hélice.

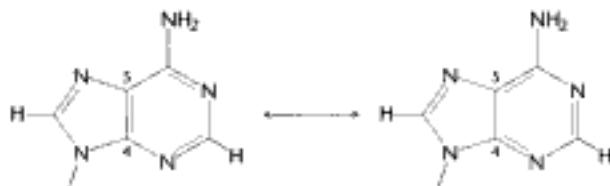
¿Qué fuerzas hacen que las dos hebras complementarias de DNA se unan? Para analizar esta reacción de unión debemos considerar varios factores: los tipos de interacciones y enlaces en los sistemas bioquímicos y la energética favorecedora de la reacción. También debemos tener en cuenta la influencia de las condiciones de la disolución, en particular de las consecuencias de las reacciones ácido-base.

Los enlaces covalentes y no covalentes son importantes para la estructura y estabilidad de las moléculas biológicas

Los átomos interactúan unos con otros por medio de enlaces químicos. Estos enlaces incluyen las uniones covalentes que definen la estructura de las moléculas y también una serie de uniones no covalentes de gran importancia en bioquímica.

Enlaces covalentes Los enlaces más fuertes que están presentes en los compuestos bioquímicos son los enlaces covalentes, tales como los que mantienen unidos a los átomos de las bases individuales mostradas en la página 4. Un enlace covalente consiste en un par de electrones que se comparten entre átomos adyacentes. Un típico enlace covalente carbono-carbono (C-C) tiene una longitud de 1,54 Å y una energía de enlace de 356 kJ mol⁻¹ (85 kcal mol⁻¹). Dado que esta energía es relativamente alta, se debe gastar una cantidad considerable de energía para romper los enlaces covalentes. Se puede compartir más de un par de electrones entre dos átomos para formar un enlace covalente múltiple. Así, por ejemplo, tres de las bases en la Figura 1.4 incluyen dobles enlaces carbono-oxígeno (C=O). Estos enlaces son incluso mucho más fuertes que los enlaces sencillos C-C, con energías próximas a los 730 kJ mol⁻¹ (175 kcal mol⁻¹) y son algo más cortos.

Algunas moléculas se pueden describir utilizando más de una distribución de sus enlaces covalentes. Por ejemplo, la adenina se puede escribir de dos maneras equivalentes llamadas *estructuras resonantes*.



Estas estructuras de la adenina representan la distribución alternativa de los enlaces dobles y sencillos que serían posibles en el mismo armazón estructural. Las estructuras resonantes se representan conectadas por una flecha con puntas dobles. La verdadera estructura de la adenina es intermedia de estas estructuras resonantes. Esta estructura intermedia se manifiesta por la longitud de los enlaces tales como los que unen los átomos de carbono C-4 y C-5. La longitud observada de 1,40 Å es intermedia entre la esperada para un enlace simple C—C (1,54 Å) y un enlace doble C=C (1,34 Å). Una molécula que puede escribirse como varias estructuras resonantes de energías aproximadamente iguales tiene mayor estabilidad que otra molécula que no las posea.

Enlaces no covalentes Los enlaces no covalentes son más débiles que los covalentes pero resultan esenciales para los procesos bioquímicos, tales como la formación del doble helicóide. Los cuatro tipos fundamentales de enlaces no covalentes son *las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas*. Se diferencian en la geometría, la fuerza y la especificidad. Además, a cada tipo le afecta de forma muy distinta la presencia del agua. Vamos a considerar las características de cada uno:

1. *Interacciones electrostáticas*. Un grupo cargado de una molécula puede atraer a otro grupo con carga opuesta de otra molécula. La energía de una interacción electrostática viene dada por la *ley de Coulomb*:

$$E = kq_1q_2/Dr^2$$

donde E es la energía, q_1 y q_2 son las cargas en los dos átomos (en unidades de carga eléctrica), r es la distancia entre los dos átomos (en angstroms); D es la constante dieléctrica (que refleja el efecto del medio circundante) y k es una constante de pro-

1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas

Unidades de longitud y de energía

Las distancias interatómicas y las longitudes de enlace se suelen medir en angstroms (Å):

$$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 10^{-8} \text{ cm} = 0,1 \text{ nm}$$

Habitualmente se utilizan varias unidades de energía. Un julio (J) es la energía requerida para desplazarse 1 metro contra una fuerza de 1 newton. Un kilojulio (kJ) son 1000 julios. Una caloría es la energía requerida para calentar 1 gramo de agua en 1 grado centígrado. Una kilocaloría (kcal) son 1000 calorías. Un julio equivale a 0,239 cal.



porcionalidad ($k = 1389$, para energías expresadas en kilojulios por mol, o bien 332, cuando se da la energía en kilocalorías por mol).

Por convención, se considera que la interacción atrayente tiene una energía negativa. Así, la interacción electrostática entre dos átomos, que posean carga opuesta, separados por 3 Å, en el seno del agua (la cual tiene una constante dieléctrica de 80) tiene una energía de $-5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-1,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Cabe advertir la gran importancia de la constante dieléctrica del medio. Para los mismos iones separados 3 Å en un disolvente apolar como el hexano (que tiene una constante dieléctrica de 2) la energía de esta interacción sería de -231 kJ mol^{-1} (55 kcal mol $^{-1}$).

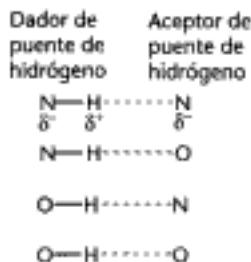


Figura 1.9 Puentes de hidrógeno. Las líneas discontinuas en verde representan los puentes de hidrógeno. Se muestran las posiciones de las cargas parciales (δ^+ y δ^-).

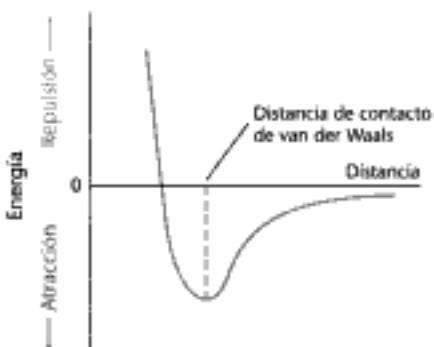
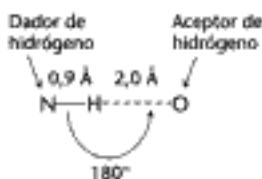


Figura 1.10 La energía de las interacciones de van der Waals cuando dos átomos se aproximan uno al otro. La energía de atracción se encuentra en el punto óptimo en la distancia de contacto de van der Waals. A distancias menores que ésta, la energía aumenta rápidamente debido a las repulsiones electrón-electrón.

2. *Puentes de hidrógeno*. Estas interacciones son fundamentalmente electrostáticas. Los puentes de hidrógeno son los responsables de la formación de los pares de bases específicos de la doble hélice del DNA. En un puente de hidrógeno, el átomo de hidrógeno está parcialmente compartido entre dos átomos relativamente electronegativos, tales como el nitrógeno y el oxígeno. El *dador o dador del enlace de hidrógeno* es el grupo que incluye tanto al átomo al que el hidrógeno está más estrechamente unido como al propio átomo de hidrógeno, mientras que el *aceptor del enlace de hidrógeno* es el átomo menos estrechamente unido al átomo de hidrógeno (Figura 1.9). La electronegatividad del átomo al cual el hidrógeno está unido covariantemente aparta la densidad electrónica del átomo de hidrógeno, de forma que éste desarrolla una carga positiva parcial (δ^+) a través de una interacción electrostática. Así pues, el átomo de hidrógeno puede interactuar con un átomo que tenga una carga negativa parcial (δ^-).

Los puentes de hidrógeno tienen energías que van de 4 a 20 kJ mol $^{-1}$ (1 a 5 kcal mol $^{-1}$), por tanto, son mucho más débiles que los enlaces covalentes. Los enlaces de hidrógeno son también algo más largos que los enlaces covalentes; sus distancias de enlace (medidas desde el átomo de hidrógeno) varían entre 1,5 y 2,6 Å; por tanto, las distancias entre dos átomos unidos a través del hidrógeno van desde 2,4 hasta 3,5 Å. Los enlaces de hidrógeno más fuertes tienen tendencia a ser aproximadamente lineales, de tal forma que el dador de hidrógeno, el átomo de hidrógeno y el aceptor se encuentran en línea recta. Las interacciones por puentes de hidrógeno son responsables de muchas de las propiedades del agua que la hacen un disolvente especial, como veremos en seguida.

3. *Interacciones de van der Waals*. La base de las interacciones de van der Waals, está en qué la distribución de la carga electrónica alrededor de un átomo cambia con el tiempo. En un momento dado, la distribución de carga no es perfectamente simétrica. Esta asimetría transitoria en la carga electrónica alrededor de un átomo actúa a través de las interacciones electrostáticas, para inducir una asimetría complementaria en la distribución electrónica alrededor de sus átomos vecinos. La atracción resultante entre dos átomos aumenta a medida que se acercan, hasta que su separación coincide con la *distancia de contacto de van der Waals* (Figura 1.10). A distancias menores predominan las intensas fuerzas repulsivas, porque las nubes electrónicas más externas se solapan.

Las energías asociadas con las interacciones de van der Waals son bastante pequeñas; típicamente, la contribución de estas interacciones por par atómico es de 2 a 4 kJ mol $^{-1}$ (0,5 a 1,0 kcal mol $^{-1}$). Sin embargo, cuando las superficies de dos moléculas grandes se aproximan, un gran número de átomos establecen interacciones de van der Waals y el efecto neto de sumar muchos pares de átomos puede llegar a ser considerable.

Propiedades del agua. El agua es el disolvente en el que tienen lugar la mayoría de las reacciones bioquímicas. Sus propiedades son esenciales para la formación de estructuras supramoleculares y para el desarrollo de las reacciones químicas. Son especialmente relevantes dos propiedades del agua:

1. *El agua es una molécula polar*. La molécula de agua es angular, no lineal, y por tanto la distribución de cargas es asimétrica. El núcleo de oxígeno atrae electrones de

los núcleos de hidrógeno, dejando, por ello, la región alrededor de estos con una carga positiva neta. La molécula de agua es por tanto una estructura eléctricamente polar.

2. *El agua es muy cohesiva.* Las moléculas de agua establecen interacciones fuertes entre ellas a través de puentes de hidrógeno. Estas interacciones se manifiestan en la estructura del hielo (Figura 1.11) Una malla de puentes de hidrógeno mantiene cohesionada la estructura; interacciones semejantes unen las moléculas en el agua líquida y explican su cohesión, si bien, en el estado líquido, aproximadamente la cuarta parte de los puentes de hidrógeno están rotos. La naturaleza polar del agua es responsable del valor tan elevado de su constante dieléctrica que es 80. Las moléculas en disolución acuosa interactúan con las del agua mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Estas interacciones hacen del agua un disolvente muy versátil, capaz de disolver fácilmente muchas especies moleculares, especialmente compuestos polares y cargados que pueden participar en estas interacciones.

1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas

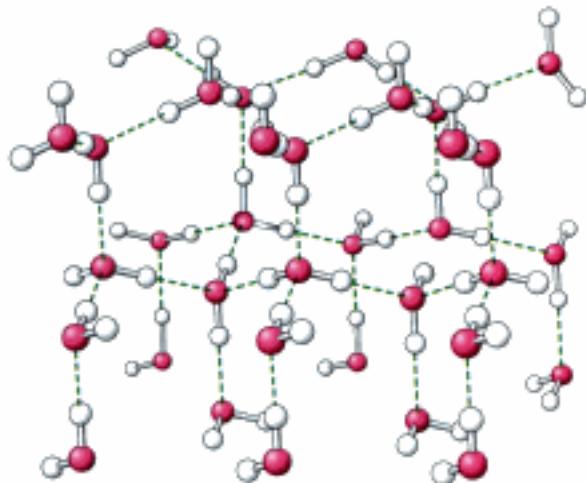
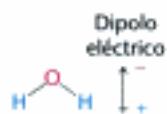


Figura 1.11 Estructura del hielo. Entre las moléculas de agua se forman puentes de hidrógeno (aparecen como líneas de trazo) de forma que produce una estructura abierta y muy ordenada.

El efecto hidrofóbico. Una interacción fundamental, llamada el *efecto hidrofóbico* es una manifestación de las propiedades del agua. Algunas moléculas (llamadas *moléculas apolares*) no pueden participar en los puentes de hidrógeno ni en las interacciones iónicas. Las interacciones de las moléculas apolares con las de agua no son tan favorables como las interacciones mutuas entre moléculas de agua. Las moléculas de agua en contacto con moléculas apolares forman “jaulas o cajas” alrededor de éstas, resultando estar más ordenadas que las mismas moléculas libres en la disolución. Sin embargo, cuando las moléculas apolares entran en contacto, algunas moléculas de

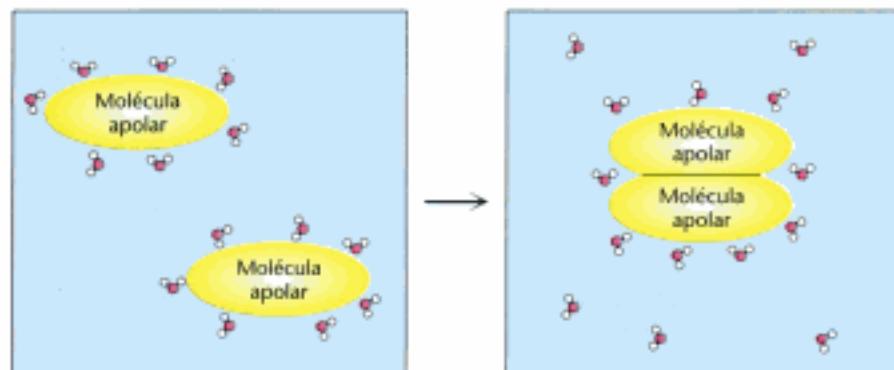


Figura 1.12 El efecto hidrofóbico. La agregación de grupos apolares en el agua propicia la liberación de moléculas de agua en el conjunto del líquido. Inicialmente, estas moléculas de agua interactúan con la superficie apolar. La liberación de moléculas de agua hace que la agregación de grupos apolares sea favorable.

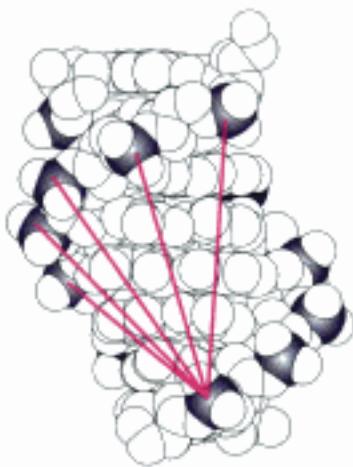


Figura 1.13 Interacciones electrostáticas en el DNA. Cada unidad dentro de la doble hélice incluye un grupo fosfato (el átomo de fósforo está representado de color púrpura) que porta una carga negativa. Las interacciones desfavorables de un fosfato (también llamado grupo fosforilo) con otros varios están señaladas por medio de líneas rojas. Estas interacciones repulsivas se oponen a la formación de la doble hélice.

agua se liberan y pueden interactuar libremente con el conjunto del agua (Figura 1.12). La liberación del agua de las cajas resulta favorable por las razones que veremos en breve. El resultado es que las moléculas apolares muestran en el agua una tendencia creciente a asociarse unas con otras, mayor que la que presentarían en otros disolventes menos polares y menos autoasociables. Esta tendencia se llama el efecto hidrofóbico y las interacciones asociadas se conocen como *interacciones hidrofóbicas*.

La doble hélice es una expresión de las leyes de la química

Veamos ahora como estas cuatro interacciones no covalentes dirigen juntas la asociación de dos hebras de DNA para formar una doble hélice. Primero, cada grupo fosfato del DNA transporta una carga negativa. Estos grupos cargados negativamente interaccionan de forma desfavorable unos con otros. Por consiguiente, unas interacciones electrostáticas desfavorables tienen lugar cuando dos hebras de DNA se aproximan una a la otra. Estos grupos fosfato, están alejados en la doble hélice a distancias mayores de 10 Å, pero muchas de estas interacciones tienen lugar (Figura 1.13). Así pues, las interacciones electrostáticas se oponen a la formación de la doble hélice. La fuerza de estas repulsiones electrostáticas disminuye por la elevada constante dieléctrica del agua y la presencia en disolución de especies iónicas, tales como los iones Na^+ o Mg^{2+} . Estos iones cargados positivamente interaccionan con los grupos fosfato y neutralizan parcialmente sus cargas negativas.

Segundo, advertimos la importancia de los puentes de hidrógeno en la formación en la doble hélice de pares de bases específicos. Sin embargo, en una hebra de DNA desparejada, tanto los dadores como los aceptores de puentes de hidrógeno están expuestos en la disolución de forma que se pueden formar puentes con las moléculas de agua.

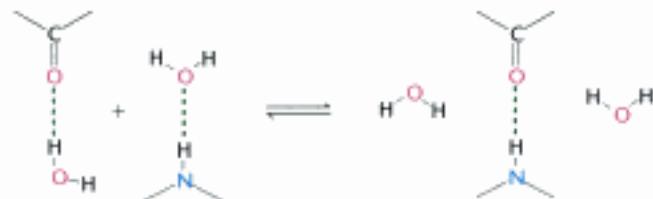


Figura 1.14 Apilamiento de las bases. En la doble hélice del DNA, los pares de bases están apilados, casi uno encima del otro, de modo que muchos átomos en cada pareja de bases están separados por sus distancias de contacto de van der Waals. El par de bases central está representado en azul oscuro y los dos pares de bases adyacentes en azul claro. En rojo se representan varios contactos de van der Waals.

Cuando dos hebras sencillas se juntan, estos puentes de hidrógeno con el agua se rompen y se forman otros puentes nuevos entre las bases. El proceso total de formación de la doble hélice no se ve favorecido sustancialmente por la formación de estos puentes de hidrógeno ya que el número de puentes que se forman es el mismo de los que se rompen. No obstante, sí contribuyen notablemente en la especificidad de la unión. Supongamos que se juntan a la vez dos bases que no pueden formar parejas de Watson y Crick. Los puentes de hidrógeno con el agua deberán romperse cuando las bases entran en contacto. Debido a que las bases no son estructuralmente complementarias, no se pueden reemplazar simultáneamente todos los puentes entre las bases. Por ello, la formación de una doble hélice entre secuencias no complementarias se ve desfavorecida.

Tercero, dentro de la doble hélice, las parejas de bases son paralelas y están casi apiladas unas encima de otras. La separación típica entre los planos de pares de bases adyacentes es de 3,4 Å y las distancias entre la mayoría de las aproximaciones más estrechas entre dos átomos son de 3,6 Å. Esta distancia corresponde muy exactamente a la distancia de contacto de van der Waals (Figura 1.14). Las bases tienden a apilarse aun en las moléculas de DNA de una sola hebra. No obstante, el apilamiento de bases y las interacciones asociadas de van der Waals resultan óptimas en la estructura de la doble hélice.

Cuarto, el efecto hidrofóbico también contribuye a favorecer el apilamiento de las bases. El apilamiento más completo aleja del agua las superficies apolares de las bases al contactar una con otra.

Los principios de formación de la doble hélice por parte de dos hebras de DNA son aplicables a muchos otros procesos bioquímicos. Muchas interacciones débiles contribuyen a la energética global del proceso, unas favoreciéndolo y otras dificultándolo. Además, la complementariedad de las superficies es un aspecto clave: cuando se enfrentan superficies complementarias, los dadores de hidrógeno se alinean con los接受ores y las superficies apolares se juntan y alcanzan un valor máximo las interacciones de van der Waals, al tiempo que se minimiza el área superficial apolar expuesta al entorno acuoso. Las propiedades del agua desempeñan un papel crucial para determinar la importancia de estas interacciones.

Las leyes de la termodinámica rigen el comportamiento de los sistemas bioquímicos

Al estudiar las leyes de la termodinámica se puede concebir la formación de la doble hélice desde una nueva perspectiva. Estas leyes son principios generales que se aplican a todos los procesos físicos (y biológicos) y son de gran importancia ya que determinan las condiciones bajo las cuales un proceso específico puede o no puede tener lugar. Primero se enfocarán desde una perspectiva general y posteriormente se aplicarán los principios desarrollados a la formación de la doble hélice.

Las leyes de la termodinámica hacen una distinción entre un sistema y su entorno. Un *sistema* se refiere a la materia incluida en una región definida del espacio. La materia en el universo restante se denomina *entorno*. *La Primera Ley de la Termodinámica establece que la energía total de un sistema y su entorno permanece constante*. En otras palabras, el contenido energético del universo es constante; la energía no puede ser creada ni destruida. La energía puede, sin embargo, adoptar diferentes formas. El calor, por ejemplo, es una forma de energía. El calor es una manifestación de la *energía cinética* asociada con el movimiento al azar de las moléculas. Por otra parte, la energía se puede representar como *energía potencial*, haciendo referencia a la capacidad de que ésta sea liberada al darse determinados sucesos. Pensemos, por ejemplo, en un balón en lo alto de una torre. El balón tiene una energía potencial considerable ya que, si se suelta, el balón liberará la energía cinética asociada con su movimiento al caer. En un sistema químico, la energía potencial se relaciona con la probabilidad de que los átomos puedan reaccionar entre sí. Por ejemplo, una mezcla de gasolina y oxígeno tiene mucha energía potencial porque esas moléculas pueden reaccionar para formar dióxido de carbono y liberar energía en forma de calor. La Primera Ley implica que cualquier energía liberada en la formación de enlaces químicos pueda utilizarse para romper otros enlaces, se libere como calor, o se almacene de alguna otra manera.

Otro concepto termodinámico importante es el de la *entropía*, una medida del nivel de libertad o desorden de un sistema. *La Segunda Ley de la Termodinámica establece que la entropía total de un sistema y su entorno aumenta siempre*. Así por ejemplo, la liberación del agua de las superficies apolares responsables del efecto hidrofóbico resulta favorable porque las moléculas de agua libres en la disolución están más desordenadas que lo estaban al estar asociadas a las superficies apolares. A primera vista, la Segunda Ley parece contradecir a la experiencia habitual, principalmente en los seres vivos. Muchos procesos biológicos, tales como la generación de una estructura bien definida, como puede ser una hoja a partir de dióxido de carbono gaseoso y de otros nutrientes, claramente aumenta el nivel de orden y por tanto disminuye la entropía. La entropía puede disminuir localmente al formarse estructuras ordenadas solamente si en otras partes del universo aumenta en una magnitud igual o superior. Su disminución local viene con frecuencia acompañada por la liberación de calor, el cual aumenta la entropía del entorno.

Podemos analizar este proceso en términos cuantitativos. Primero, consideraremos el sistema. La entropía (S) del sistema puede cambiar en el curso de una reac-

ción química por un total $\Delta S_{\text{sistema}}$. Si fluye calor del sistema al entorno, entonces el contenido de calor, a menudo conocido como *entalpía* (H) del sistema, se verá reducido en un total $\Delta H_{\text{sistema}}$. Para aplicar la Segunda Ley debemos determinar el cambio de entropía del entorno. Si el calor fluye del sistema al entorno, entonces la entropía del entorno aumentará. El cambio preciso de entropía en el entorno depende de la temperatura; es decir, el cambio de entropía es mayor cuando el calor se cede a un entorno relativamente frío que cuando se cede a una temperatura elevada en la que existía ya un alto grado de desorden. Para ser todavía más específico, el cambio en la entropía del entorno será proporcional a la cantidad de calor transferido por el sistema e inversamente proporcional a la temperatura (T) del entorno. En los sistemas biológicos, T [temperatura absoluta, en kelvin (K)] se supone que es constante. Así pues, el cambio de entropía del entorno viene dado por

$$\Delta S_{\text{entorno}} = -\Delta H_{\text{sistema}}/T \quad (1)$$

El cambio total de entropía viene dado por la expresión

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{entorno}} \quad (2)$$

La sustitución de la ecuación 1 en la 2 da

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{sistema}} - \Delta H_{\text{sistema}}/T \quad (3)$$

Multiplicando por $-T$ resulta

$$-T\Delta S_{\text{total}} = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} \quad (4)$$

La función $-T\Delta S$ tiene unidades de energía y se denomina *energía libre*, o *energía libre de Gibbs*, en nombre de Josiah Willard Gibbs, que desarrolló esta función en 1878:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} \quad (5)$$

El cambio de energía libre, ΔG , se usará a lo largo de este texto, para describir la energética de las reacciones bioquímicas.

Recordemos que la Segunda Ley de la Termodinámica establece que, para que una reacción sea espontánea, la entropía del universo debe aumentar. El análisis de la ecuación 3 muestra que la entropía total solamente aumentará si

$$\Delta S_{\text{sistema}} > \Delta H_{\text{sistema}}/T \quad (6)$$

Reorganizando estas ecuaciones resulta $T\Delta S_{\text{sistema}} > \Delta H$, es decir que la entropía crecerá solamente si

$$\Delta G = \Delta H_{\text{sistema}} - T\Delta S_{\text{sistema}} < 0 \quad (7)$$

Por consiguiente, el cambio de energía libre debe ser negativo para que una reacción resulte espontánea. *Un cambio de energía libre negativo, viene acompañado de un aumento en la entropía total del universo.* La energía libre representa un solo término que tiene en cuenta tanto la entropía del sistema como la del entorno.

En la formación de la doble hélice se libera calor

Veamos cómo se aplican los principios de la termodinámica a la formación de la doble hélice (Figura 1.15). Supongamos que se mezclan dos disoluciones, cada una con una de las hebras del DNA. Antes de que se formen dobles helicoides, las hebras no emparejadas pueden desplazarse y girar libremente en la disolución, mientras que las hebras emparejadas en doble helicoidal deben desplazarse de forma conjunta. Además, las hebras desparejadas existen en más conformaciones de las que pueden adoptar cuando se encuentran formando una doble hélice. Por consiguiente, la formación de dobles hélices a partir de hebras simples supone aparentemente un aumento de orden en el sistema.

1.3 Los conceptos de la química explican las propiedades de las moléculas biológicas

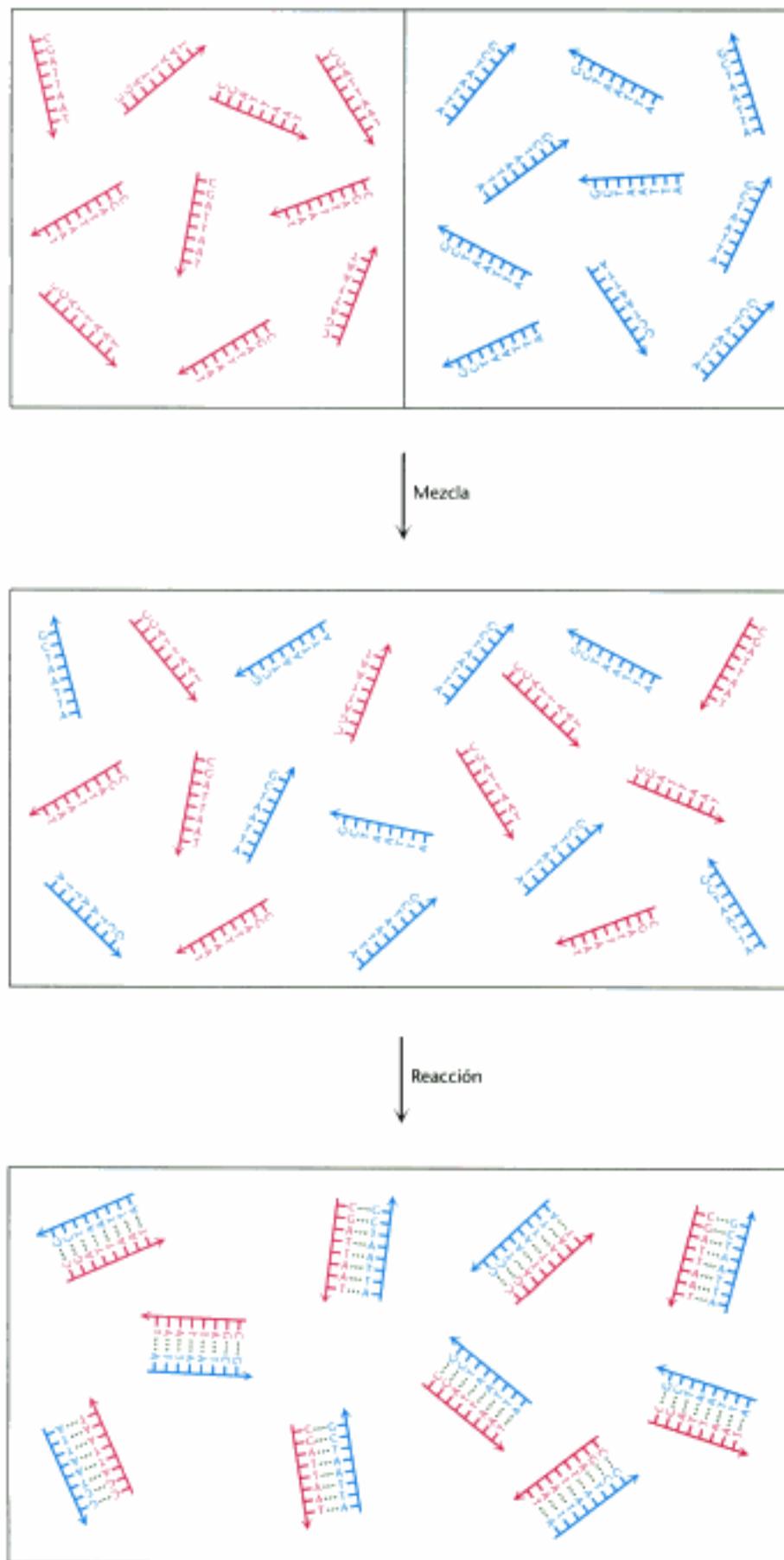


Figura 1.15 Formación de la doble hélice y variación de la entropía. Cuando se mezclan soluciones que contienen hebras de DNA con secuencias complementarias, las hebras reaccionan formando dobles hélices. Este proceso supone una pérdida de entropía del sistema lo que indica que se deberá liberar calor hacia el entorno, de forma que se cumpla la Segunda Ley de la Termodinámica.

Sobre esta base de análisis, la doble hélice no podría formarse sin violentar la Segunda Ley de la Termodinámica a menos que se liberase calor que aumentase la entropía del entorno. Experimentalmente se puede medir el calor liberado si se mezclan las dos disoluciones que contienen las hebras separadas en un baño de agua, en este caso el entorno. Entonces determinamos cuánto calor debe ser absorbido por el baño de agua o liberado de él para mantener la temperatura constante. Para estas hebras de DNA no emparejadas a 25 °C, a pH 7,0 en NaCl 1M, se libera una considerable cantidad de calor, es decir, aproximadamente 250 kJ mol⁻¹ (60 kcal mol⁻¹). Este resultado experimental revela que el cambio de entalpía en este proceso es muy grande, -250 kJ mol⁻¹, en concordancia con lo esperado: debía haber una gran liberación de calor para cumplir la Segunda Ley. Se puede observar, en términos cuantitativos, cómo el orden dentro del sistema puede aumentar si se libera suficiente calor al entorno para asegurar que la entropía del universo aumenta. A lo largo de este libro retomaremos este tema.

Las reacciones ácido-base son cruciales en muchos procesos bioquímicos

En todo el tiempo que hemos tratado de la formación de la doble hélice, solamente hemos visto cómo se forman o se rompen uniones no covalentes en todo este proceso. Pero muchos procesos bioquímicos implican la formación o ruptura de enlaces covalentes. Entre estos, una clase especialmente importante de reacciones prominentes en bioquímica son las *reacciones ácido-base*.

En estas reacciones, los iones hidrógeno se añaden a moléculas o se arrancan de éstas. Un ion hidrógeno, a menudo escrito como H⁺, corresponde a un protón desnudo. De hecho, los iones hidrógeno (hidrogeniones) existen en disolución unidos a las moléculas de agua, formando así lo que llamamos *iones hidronio*, H₃O⁺. Para simplificar, seguiremos escribiendo H⁺, sabiendo que H⁺ es la abreviatura de la auténtica especie presente (H₃O⁺).

La concentración de hidrogeniones en disolución se expresa en forma de pH. En concreto, el *pH* de una disolución se define como

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

donde [H⁺] se mide en unidades de molaridad. Así pues, el pH 7,0 significa una disolución en la que -log [H⁺] = 7,0 y por ello log [H⁺] = -7,0 y [H⁺] = 10^{log[H^+]} = 10^{-7,0} = 1,0 × 10⁻⁷ M.

Indirectamente, el pH expresa también la concentración de iones hidroxilo (hidroxiliones) [OH⁻] en la disolución. Para verlo, debemos darnos cuenta que las moléculas de agua se disocian, para formar los iones H⁺ y OH⁻, en un proceso de equilibrio.



La constante de equilibrio (*K*) para la disociación del agua se define como

$$K = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] / [\text{H}_2\text{O}]$$

y tiene un valor de *K* = 1,8 × 10⁻¹⁶. Nótese que la constante de equilibrio formalmente no tiene unidades. Sin embargo, el valor de la constante de equilibrio presupone que se han utilizado unas determinadas unidades para la concentración; en este caso y también en general, se utiliza la molaridad (M).

La concentración del agua [H₂O] en el agua pura es 55,5 M y este valor es constante en la mayoría de las condiciones. Así pues, podemos definir una nueva constante, *K_w*:

$$\begin{aligned} K_w &= K [\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] \\ K [\text{H}_2\text{O}] &= 1,8 \times 10^{-16} \times 55,5 \\ &= 1,0 \times 10^{-14} \end{aligned}$$

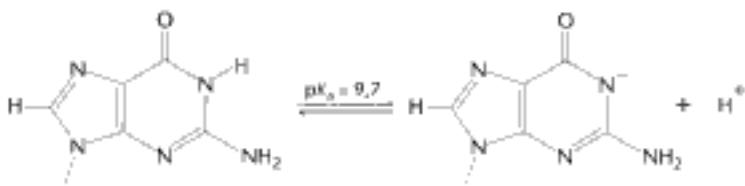
Debido a que $K_w = [H^+][OH^-] = 1,0 \times 10^{-14}$, podemos calcular

$$[OH^-] = 10^{-14}/[H^+] \quad y \quad [H^+] = 10^{-14}/[OH^-].$$

Con estas relaciones en la mano, podemos calcular fácilmente la concentración de hidroxiliones en disoluciones acuosas a un pH dado. Así, por ejemplo, a pH = 7, sabemos que $[H^+] = 10^{-7} M$ y por tanto $[OH^-] = 10^{-14}/10^{-7} = 10^{-7} M$. En disoluciones ácidas las concentraciones de hidrógenios son mayores que 10^{-7} y por tanto el pH será menor que 7. Así, por ejemplo, en HCl 0,1 M, $[H^+] = 10^{-1} M$ y el pH será 1,0. Entonces $[OH^-] = 10^{-14}/10^{-1} = 10^{-13} M$.

Las reacciones ácido-base pueden desorganizar la doble hélice

La reacción que hemos estudiado entre las dos hebras de DNA para formar una doble hélice tiene lugar con facilidad a pH 7,0. Supongamos una disolución que contiene el DNA en doble hélice y la tratamos con una disolución de una base concentrada (con una concentración elevada de OH^-). A medida que se añade la base, registramos el pH y la fracción de DNA en forma doble helicoidal (Figura 1.16). Cuando hacemos las primeras adiciones de base, el pH aumenta pero la concentración de DNA en doble hélice apenas cambia significativamente. Sin embargo, cuando el pH se aproxima a 9, la doble hélice de DNA empieza a disociarse en sus dos hebras componentes. Si el pH sigue aumentando desde 9 a 10 la disociación resulta casi completa. ¿Por qué se disocian las dos hebras? Los hidroxiliones pueden reaccionar con las bases de las parejas de bases del DNA para arrancar determinados protones. El protón más susceptible es el que está unido al átomo de nitrógeno N-1 de la base guanina.



Guanina (G)

La disociación de un protón de la sustancia HA tiene una constante de equilibrio definida por la expresión

$$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$$

La posibilidad de arrancar un protón, al reaccionar con una base, está regulada por el valor de pK_a :

$$pK_a = -\log(K_a)$$

Cuando el pH es igual al pK_a , tenemos

$$pH = pK_a$$

Y también

$$-\log[H^+] = -\log[H^+][A^-]/[HA]$$

y

$$[H^+] = [H^+][A^-]/[HA]$$

Al dividir por $[H^+]$ resulta que

$$1 = [A^-]/[HA]$$

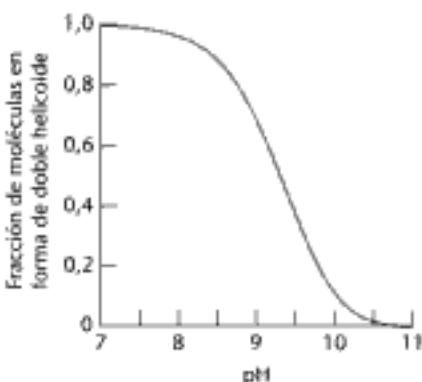


Figura 1.16 Desnaturalización del DNA por adición de una base. La adición de una base a la disolución de DNA doble helicoidal, empezando a pH 7 hace que la doble hélice se desdoble en dos hebras separadas. El proceso alcanza el 50% a un pH ligeramente superior a 9,

Y por tanto

$$[A^-] = [HA]$$

Así pues, cuando el pH es igual al pK_a , la concentración de la forma desprotonada del grupo o la molécula es igual a la concentración de la forma protonada; el proceso de desprotonación ha alcanzado la mitad del total.

El pK_a para el protón situado en N-1 de la guanina es precisamente 9,7. Cuando el pH alcanza este valor, el protón de N-1 se pierde (Figura 1.16). Debido a que este protón participa en un puente de hidrógeno importante, su pérdida desestabiliza fuertemente la doble hélice del DNA. Esta doble hélice también se desestabiliza a pH bajo. Por debajo del pH 5, algunos de los *aceptores* de puentes de hidrógeno que participan en el emparejamiento de bases quedan protonados. En sus formas protonadas estas bases ya no pueden formar puentes de hidrógeno y la doble hélice se desdobra. Por consiguiente, las reacciones ácido-base que arrancan o donan protones a posiciones específicas de las bases del DNA pueden deshacer la doble hélice.

Los amortiguadores regulan el pH en los organismos y en el laboratorio

Un cambio ostensible del pH puede desorganizar la estructura molecular e iniciar reacciones lesivas. Por consiguiente, los seres vivos han evolucionado para amortiguar los cambios de pH en los sistemas biológicos. Las disoluciones que frenan tales cambios se llaman *amortiguadoras* (también conocidas como *tampones* o “buffers”). Concretamente, cuando se añade un ácido a una disolución acuosa no amortiguada, el pH desciende en proporción al total de ácido añadido. Por el contrario, cuando se añade un ácido a una disolución tamponada el pH desciende de forma más gradual. Los amortiguadores también frenan el aumento del pH causado por la adición de una base.

Compararemos el resultado de añadir una disolución 1M del ácido fuerte HCl, gota a gota, al agua pura con la adición a una disolución que contenga un amortiguador de acetato sódico 0,1 M ($\text{Na}^+ \text{CH}_3\text{COO}^-$; Figura 1.17). El proceso de añadir gradualmente cantidades conocidas de un reactivo a una disolución con la que reacciona mientras se registran los resultados se llama *valoración* o *titulación*. Para el agua pura, el pH cae desde 7 hasta 2 al añadir las primeras gotas de ácido. En cambio, para la disolución de acetato sódico, el pH cae al principio rápidamente, desde el valor inicial, próximo a 10, después cambia más gradualmente hasta que el pH alcanza 3,5 y entonces disminuye otra vez rápidamente.

Se puede analizar el efecto del amortiguador en términos cuantitativos. La constante de equilibrio para la desprotonación de un ácido es

$$K_a = [\text{H}^+][\text{A}^-]/[\text{HA}]$$

Tomando logaritmos de ambos miembros de la ecuación

$$\log (K_a) = \log ([\text{H}^+]) + \log ([\text{A}^-]/[\text{HA}])$$

Sustituyendo los valores correspondientes y reordenando se obtiene

$$\text{pH} = pK_a + \log ([\text{A}^-]/[\text{HA}]).$$

Esta expresión se conoce como *ecuación de Henderson-Hasselbalch*.

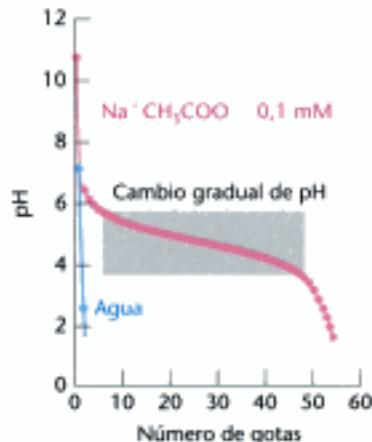


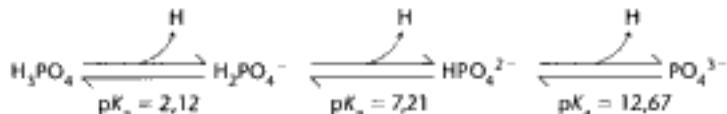
Figura 1.17 Acción amortiguadora. La adición de un ácido fuerte, HCl 1 M, en el agua pura produce una caída inmediata del pH hasta cerca de un valor de pH de 2. Por el contrario, la adición del ácido a una disolución de acetato sódico 0,1 M ($\text{Na}^+ \text{CH}_3\text{COO}^-$) origina un cambio de pH mucho más gradual, hasta que el pH alcanza 3,5, y entonces disminuye otra vez rápidamente.

Se puede aplicar la ecuación a la valoración del acetato sódico. El pK_a del ácido acético es 4,75. Para calcular la razón de la concentración de ácido acético como una función del pH, se utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbalch, ligeramente reorganizada

$$[\text{Ion acetato}]/[\text{Ácido acético}] = [\text{A}^-]/[\text{AH}] = 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}$$

A pH 9, esta razón es aproximadamente 18 000; se ha formado muy poco ácido acético. A pH 4,75 (cuando el pH iguala al pK_a) la razón es 1. A pH 3 la razón es aproximadamente 0,02; casi todo el ion acetato se ha convertido en ácido acético. La conversión del ion acetato en ácido acético se puede seguir durante toda la valoración (Figura 1.18). El gráfico muestra que la región de pH relativamente constante corresponde precisamente a la región en que el ion acetato se protona y forma ácido acético.

De la discusión presente se puede observar que los amortiguadores funcionan de forma óptima en los valores del pK_a de su componente ácido. El pH fisiológico está situado cerca de 7,4. Un amortiguador importante en los sistemas biológicos se basa en el ácido fosfórico (H_3PO_4). El ácido puede desprotonarse en tres etapas para formar un ion fosfato.



A valores de pH próximos a 7,4 el fosfato inorgánico existe como una mezcla aproximadamente igual a H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} . Por consiguiente, las disoluciones de fosfato actúan como amortiguadores efectivos a ese pH. La concentración de fosfato inorgánico en la sangre es aproximadamente 1 mM constituyendo un amortiguador útil contra los procesos que generan tanto ácidos como bases.

1.4 La revolución genómica está transformando la Bioquímica y la Medicina

El descubrimiento de Watson y Crick sobre la estructura del DNA sugirió la hipótesis de que la información hereditaria se almacenaba como una secuencia de bases a lo largo de las hebras del DNA. Esta novedosa visión supuso un modo de pensar completamente nuevo sobre la biología. No obstante, al tiempo que se hacía este descubrimiento lleno de consecuencias potenciales, en la práctica resultaban poco claras. Unas cuestiones tremadamente fundamentales permanecían sin respuesta. ¿Es correcta la hipótesis? ¿Cómo se lee la secuencia de información y cómo se traduce? ¿Cómo son las secuencias de las moléculas de DNA que se presentan habitualmente y cómo se pueden determinar experimentalmente? Gracias a los avances en bioquímica y otras ciencias afines ahora tenemos respuestas prácticamente completas a estas cuestiones. De hecho, en la última década, los científicos han determinado las secuencias del genoma completo de centenares de organismos diferentes, incluyendo microorganismos sencillos, plantas, animales de diversos grados de complejidad y seres humanos. Las comparaciones de estas secuencias genómicas, mediante los métodos introducidos en el capítulo 6, han aportado nuevas visiones de muchos aspectos de la bioquímica. Gracias a estos logros, la bioquímica se ha transformado. Además de sus aspectos experimentales y clínicos, la bioquímica se ha convertido en una *ciencia de la información*.

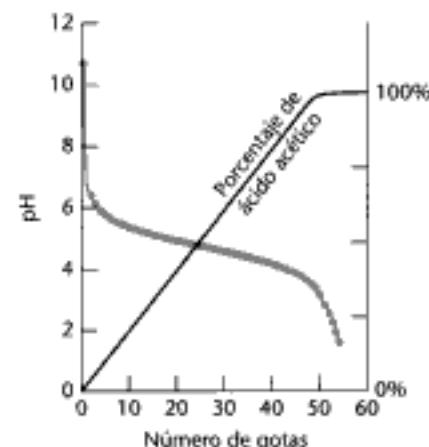


Figura 1.18. Protonación del amortiguador. Cuando se añade un ácido a la disolución del acetato sódico, los iones hidrógeno se utilizan para convertir el acetato en ácido acético. Como la concentración de protones no aumenta significativamente, el pH permanece relativamente constante hasta que todo el acetato se ha convertido en ácido acético.

La secuenciación del genoma humano es un hito en la historia de la humanidad

El secuenciado del genoma humano era un trabajo desalentador, ya que consta de aproximadamente tres mil millones (3×10^9) de pares de bases. Así, por ejemplo, la secuencia

```
ACATTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTC  
AAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGT  
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGA...
```

es una parte de uno de los genes que codifica la hemoglobina, el transportador de oxígeno de nuestra sangre. Este gen se localiza hacia el final del cromosoma 9, entre nuestros 24 cromosomas diferentes. Si incluyésemos la secuencia completa de nuestro genoma, este capítulo rebasaría las 500 000 páginas. La secuenciación de nuestro genoma es realmente un hito en la historia humana. Esta secuencia contiene una cantidad enorme de información, parte de la cual podemos ahora extraer e interpretar, y con otra gran parte que sólo estamos empezando a comprender. Así, por ejemplo, algunas enfermedades humanas se han vinculado a variaciones particulares de la secuencia genómica. La anemia falciforme, estudiada en detalle en el capítulo 7, se produce por el simple cambio de una A (destacada en negrita en la secuencia precedente) por una T. Encontraremos muchos otros ejemplos de enfermedades debidas a cambios específicos de la secuencia de DNA.

La secuencia genómica, además de tener implicaciones en la comprensión de la salud y enfermedades humanas, es fuente de un profundo conocimiento en otros aspectos de la biología y cultura humanas. Así, por ejemplo, al comparar las secuencias de los diferentes individuos y poblaciones podemos averiguar muchísimo sobre la historia de la humanidad. Basándose en estos análisis se puede concluir que la especie humana se originó en África y se puede demostrar la existencia, y aun las épocas, de las migraciones importantes de los grupos humanos. Por último, la comparación del genoma humano con los de otros organismos está confirmado la tremenda unidad que existe a nivel bioquímico y revela las etapas clave que han ocurrido en el curso de la evolución desde los organismos unicelulares relativamente simples hasta los organismos pluricelulares tan complejos como los seres humanos. Por ejemplo, muchos genes clave para la función del cerebro humano y del sistema nervioso tienen un parentesco evolutivo y funcional que puede reconocerse en el genoma bacteriano. Estos descubrimientos tienen muchas implicaciones prácticas: por ejemplo, experimentos que resultarían difíciles o no éticos en humanos, pueden realizarse en otros organismos modelo. La *Genómica comparativa* se ha convertido en una ciencia poderosa que une la evolución y la bioquímica.

Las secuencias del genoma codifican las proteínas y los patrones de expresión

La estructura del DNA reveló cómo se almacena la información en la secuencia de bases contenida en la hebra. Pero, ¿cómo se almacena esta información y cómo se expresa? La función más importante del DNA consiste en codificar las secuencias de las proteínas. Al igual que el DNA, las proteínas son polímeros lineales. Sin embargo, las proteínas se diferencian del DNA en dos aspectos importantes. Primero, las proteínas se construyen a partir de 20 monómeros, llamados *aminoácidos*, en vez de sólo cuatro monómeros, los que configuran el DNA. La complejidad química aportada por esa variedad de monómeros capacita a las proteínas para realizar una amplia gama de funciones. Segundo, las proteínas se pliegan espontáneamente en elaboradas estructuras tridimensionales determinadas únicamente por su secuencia de

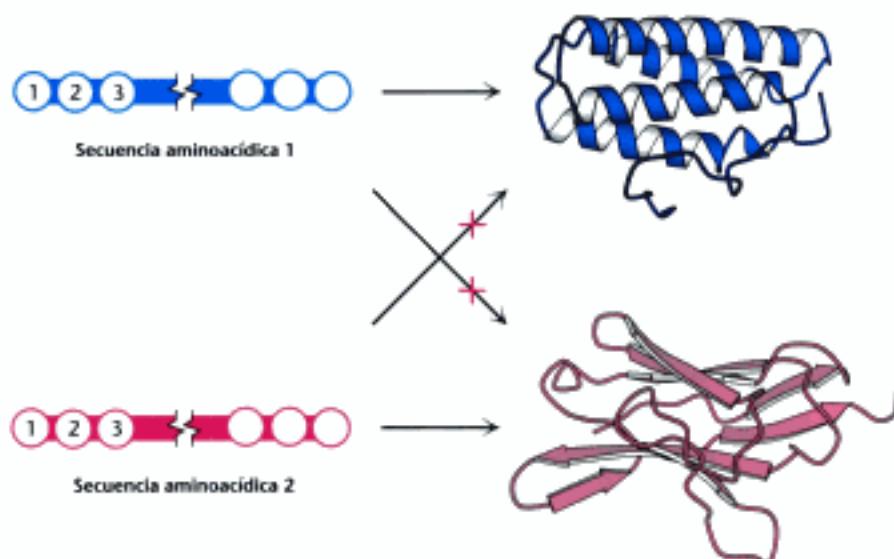


Figura 1.19 Plegado de las proteínas. Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos que se pliegan en estructuras complejas. La secuencia aminoacídica determina la estructura tridimensional. Así, la secuencia aminoacídica 1 origina sólo una proteína con la forma descrita en azul y no la descrita en rojo.

aminoácidos (Figura 1.19). Anteriormente se ha descrito extensamente cómo las hebras complementarias de DNA en disolución se juntan y forman una disolución de moléculas en doble helicoide. Un proceso similar de plegamiento espontáneo confiere a las proteínas su estructura tridimensional. Un conjunto de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas compensan la perdida de entropía al pasar de un conjunto de proteínas desplegadas a una serie homogénea de moléculas correctamente plegadas. Las proteínas y su plegado se estudiarán en extenso en el Capítulo 2.

A medida que aumenta nuestro conocimiento sobre las complejidades de la genética y la genómica se hace más difícil definir con precisión la unidad fundamental de la información genética, el *gen*. Los genes más fáciles de definir son los que codifican las secuencias de las proteínas: en estos genes, un conjunto de bases del DNA codifica la secuencia de aminoácidos de una molécula proteica específica. El *codón*, una serie de tres bases de la cadena, determina la identidad de un aminoácido dentro de la secuencia proteica. La relación que vincula la secuencia del DNA con la secuencia de la proteína que codifica se llama *código genético*. Una de las sorpresas mayores surgidas en la secuenciación del genoma humano es el pequeño número de genes que codifican proteínas. Antes de que comenzase el proyecto de secuenciar el genoma humano, se suponía que nuestro genoma incluiría unos 100 000 genes codificadores de proteínas. Los análisis realizados sugieren que el número verdadero oscila entre 20 000 y 25 000. En todo este libro utilizaremos el valor estimado de 25 000. Sin embargo, existen mecanismos adicionales que permiten que muchos genes codifiquen más de una proteína. Así, por ejemplo, la información genética de algunos genes se traduce en más de una forma produciéndose una serie de proteínas con secuencias aminoacídicas que difieren en parte; o en otros casos, las proteínas sufren modificaciones después de su síntesis mediante la adición de grupos químicos accesorios. Mediante estos mecanismos indirectos, nuestro genoma codifica mucha más diversidad de la que sería de esperar únicamente a partir del número de genes que codifican las proteínas.

Sobre la base de nuestro conocimiento actual, las regiones que codifican proteínas abarcan solamente un 3% del genoma humano. ¿Cuál es la función del resto del DNA? Parte de él contiene la información que regula la expresión de genes específicos (es decir, la producción de proteínas específicas) en tipos celulares particulares y en condiciones fisiológicas concretas. En esencia, cada célula contiene el mismo genoma, pero los tipos celulares difieren considerablemente en las proteínas que producen. Así, por ejemplo, la hemoglobina sólo se expresa en las células pre-

cursoras de los glóbulos rojos, aunque los genes para la hemoglobina están presentes en todas las otras células. Series específicas de genes se expresan como respuesta a hormonas, aunque estos genes no se expresan en las mismas células en ausencia de tales hormonas. Las regiones control que regulan tales diferencias ocupan un pequeño conjunto de nuestro genoma restante. La verdad es que aún no se comprenden todas las funciones de gran parte del DNA. Parte de él parecen ser "pegotes", tiras de DNA insertadas en algún estadio de la evolución y que allí han permanecido. En algunos casos, este DNA puede, de hecho, desarrollar funciones importantes. En otros puede no tener función, y puesto que no produce perjuicio alguno, así se ha quedado.

La individualidad personal depende de la relación entre los genes y el entorno

Con la excepción de los gemelos monozigóticos (llamados "ídénticos") cada persona tiene una secuencia única de pares de bases de DNA. ¿Qué diferencias genómicas se presentan entre un individuo y otro? Un examen de la variación en el genoma revela que, como promedio, entre cada par de personas hay una diferencia de bases de uno por mil, es decir que la diferencia es aproximadamente del 0,1%. Esta diferencia entre individuos es sustancial si se compara con las diferencias entre poblaciones. Por consiguiente, la diferencia media entre dos personas del mismo grupo étnico es mayor que la diferencia entre los valores medios de dos grupos étnicos diferentes.

Todavía no se conoce la significación de gran parte de esta variación genética. Como se ha anotado antes, la variación de una sola base del genoma puede conducir a enfermedades como la anemia falciforme. Se han identificado más de 100 enfermedades asociadas a variaciones genéticas, en las que el origen puede determinarse por un solo gen. En el caso de otras enfermedades o rasgos, se sabe que las causan las variaciones en un número variable de genes. Muchas de las enfermedades humanas más prevalentes, tales como las enfermedades cardíacas, están vinculadas a las variaciones de muchos genes. Además, en la mayoría de los casos, una variación particular o una serie de variaciones no dan como resultado inevitable la aparición de una enfermedad, sino que llevan a una *predisposición* al desarrollo de la misma.

Además de estas diferencias genéticas, son importantes los *factores epigenéticos*. Estos factores están asociados al genoma pero su importancia no subyace únicamente en la secuencia del DNA. Así, por ejemplo, el hecho de heredar el gen inusual del padre o de la madre puede tener consecuencias muy distintas. Este fenómeno, conocido como *impronta genética*, consiste en modificaciones covalentes del DNA, particularmente en la adición de grupos metilo a determinadas bases, que afectan a su expresión. La epigenética es un campo de estudio muy activo del que se esperan muchos nuevos descubrimientos.

Aunque nuestra composición genética y nuestras características epigenéticas asociadas son factores importantes que afectan a la susceptibilidad a enfermedades y a otros rasgos, los factores del entorno personal son también significativos. ¿Cuáles son estos factores ambientales? Quizás los más obvios sean las sustancias químicas a que hemos sido expuestos o que hemos ingerido. El refrán "dime lo que comes y te diré quién eres" tiene una validez considerable; hace referencia tanto a sustancias que ingerimos en magnitudes significativas como aquellas que ingerimos sólo en trazas. A través del estudio de la bioquímica, encontraremos *vitaminas* y *elementos traza* y sus derivados que ejercen funciones cruciales en muchos procesos. En muchos casos, las funciones de estos compuestos se han descubierto mediante investigaciones de *síndromes de deficiencia* observados en la población que no toma una cantidad suficiente de una vitamina o un elemento traza determinados. A pesar de que las vitaminas y elementos traza más importantes se conocen desde ya hace cierto tiempo, se continúan descubriendo nuevas funciones de estos componentes esenciales de la dieta.

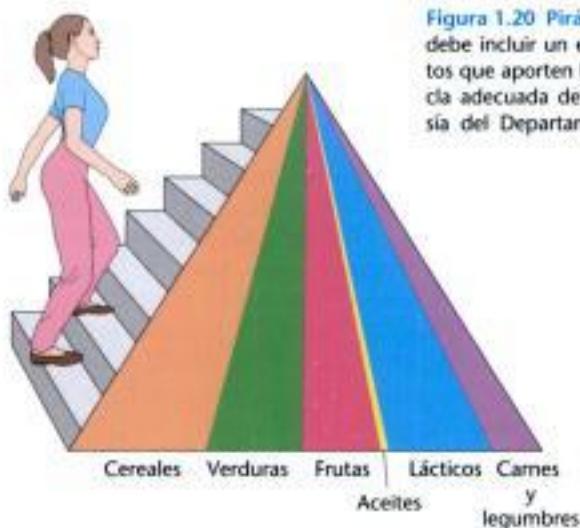


Figura 1.20 Pirámide alimenticia. Una dieta sana debe incluir un equilibrio de un grupo de alimentos que aporten las calorías apropiadas y una mezcla adecuada de monómeros precursores. [Cortesía del Departamento de Agricultura de EE.UU.]

Una dieta saludable requiere un equilibrio de los principales grupos alimenticios (Figura 1.20). Además de aportar vitaminas y elementos traza (oligoelementos), la comida suministra calorías en forma de sustancias que pueden degradarse y liberar la energía necesaria para conducir otros procesos bioquímicos. Las proteínas, las grasas y los carbohidratos aportan los precursores para la síntesis de las moléculas de la vida. Los seres humanos evolucionaron bajo circunstancias en las que escaseaba la comida, en especial los alimentos valiosos, como la carne. Con el desarrollo de la agricultura y las economías modernas, los alimentos valiosos abundan en algunas partes del mundo. Algunas de las enfermedades endémicas del “mundo desarrollado”, tales como las cardíacas y la diabetes, pueden atribuirse a la gran cantidad de grasas y carbohidratos presentes en las dietas modernas. Ahora se está desarrollando una comprensión más profunda de las consecuencias bioquímicas de estas dietas y de la relación entre dieta y factores genéticos.

Las sustancias químicas son sólo uno de los factores ambientales importantes. Las conductas que adoptamos también tienen consecuencias bioquímicas. A través de la actividad física se consumen las calorías ingeridas y se asegura un adecuado equilibrio entre ingesta alimenticia y liberación de energía. Actividades tan variadas como el ejercicio físico o las respuestas emocionales, como el miedo o el amor, pueden activar vías bioquímicas específicas que crean cambios en los niveles de expresión génica, en la liberación de hormonas u otras consecuencias. Así, por ejemplo, algunos descubrimientos recientes revelan que unos niveles altos de estrés están asociados al acortamiento de los telómeros, las estructuras de los extremos de los cromosomas. Además, la interrelación entre bioquímica y comportamiento es bidireccional. Así como nuestra bioquímica se ve afectada por nuestro comportamiento, también nuestra conducta se ve influida, aunque de manera ciertamente no determinada por completo, por nuestra composición genética y otros aspectos de nuestra bioquímica. Los factores genéticos asociados con la gama de características del comportamiento se van identificando, de forma aún incierta.

Del mismo modo que las deficiencias de vitaminas y las enfermedades genéticas revelaron principios fundamentales de la bioquímica y la biología, las investigaciones de las variaciones en la conducta y su vinculación a factores genéticos y bioquímicos son fuentes potenciales de gran interés acerca de los mecanismos del interior del cerebro. Así, por ejemplo, los estudios de adicción a las drogas han revelado circuitos neurológicos y vías bioquímicas que influyen grandemente en el comportamiento. Desentrañar la relación entre biología y conducta es uno de los grandes desafíos de la ciencia moderna y la bioquímica aporta algunos de los conceptos e instrumentos más importantes en este sentido.

APÉNDICE: Representación de las estructuras moleculares I. Moléculas pequeñas

Los autores de textos de bioquímica se enfrentan al problema de tener que representar las moléculas que son tridimensionales en las dos dimensiones disponibles en una página impresa. La interacción entre las estructuras tridimensionales de las biomoléculas y sus funciones biológicas se estudiará extensamente en este libro. Con este fin, usaremos con frecuencia representaciones que, aunque por necesidad están dispuestas en dos dimensiones, resaltan la estructura tridimensional de las moléculas.

Representaciones estereoquímicas

La mayor parte de las fórmulas químicas de este texto están dibujadas para representar la disposición geométrica de los átomos, esenciales para el enlace químico y la actividad, con tanta precisión como ha sido posible. Así, por ejemplo, el átomo de carbono del metano tiene hibridación sp^3 tetraédrica, con ángulos de enlace H–C–H de 109,5 grados, mientras que el átomo de carbono en el formaldehído presenta hibridación sp^2 , con ángulos de enlace de 120 grados.



Para representar la *estereoquímica* correcta de un átomo de carbono, utilizaremos cuñas para indicar la dirección de un enlace hacia dentro o hacia fuera del plano de la página. Una cuña con el extremo ancho lejos del carbono denota un enlace dirigido hacia el espectador, fuera del plano. Una cuña de trazos, con el extremo ancho del enlace hacia el carbono representa un enlace dirigido lejos del espectador hacia dentro del plano de la página. Los otros dos enlaces se representan como líneas rectas.

Proyecciones de Fischer

Si bien son una representación más fiel de la estructura real del compuesto, las estructuras estereoquímicas son a menudo difíciles de dibujar con rapidez. Un método alternativo de representar estructuras con centros de carbonos tetraédricos, son las *proyecciones de Fischer*.



En una proyección de Fischer, los enlaces con el carbono central se representan con líneas verticales y horizontales desde los átomos de los sustituyentes al átomo de carbono, el cual se supone que se encuentra en el centro de la cruz. Por convenio, se acepta que los enlaces horizontales se proyectan hacia el espectador, fuera de la página. Mientras que los enlaces verticales se supone que se dirigen detrás de la página, lejos del espectador. El glosario de compuestos que se encuentra al final del libro es un glosario estructural de las moléculas clave en bioquímica, cada una representada de dos maneras: con ángulos de enlace estereoquímicamente precisos y como una proyección de Fischer.

Modelos moleculares para moléculas pequeñas

Para representar la arquitectura molecular de moléculas pequeñas con más detalle se utilizan con frecuencia dos tipos de modelos: el espacial compacto y el de esferas y varillas. Estos modelos muestran las estructuras a nivel atómico.

1. *Modelos espaciales compactos.* Estos modelos espaciales son los más realistas. El tamaño y la posición de un átomo en el espacio en un modelo espacial compacto están determinadas por las propiedades de sus enlaces y el radio de van der Waals, o distancia de contacto. Un radio de van der Waals describe lo cerca que pueden estar dos átomos cuando no están unidos por un enlace covalente. Los colores del modelo se establecen por convenio.

Carbono, negro Hidrógeno, blanco Nitrógeno, azul
Oxígeno, rojo Azufre, amarillo Fósforo, morado

En la Figura 1.21 se muestran modelos espaciales compactos de algunas moléculas simples.

2. Modelo de esferas y varillas. Los modelos de esferas y varillas no son tan realistas como los modelos espaciales, porque los átomos se representan como esferas de radios más pequeños que sus radios de van der Waals. Sin embargo, el ordenamiento de los enlaces es más fácil de ver porque están representados explícitamente por varillas. En un dibujo, la coincidencia de la varilla, representando un paralelo, nos indica cuál de los átomos enlazados está más próximo al observador. Un modelo de esferas y varillas representa una estructura compleja con mayor claridad que un modelo espacial. En la figura 1.21 se representan varias moléculas simples mediante los modelos de esferas y varillas.

Los modelos moleculares para describir moléculas mayores se estudiarán en el apéndice del capítulo 2.

Términos clave

macromolécula biológica (p. 2)
metabolito (p. 2)

ácido desoxirribonucleico (DNA) (p. 2)
proteína (p. 2)

Eukarya (p. 3)
Bacteria (p. 3)

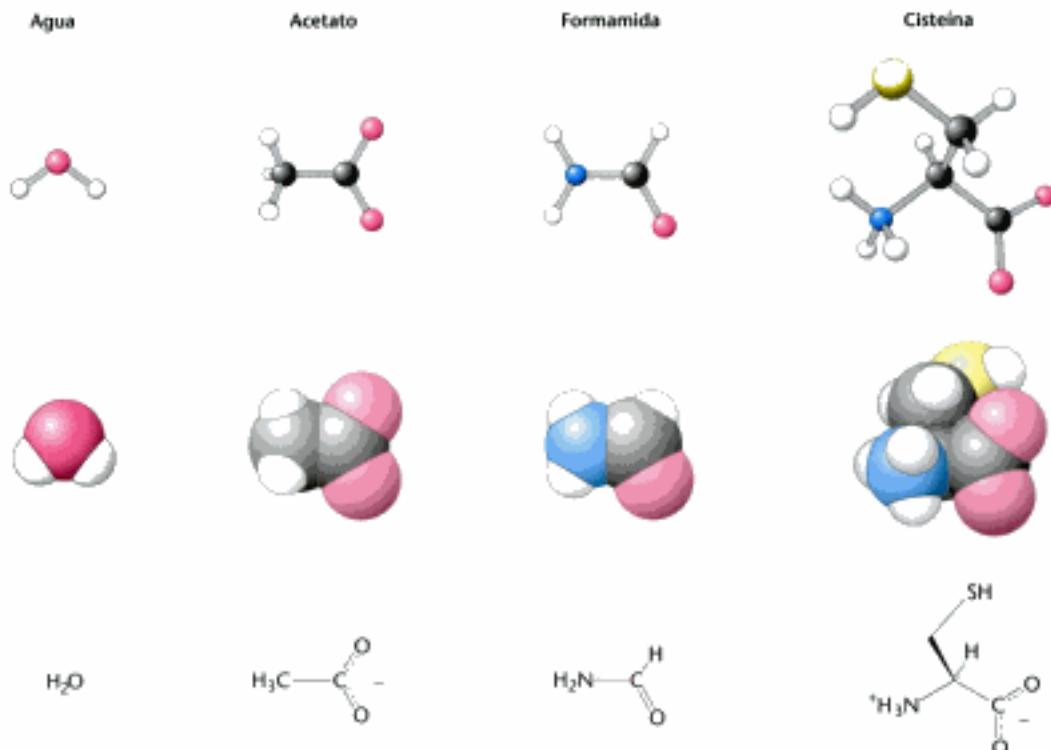


Figura 1.21 Representaciones moleculares. Se muestran las fórmulas estructurales (abajo), las espaciales compactas (en medio) y los modelos de esferas y vainas (arriba) de moléculas seleccionadas. Negro = carbono, rojo = oxígeno, blanco = hidrógeno, amarillo = azufre, azul = nitrógeno.

Archaea (p. 3)
eucariota (p. 3)
procariota (p. 3)
doble helicoide (p. 5)
enlace covalente (p. 7)
estructura resonante (p. 7)
interacción electrostática (p. 7)

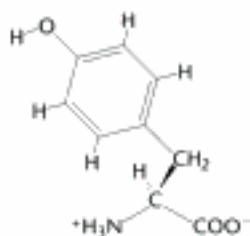
puente de hidrógeno (p. 8)
interacción de van der Waals (p. 8)
efecto hidrofóbico (p. 9)
entropía (p. 11)
entalpía (p. 11)
energía libre (p. 12)
pH (p. 14)

pK_a (p. 15)
amortiguador (p. 16)
aminoácido (p. 18)
código genético (p. 19)
predisposición (p. 20)

Problemas

1. *Dadores y aceptores.* Identificar los dadores y aceptores de hidrógeno en cada una de las cuatro bases de la página 4.

2. *Estructuras resonantes.* Se muestra la estructura de un aminoácido, la tirosina. Dibujar una estructura resonante alternativa.



3. *Toma de todos los tipos.* ¿Qué tipos de enlaces no covalentes mantienen unidos los siguientes sólidos?

(a) Sal de cocina (NaCl), que contiene los iones Na^+ y Cl^- .
(b) Grafito (C), que consiste en láminas de átomos de carbono unidas covalentemente.

4. *Sin saltarse la ley.* Dados los siguientes valores para los cambios de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS) ¿Cuáles de los siguientes procesos podrán ocurrir a 298 K cumpliendo la Segunda Ley de la Termodinámica?

- (a) $\Delta H = -84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-20 \text{ kcal mol}^{-1}$),
 $\Delta S = +125 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ($+30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
- (b) $\Delta H = -84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-20 \text{ kcal mol}^{-1}$),
 $\Delta S = -125 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ($-30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
- (c) $\Delta H = +84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+20 \text{ kcal mol}^{-1}$),
 $\Delta S = +125 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ($+30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
- (d) $\Delta H = +84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+20 \text{ kcal mol}^{-1}$),
 $\Delta S = -125 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ($-30 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

5. *Entropía en la formación del doble helicoide.* En la formación del doble helicoide puede medirse su ΔG que resulta ser -54 kJ mol^{-1} ($-13 \text{ kcal mol}^{-1}$) a pH 7,0 en una disolución de NaCl 1 M a 25°C (298K). El calor liberado indica un cambio de entropía de -251 kJ mol^{-1} ($-60 \text{ kcal mol}^{-1}$). Calcular el cambio de entropía para el proceso y para el universo.

6. *Calcular el pH.* ¿Cuáles son los valores de pH de las siguientes disoluciones?

- (a) HCl 0,1 M
- (b) NaOH 0,1 M
- (c) HCl 0,05 M
- (d) NaOH 0,05 M

7. *Un ácido débil.* ¿Cuál es el pH de una disolución de ácido acético 0,1 M ($pK_a = 4,75$)?

(Sugerencia: Considerar que es x la concentración de hidrógeniones liberados del ácido acético cuando éste se disocia. La solución a una ecuación de segundo grado de forma $ax^2 + bx + c = 0$ es $x = [-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}] / 2a$.

8. *Calcular el pK_a .* Para un determinado ácido, HA, las concentraciones de HA y A^- son respectivamente 0,075 y 0,025, a pH 6,0. ¿Cuál es el valor de pK_a para el ácido HA?

9. *Indicador de pH.* Un colorante de naturaleza ácida que presenta colores distintos para sus formas protonada y desprotonada, puede utilizarse como indicador de pH. Suponer que tenemos una disolución 0,001 M del colorante cuyo pK_a es 7,2. Según el color se deduce que la concentración de la forma protonada es 0,0002 M. Suponer que el resto del colorante está en forma desprotonada. ¿Cuál es el valor del pH de la disolución?

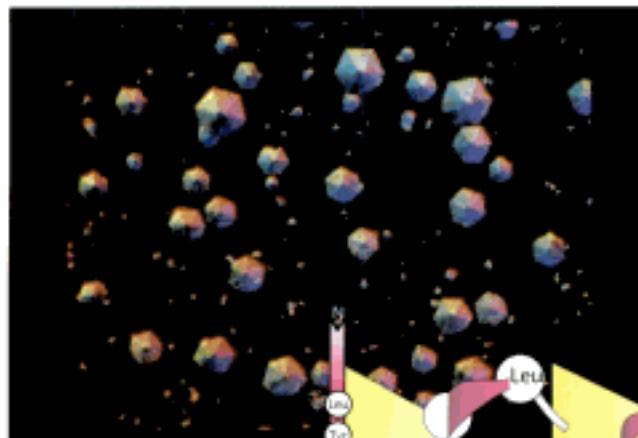
10. *¿Cuál es la razón?* Un ácido con un pK_a de 8,0 está presente en una disolución de pH 6,0. ¿Cuál es la razón entre las formas protonada y desprotonada del ácido?

11. *Amortiguador de fosfatos.* ¿Cuál es la razón de las concentraciones de $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} a (a) pH 7,0; (b) pH 7,5; (c) pH 8,0?

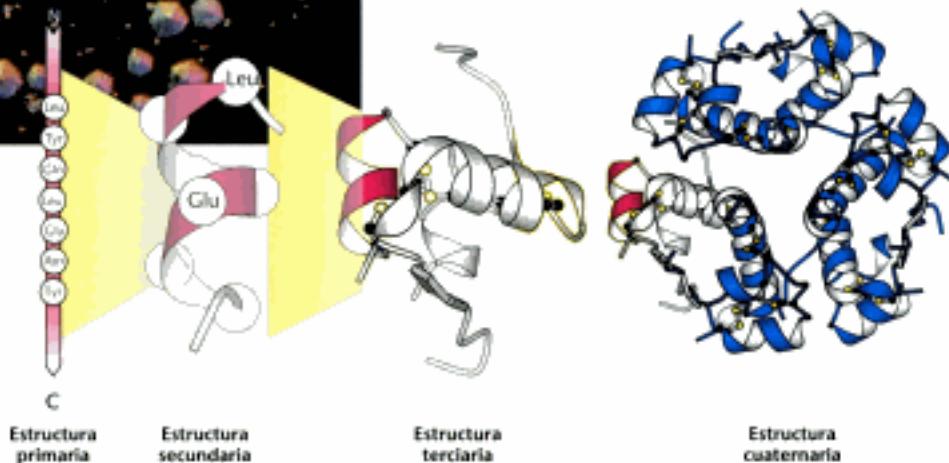
12. *Capacidad amortiguadora.* Se preparan dos disoluciones de acetato sódico con una concentración 0,1 M la primera y 0,01 M la segunda. Calcular los valores de pH cuando se les añaden las siguientes concentraciones de HCl a cada una: 0,0025 M; 0,005 M; 0,01 M y 0,05 M.

13. *¡Viva la diferencia!* En promedio, ¿cuántas bases de diferencia hay entre dos seres humanos?

Composición y estructura de las proteínas



Cristales de insulina humana. La insulina es una hormona proteica, crucial en el mantenimiento del azúcar sanguíneo a niveles apropiados. En la parte inferior de la figura se observan las cadenas de aminoácidos en una secuencia específica (la estructura primaria), que definen una proteína como la insulina. Estas cadenas se pliegan en estructuras bien definidas (la estructura terciaria): en este caso, una única molécula de insulina. Tales estructuras se enlazan con otras cadenas para formar asociaciones como el complejo de seis moléculas de insulina mostrado en el extremo derecho (la estructura cuaternaria). A menudo, se pueden inducir estas asociaciones proteicas para que formen cristales bien definidos (foto de la izquierda), lo que permite distinguir en detalle estas estructuras. [Fotografía de Alfred Pasieka/Peter Arnold.]



Las proteínas son las macromoléculas más versátiles de los seres vivos y desempeñan funciones cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos. Funcionan como catalizadores, transportan y almacenan otras moléculas como el oxígeno, proporcionan apoyo mecánico y protección inmunológica, generan movimiento, transmiten impulsos nerviosos y controlan el crecimiento y la diferenciación. De hecho, gran parte de este texto se enfocará a entender lo que hacen las proteínas y cómo realizan estas funciones.

Varias propiedades clave permiten a las proteínas participar en una gama de funciones tan amplia y variada.

1. *Las proteínas son polímeros lineales construidos a partir de monómeros llamados aminoácidos empalmados uno tras otro.* Cabe destacar que las proteínas se pliegan espontáneamente en estructuras tridimensionales que vienen determinadas por la secuencia de los aminoácidos del polímero proteico. La función de una proteína depende directamente de su estructura tridimensional (Figura 2.1). Por lo tanto, *Las proteínas son la transición desde el mundo unidimensional de las secuencias hasta el mundo tridimensional de las moléculas capaces de realizar diferentes actividades.*

2. *Las proteínas contienen un amplio surtido de grupos funcionales.* Estos grupos funcionales incluyen alcoholes, tioles, tioéteres, ácidos carboxílicos, carboxiamidas y una

Contenido

- 2.1 Las proteínas se construyen a partir de una colección de veinte aminoácidos
- 2.2 Estructura primaria: los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas
- 2.3 Estructura secundaria: las cadenas polipeptídicas se pueden plegar en estructuras regulares como la hélice alfa, la hoja plegada beta y giros y bucles
- 2.4 Estructura terciaria: las proteínas solubles en agua se pliegan en estructuras compactas con un núcleo no polar
- 2.5 Estructura cuaternaria: las cadenas de polipeptídicos pueden ensamblarse en estructuras de múltiples subunidades
- 2.6 La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional

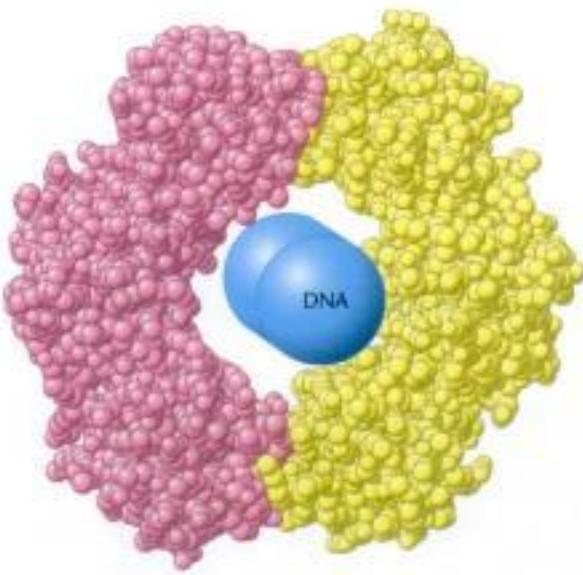


Figura 2.1 La estructura dicta la función. Una proteína componente de la maquinaria de replicación del DNA rodea una sección de la doble hélice del DNA, dibujada como un cilindro. La proteína, que consta de dos subunidades idénticas (en rojo y en amarillo), actúa como una abrazadera y permite que se copien grandes segmentos de DNA sin que la maquinaria de replicación se disocie de él. [Tomado de 2 POL.pdb.]

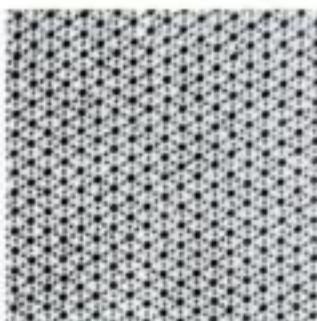


Figura 2.2 Una asociación compleja de proteínas. Micrografía electrónica de un corte del tejido de vuelo de un insecto constituido por una malla hexagonal con dos tipos de filamentos proteicos. [Cortesía del Dr. Michael Reedy.]

serie de grupos básicos. La mayoría de estos grupos son químicamente activos. Esta diversidad de grupos funcionales, combinada en distintas secuencias, es la responsable del amplio espectro de funciones de las proteínas. Por ejemplo, la reactividad química asociada con estos grupos es esencial para la función de los *enzimas*, las proteínas que catalizan reacciones químicas específicas en los sistemas biológicos (Capítulos 8–10).

3. *Las proteínas pueden interaccionar entre sí y con otras macromoléculas biológicas para formar asociaciones complejas.* Estas asociaciones pueden ser sinérgicas, de forma que se generan capacidades que no existían en los componentes proteicos individuales (Figura 2.2). Estas asociaciones incluyen maquinarias macromoleculares que llevan a cabo la replicación precisa del DNA, la transmisión de señales dentro de las células y muchos otros procesos esenciales.

4. *Algunas proteínas son muy rígidas, mientras que otras manifiestan una considerable flexibilidad.* Las unidades rígidas pueden funcionar como elementos estructurales en el citoesqueleto (el andamiaje interno dentro de las células) o en el tejido conjuntivo. Las proteínas con flexibilidad limitada pueden actuar como bisagras, muelas y palancas, que son cruciales para la función de la propia proteína, por ejemplo permitiendo el ensamblaje de proteínas entre sí y con otras moléculas para formar unidades complejas, y la transmisión de información intercelular e intracelular (Figura 2.3).

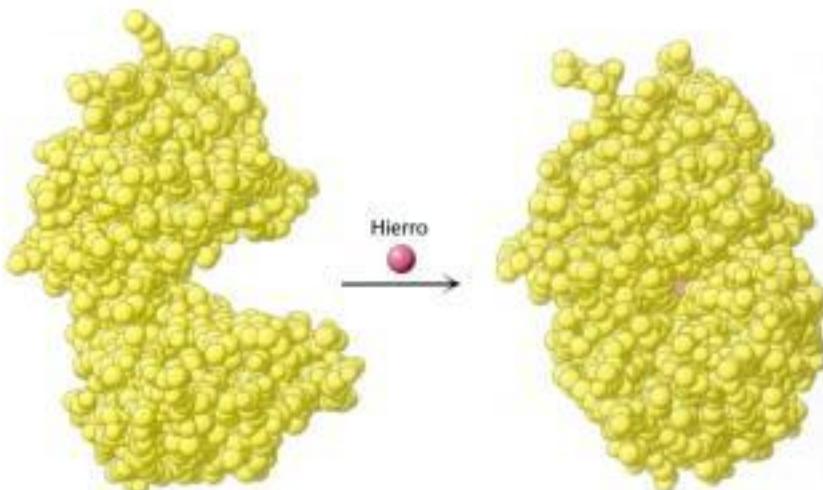


Figura 2.3 Flexibilidad y función. Al unirse al hierro, la proteína lactoferrina experimenta cambios conformacionales que permiten que otras moléculas distingan entre la forma libre y la forma unida al hierro. [Tomado de ILFM.pdb y ILFG.pdb.]

2.1 Las proteínas se construyen a partir de una colección de veinte aminoácidos

Los aminoácidos son los constituyentes de las proteínas. Un α -aminoácido consiste en un átomo de carbono central, llamado el *carbono α* , unido a un grupo amino, un grupo ácido carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo R característico. El grupo R se denomina habitualmente *cadena lateral*. Como existen cuatro grupos diferentes conectados al átomo de carbono α , los α -aminoácidos son *quirales*; las dos formas especulares se llaman isómero L e isómero D (Figura 2.4).

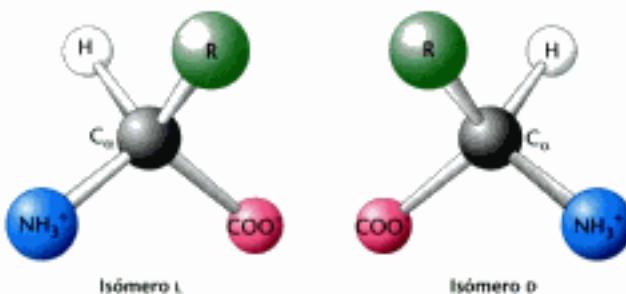


Figura 2.4 Los Isómeros L y D de los aminoácidos. R se refiere a la cadena lateral. Los isómeros L y D son imágenes especulares entre sí.

Solamente los L-aminoácidos constituyen las proteínas. Para casi todos los aminoácidos, el isómero L tiene configuración absoluta S (y no R) (Figura 2.5). Aunque se ha empleado un enorme esfuerzo para entender por qué los aminoácidos en las proteínas tienen esta configuración absoluta, todavía no se ha llegado a una explicación satisfactoria. Parece probable que la selección de L sobre D fuese arbitraria, pero una vez realizada, se fijó temprano en la historia evolutiva.

Los aminoácidos en disolución a pH neutro existen predominantemente como *iones dipolares* (también llamados *zwitteriones*). En la forma dipolar, el grupo amino está protonado ($-\text{NH}_3^+$) y el grupo carboxílico desprotonado ($-\text{COO}^-$). El estado de ionización de un aminoácido varía con el pH (Figura 2.6). En disolución ácida (por ejemplo, pH 1), el grupo amino está protonado ($-\text{NH}_3^+$) y el grupo car-

boxílico es desprotonado ($-\text{COO}^-$). A medida que el pH aumenta, el grupo amino se desprotona y el grupo carboxílico se protona. Alrededor del pH fisiológico (pH 7), la forma zwitteriónica es la predominante. A pH 14, ambos grupos están desprotonados y la forma es anfóterica.

Regla para distinguir estereoisómeros

Los cuatro sustituyentes diferentes de un átomo de carbono asimétrico tienen asignada una prioridad de acuerdo con sus números atómicos de forma que la prioridad de los sustituyentes será S > O > N > C > H. El sustituyente de prioridad más baja, a menudo el hidrógeno, se orienta en dirección contraria al observador. La configuración alrededor del carbono se llama S, del latín *síster* (izquierda), si la dirección de la progresión de los sustituyentes de mayor a menor prioridad es contraria a las agujas del reloj. La configuración se conoce como R, del latín *rectus* (derecha), si la progresión es en el sentido de las agujas del reloj.

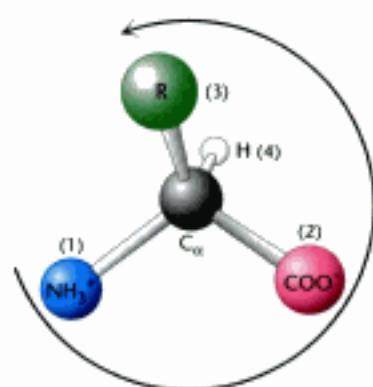


Figura 2.5 En las proteínas sólo se encuentran L-aminoácidos. Casi todos los L-aminoácidos tienen una configuración absoluta S (del latín *sinister*, que significa izquierda). La dirección contraria a las agujas del reloj de los sustituyentes de mayor a menor prioridad indica que el centro quiral es, salvo en la cisteína, de configuración S.

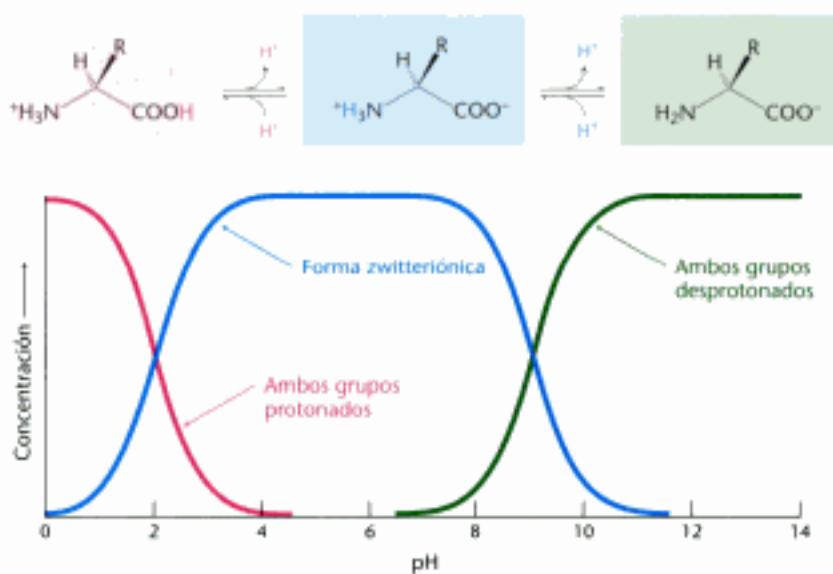


Figura 2.6 El estado de ionización como función del pH. El estado de ionización de los aminoácidos se altera por un cambio en el pH. Cerca del pH fisiológico predominante la forma zwitteriónica.

boxilo no está disociado ($-COOH$). Cuando se eleva el pH, el grupo carboxílico es el primero en ceder un protón, ya que su pK_a es cercano a 2. La forma dipolar persiste hasta que el pH se acerca a 9, cuando el grupo amino protonado pierde un protón.

En las proteínas se encuentran habitualmente 20 tipos de cadenas laterales que varían en *tamaño, forma, carga, capacidad de formar puentes de hidrógeno, carácter hidrofóbico y reactividad química*. De hecho, todas las proteínas de todas las especies –bacterias, árqueas y eucariotas– se construyen con los mismos 20 aminoácidos con unas pocas excepciones. Este alfabeto fundamental de las proteínas tiene varios miles de millones de años de antigüedad. La extraordinaria variedad de funciones realizadas por las proteínas es el resultado de la diversidad y versatilidad de estos 20 sillares de construcción. Conocer cómo se utiliza este alfabeto para crear las intrincadas estructuras tridimensionales que permiten a las proteínas llevar a cabo tantos procesos biológicos es un área apasionante de la bioquímica a la que volvemos en la Sección 2.6.

Fijémonos en este repertorio de aminoácidos. El más sencillo es la *glicina*, que tiene solamente un átomo de hidrógeno como cadena lateral. Con dos átomos de hidrógeno unidos al átomo de carbono α , la glicina es especial al ser el único aminoácido *quiral*. La *alanina*, el siguiente aminoácido en sencillez, tiene un grupo metilo ($-CH_3$) como cadena lateral (Figura 2.7).

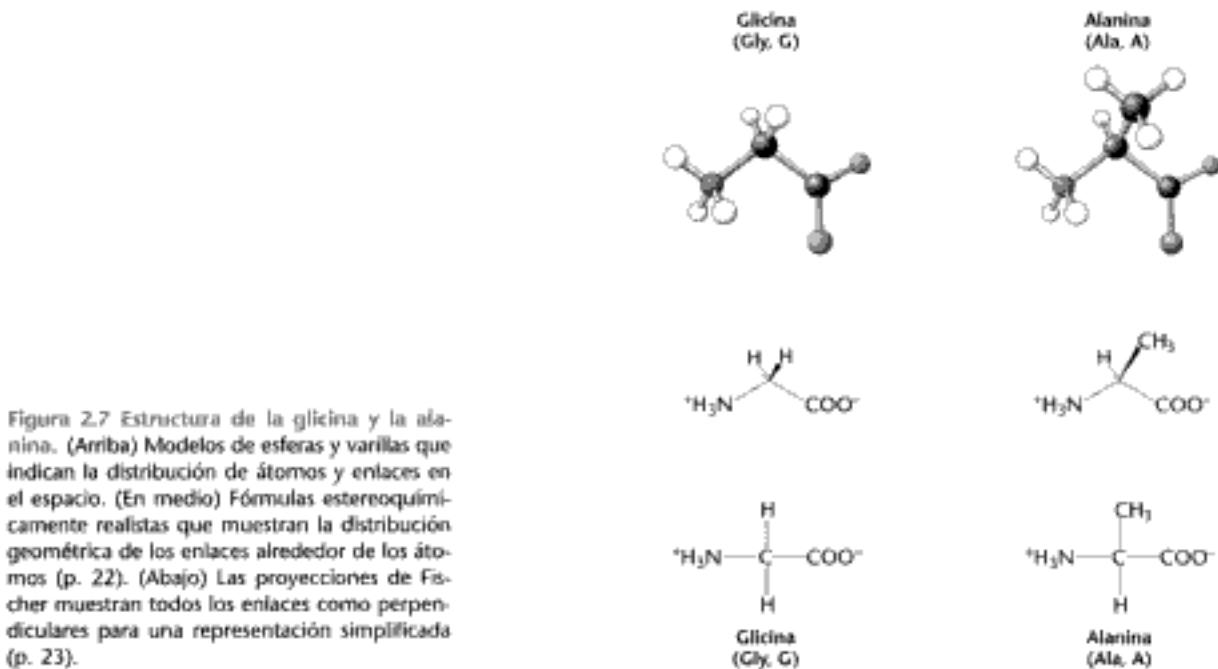


Figura 2.7 Estructura de la glicina y la alanina. (Arriba) Modelos de esferas y varillas que indican la distribución de átomos y enlaces en el espacio. (En medio) Fórmulas estereoquímicamente realistas que muestran la distribución geométrica de los enlaces alrededor de los átomos (p. 22). (Abajo) Las proyecciones de Fischer muestran todos los enlaces como perpendiculares para una representación simplificada (p. 23).

La *Valina*, la *leucina* y la *isoleucina* tienen cadenas laterales hidrocarbonadas de mayor tamaño (Figura 2.8). La *metionina* contiene una cadena lateral alifática larga que incluye un grupo *tióéter* ($-S-$). La cadena lateral de la *isoleucina* incluye un centro quiral adicional; sólo el isómero que se muestra en la Figura 2.8 se encuentra en las proteínas. Las cadenas laterales alifáticas grandes son *hidrofóbicas*; es decir, tienden a agruparse entre ellas en vez de establecer contactos con el agua. La estructura tridimensional de las proteínas solubles en agua se estabiliza por esta tendencia de los grupos hidrofóbicos a agruparse, lo que se conoce como *efecto hidrofóbico* (p. 9). Los diferentes tamaños y formas de estas cadenas laterales hidrocarbonadas les permiten empaquetarse para formar estructuras compactas con pocas cavidades. La *prolina* también tiene una cadena lateral alifática, pero difiere de los otros miembros del repertorio de 20 en que su cadena lateral está unida tanto al átomo de nitrógeno como

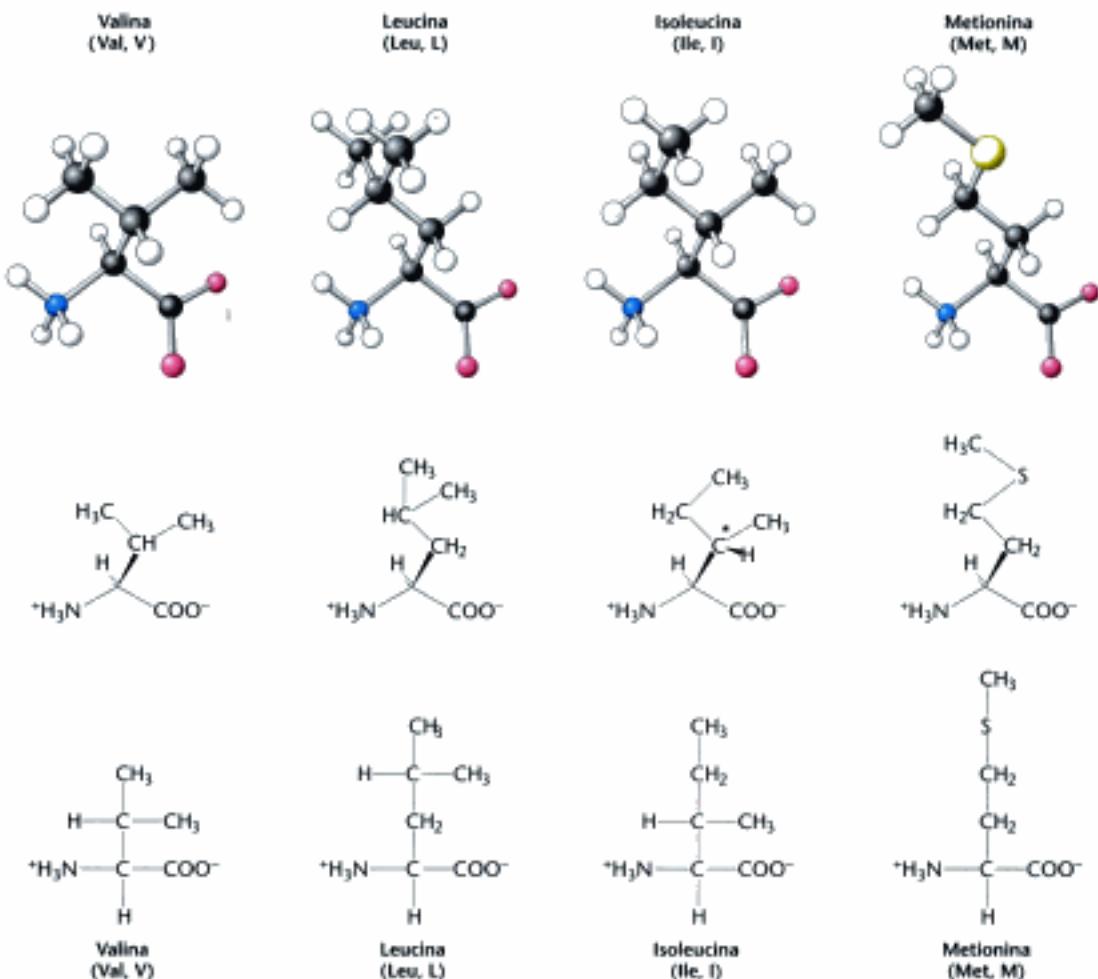


Figura 2.8 Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas. El centro quiral adicional de la isoleucina se indica con un asterisco.

al carbono α (Figura 2.9). La prolina influye notablemente en la arquitectura proteica debido a que su estructura en anillo produce una restricción conformacional superior al resto de aminoácidos.

Tres aminoácidos con *cadenas laterales aromáticas* relativamente sencillas forman parte del repertorio fundamental (Figura 2.10). La *fenilalanina*, como su propio nombre indica, contiene un anillo fenílico sustituyendo a uno de los hidrógenos de la alanina. El anillo aromático de la *tirosina* contiene un grupo hidroxilo. Este grupo hidroxilo es reactivo, contrariamente a las cadenas laterales relativamente inertes de los otros aminoácidos citados hasta ahora. El *triptófano* tiene un anillo indol unido

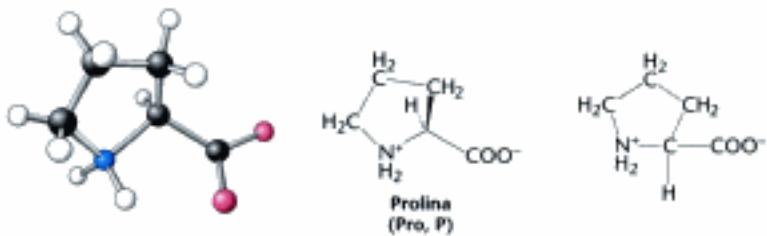


Figura 2.9 Estructura cíclica de la prolina. La cadena lateral está unida tanto al carbono α como al grupo amino.

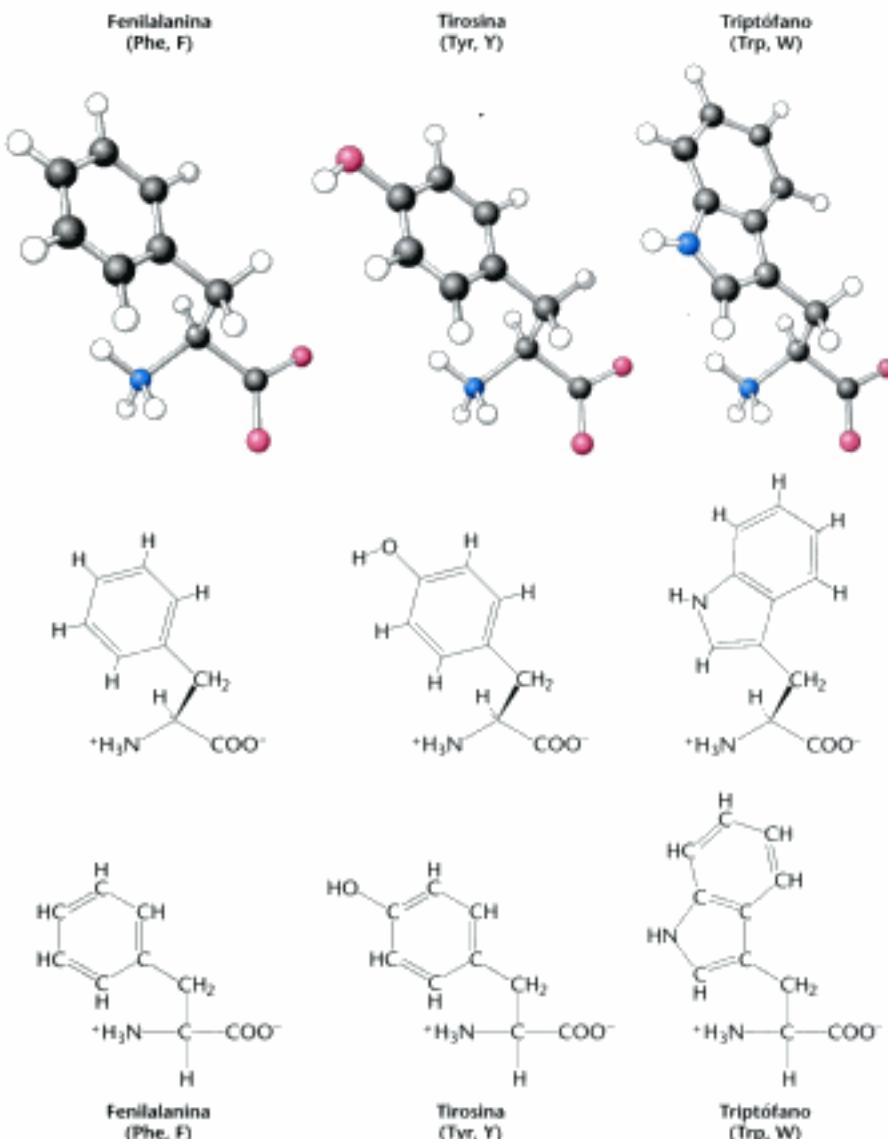


Figura 2.10 Aminoácidos con cadenas laterales aromáticas. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano tienen carácter hidrofóbico. La tirosina y el triptófano también tienen propiedades hidrofilicas debido a sus grupos -OH y -NH₂, respectivamente.

a un grupo metíleno ($-\text{CH}_2-$); el grupo indol consiste en dos anillos fundidos que incluyen un grupo NH.

Cinco aminoácidos son polares pero sin carga. Dos aminoácidos, la *serina* y la *treonina* contienen grupos hidroxilo alifáticos ($-\text{OH}$) (Figura 2.11). La serina se puede considerar como una versión hidroxilada de la alanina, mientras que la treonina se asemeja a la valina con un grupo hidroxilo en lugar de uno de los grupos metilo de la valina. Los grupos hidroxilo de la serina y de la treonina les hacen mucho más hidrofilicos y reactivos que la alanina y la valina. La treonina, al igual que la isoleucina, contiene un centro asimétrico adicional; de nuevo sólo se encuentra uno de los isómeros en las proteínas.

Además, la serie incluye la *asparragina* y la *glutamina*, los derivados sin carga de los aminoácidos ácidos aspartato y glutamato (Figura 2.15). Cada uno de estos dos aminoácidos contiene un grupo terminal *carboxiamida* en vez del carboxilo ácido (Figura 2.12). La cadena lateral de la glutamina tiene un grupo metíleno más que la asparragina.

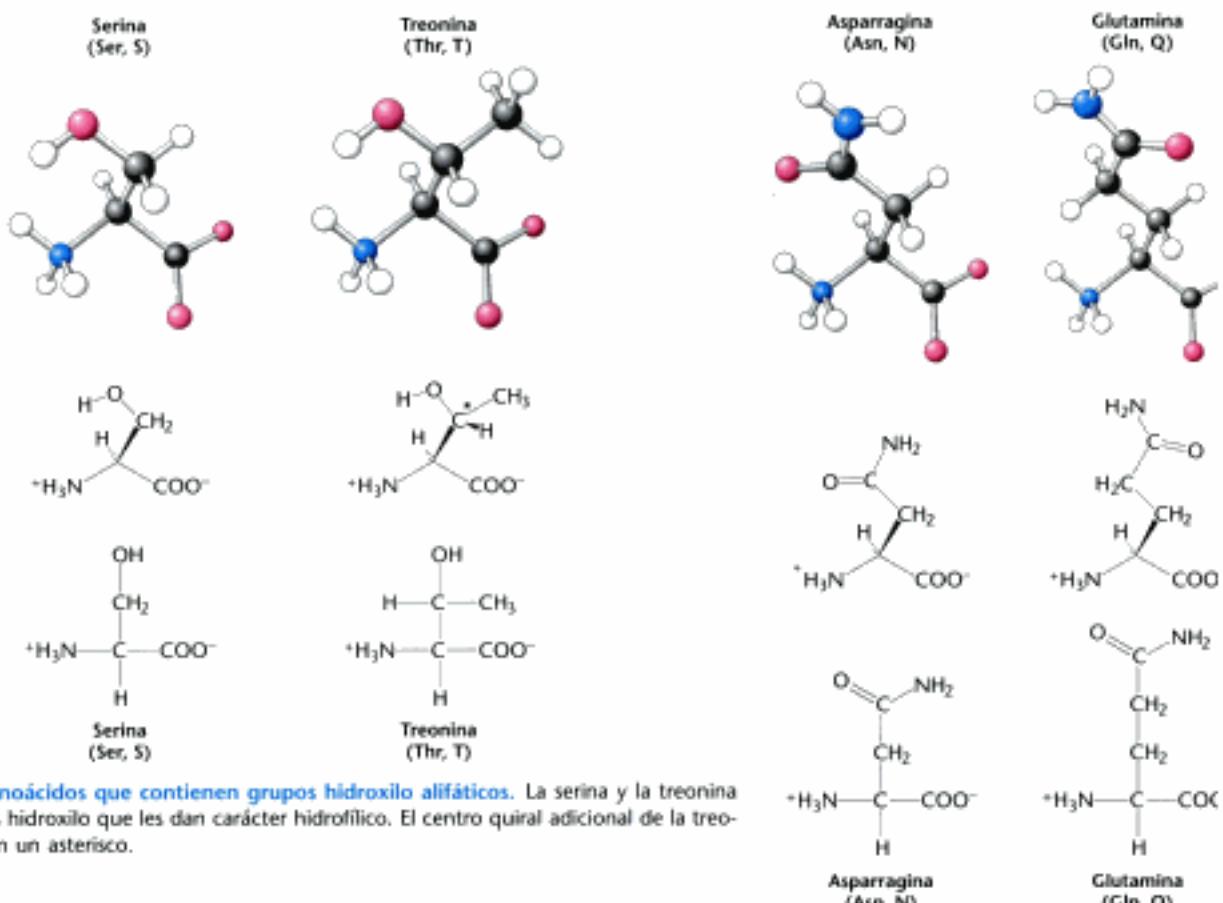


Figura 2.11 Aminoácidos que contienen grupos hidroxilo alifáticos. La serina y la treonina contienen grupos hidroxilo que les dan carácter hidrofílico. El centro quiral adicional de la treonina se indica con un asterisco.

La *cisteína* es estructuralmente similar a la serina, pero contiene un *sulfhidrilo*, o grupo tiol ($-SH$), en lugar del grupo hidroxilo ($-OH$) (Figura 2.13). El grupo sulfhidrilo es mucho más reactivo. Parejas de grupos sulfhidrilo se pueden juntar para formar enlaces disulfuro, que son especialmente importantes en la estabilización de algunas proteínas, como se verá enseguida.

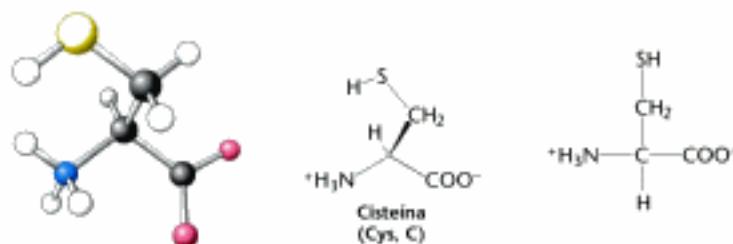
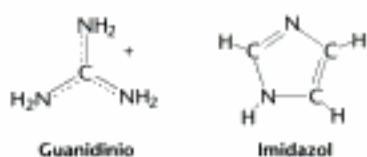


Figura 2.13 Estructura de la cisteína.

Pasamos ahora a los aminoácidos con cadenas laterales muy polares que les convierten en altamente hidrofílicos. La *lisina* y la *arginina* tienen cadenas laterales relativamente largas que acaban en grupos *cargados positivamente* a pH neutro. La lisina está rematada por un grupo amino primario y la arginina por un grupo guanidinio. La *histidina* contiene un grupo imidazol, un anillo aromático que también puede estar cargado positivamente (Figura 2.14).

Con un valor de pK' cercano a 6, el grupo imidazol puede estar sin carga o cargado positivamente en las proximidades del pH neutro, dependiendo del entorno local (Figura 2.15). Por ello, la histidina se encuentra a menudo en los centros activos enzimáticos, donde el anillo de imidazol puede unir y liberar protones durante las reacciones que se dan en ellos.

Figura 2.12 Estructura de la asparragina y la glutamina, dos aminoácidos polares que contienen el grupo carboxiamida.



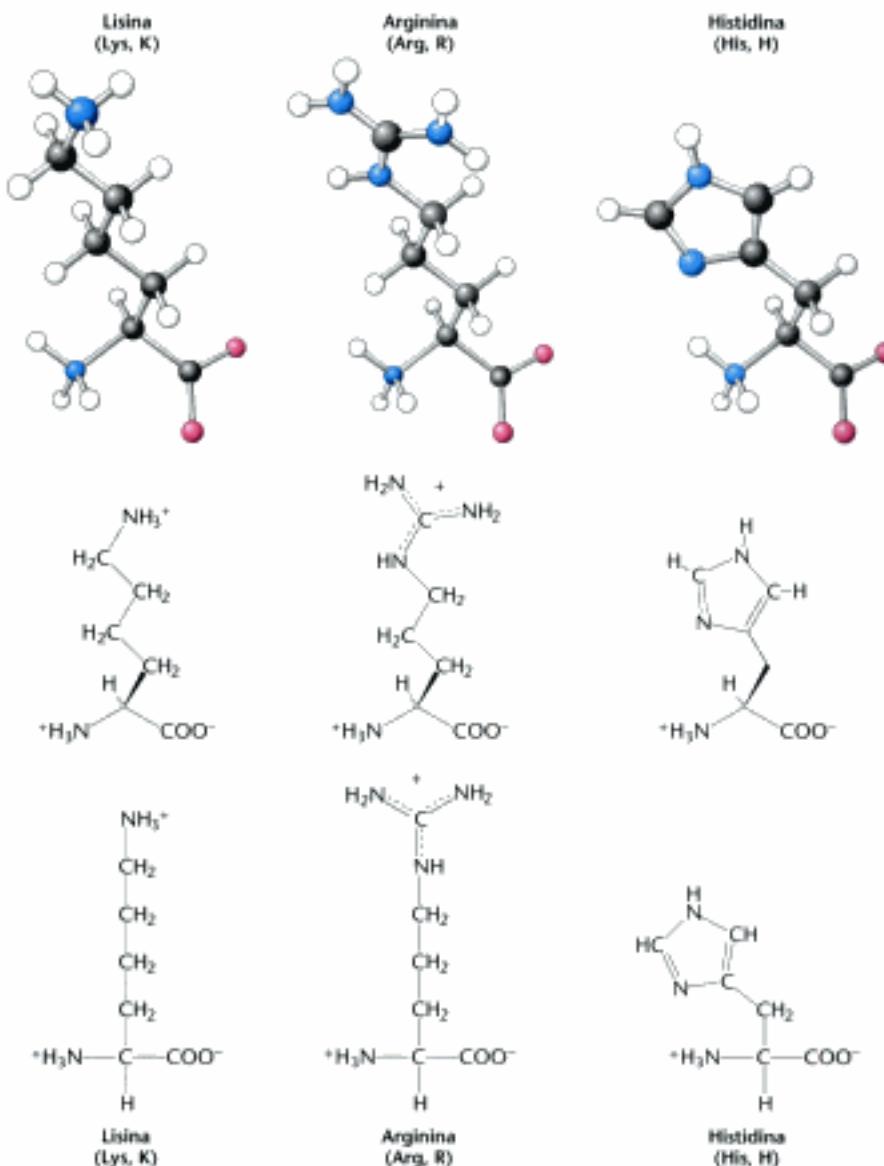


Figura 2.14 Los aminoácidos básicos: lisina, arginina e histidina.

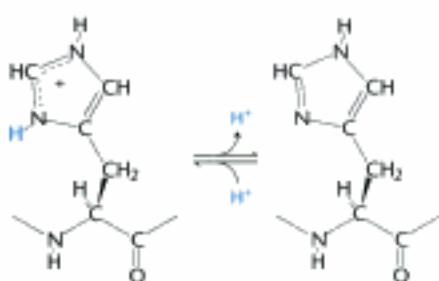


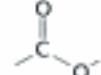
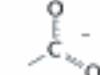
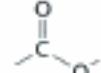
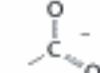
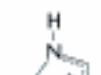
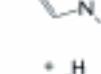
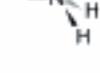
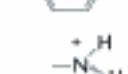
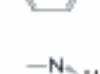
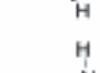
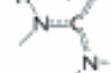
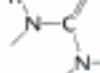
Figura 2.15 Ionización de la histidina. La histidina puede captar o liberar protones alrededor del pH fisiológico.

El conjunto de aminoácidos también incluye dos con *cadenas laterales acídicas*: el *ácido aspártico* y el *glutámico* (Figura 2.16). Estos aminoácidos se conocen habitualmente como *aspartato* y *glutamato* para resaltar que sus cadenas laterales a pH fisiológico pierden un protón del ácido y por ello están cargadas negativamente a pH fisiológico. Sin embargo, en algunas proteínas estas cadenas laterales aceptan protones, y esta capacidad resulta normalmente de importancia funcional.

Siete de los 20 aminoácidos tienen cadenas laterales fácilmente ionizables. Estos 7 aminoácidos son capaces de donar o aceptar protones para facilitar reacciones, así como para formar enlaces iónicos. La Tabla 2.1 muestra los equilibrios y los valores típicos de pK_a para la ionización de las cadenas laterales de la tirosina, la cisteína, la arginina, la lisina, la histidina y los ácidos aspártico y glutámico en las proteínas. Otros dos grupos se pueden ionizar en las proteínas: los α -amino y α -carboxilo terminales y sus valores típicos de pK_a se incluyen también en la Tabla 2.1.

Los aminoácidos se designan a menudo por una abreviatura de tres letras o bien por símbolos de una (Tabla 2.2). Las abreviaturas para los aminoácidos son las primeras tres letras de sus nombres ingleses, excepto para la asparragina (Asn), la glutamina (Gln), la isoleucina (Ile) y el triptófano (Trp). Los símbolos para muchos de

TABLA 2.1 Valores característicos del pK_a de los grupos ionizables de las proteínas

Grupo	Ácido	Base	pK_a^* característico
Grupo α -carboxilo terminal			3,1
Ácido aspártico			4,1
Ácido glutámico			
Histidina			6,0
Grupo α -amino terminal			8,0
Cisteína			8,3
Tirosina			10,9
Lisina			10,8
Arginina			12,5

* Los valores de pK_a dependen de la temperatura, la fuerza iónica y el microentorno del grupo ionizable.

los aminoácidos son las primeras letras de sus nombres (p. ej., G para glicina y L para leucina). Los otros símbolos se han acordado por convención. Estas abreviaciones y símbolos son una parte integrante del vocabulario de los bioquímicos.

 ¿Cómo este conjunto específico de aminoácidos llegó a ser el grupo de precursores de las proteínas? En primer lugar, como conjunto son variados; sus propiedades químicas y estructurales abarcan un amplio abanico, lo que proporciona a las proteínas una versatilidad que les permite asumir diversas funcionalidades. En segundo término, probablemente muchos de estos aminoácidos se podían encontrar

2.1 Las proteínas se construyen a partir de una colección de 20 aminoácidos

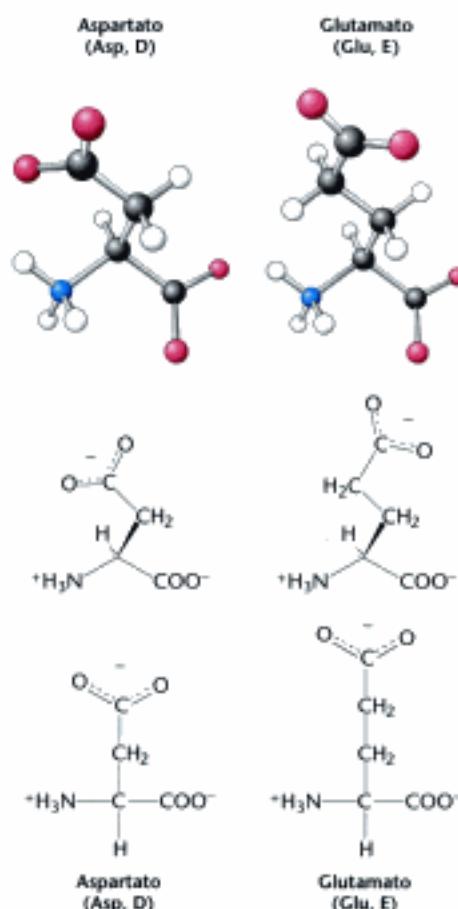
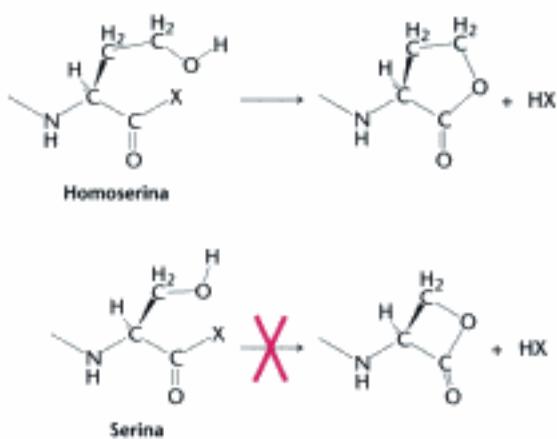


Figura 2.16 Aminoácidos con carboxilatos en la cadena lateral

TABLA 2.2 Abreviaturas de los aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra	Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A	Metionina	Met	M
Arginina	Arg	R	Fenilalanina	Phe	F
Asparagina	Asn	N	Prolina	Pro	P
Ácido aspártico	Asp	D	Serina	Ser	S
Cisteína	Cys	C	Treonina	Thr	T
Glutamina	Gln	Q	Triptófano	Trp	W
Ácido glutámico	Glu	E	Tirosina	Tyr	Y
Glicina	Gly	G	Valina	Val	V
Histidina	His	H	Aspárragina o ácido aspártico	Asx	B
Isoleucina	Ile	I	Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina	Leu	L			
Lisina	Lys	K			

Figura 2.17 Reactividad indeseable en aminoácidos. Algunos aminoácidos son inapropiados para las proteínas debido a su ciclación indeseada. La homoserina se puede ciclar en un anillo estable de cinco miembros, lo que puede romper el enlace peptídico. La ciclación de la serina formaría un anillo tenso de cuatro miembros y, por lo tanto, desfavorable. X puede ser un grupo amino de un aminoácido vecino u otro grupo químico potencial.



disponibles en reacciones prebióticas, es decir, en reacciones que tuvieron lugar antes del origen de la vida. En último término, otros aminoácidos podrían no haber sido seleccionados debido a su excesiva reactividad intrínseca. Por ejemplo, aminoácidos tales como la homoserina y la homocisteína tienden a adoptar formas cíclicas de cinco átomos que limitarían su uso en las proteínas; los aminoácidos alternativos que se encuentran en proteínas –la serina y la cisteína– no se ciclan fácilmente, porque los anillos que adoptan en su forma cíclica son demasiado pequeños (Figura 2.17).

2.2 Estructura primaria: los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas

Las proteínas son *polímeros lineales* formados por la unión del grupo α -carboxilo de un aminoácido al grupo α -amino de otro aminoácido. Este tipo de unión se llama *enlace peptídico* (o también *enlace amida*). La formación de un dipéptido a partir de dos aminoácidos se acompaña por la pérdida de una molécula de agua (Figura 2.18). El equilibrio en esta reacción está más desplazado hacia la hidrólisis que hacia la síntesis. Por ello, la biosíntesis de los enlaces peptídicos requiere un aporte de energía libre. No obstante, los enlaces peptídicos son muy *estables cinéticamente*; el tiempo de vida de un enlace peptídico en disolución acuosa en ausencia de un catalizador es cercano a los 1000 años.

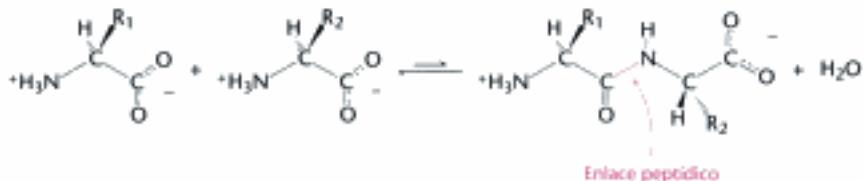


Figura 2.18 Formación del enlace peptídico. La unión de dos aminoácidos se acompaña de la pérdida de una molécula de agua.

Una serie de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos forman una *cadena polipeptídica* y cada unidad aminoacídica de un polipéptido se denomina *residuo*. Una *cadena polipeptídica tiene polaridad* porque sus extremos son diferentes, con un grupo α -amino en un extremo y un grupo α -carboxilo en el otro. Por convención, el *extremo amino terminal se considera que es el comienzo de la cadena polipeptídica*, por lo que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica se escribe comenzando con este residuo. Así, en el pentapéptido Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

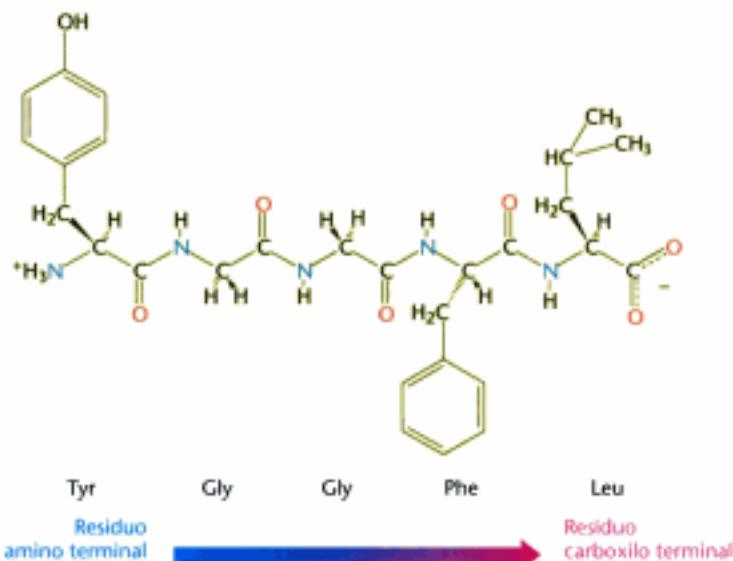


Figura 2.19 Las secuencias de aminoácidos tienen dirección. Esta ilustración del pentapéptido Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL) muestra la secuencia desde el amino terminal hasta el carboxilo terminal. Este pentapéptido, Leu-encefalina, es un péptido opioide que modula la percepción del dolor. El pentapéptido inverso, Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr (LFGGY) es una molécula diferente que no muestra tales efectos.

(YGGFL), la tirosina es el residuo aminoterminal (N-terminal) y la leucina es el residuo carboxiterminal (C-terminal) (Figura 2.19). Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr (LFGGY) es un pentapéptido diferente, con propiedades químicas distintas.

Una cadena polipeptídica consta de una parte repetida regularmente, llamada la *cadena principal* o *esqueleto*, y una parte variable constituida por las *cadenas laterales* características (Figura 2.20). El esqueleto polipeptídico es potencialmente rico en capacidad de formar puentes de hidrógeno. Cada residuo contiene un grupo carbonilo ($C=O$), que es un buen acceptor en puentes de hidrógeno y, con la excepción de la prolina, un grupo NH que es buen dador en puentes de hidrógeno. Estos grupos interaccionan entre sí y con grupos funcionales de las cadenas laterales para estabilizar estructuras particulares, como se verá con detalle en la Sección 2.3.

La mayoría de cadenas polipeptídicas naturales contienen entre 50 y 2000 residuos de aminoácidos y se conocen como *proteínas*. La mayor proteína conocida es una proteína muscular, la *titina*, que contiene más de 27 000 aminoácidos. Los péptidos consistentes en un pequeño número de aminoácidos se llaman *oligopéptidos* o simplemente *péptidos*. El peso molecular medio de un residuo de aminoácido es aproximadamente 110 g mol^{-1} , por lo que el peso molecular de la mayor parte de las proteínas está entre 5500 y $220\,000 \text{ g mol}^{-1}$. Nos podemos referir también a la masa de una proteína, que se simboliza en unidades de daltons; un *dalton* equivale a una unidad de masa atómica. Una proteína con un peso molecular de $50\,000 \text{ g mol}^{-1}$ tiene una masa molecular de $50\,000$ daltons o 50 kd (kilodaltons).

En algunas proteínas la cadena polipeptídica lineal posee enlaces transversales. Los entrecruzamientos más habituales son los *puentes disulfuro*, que se forman por

Dalton

Unidad de masa casi igual a la del átomo de hidrógeno. Nombrada así en honor de John Dalton (1766–1844) que desarrolló la teoría atómica de la materia.

Kilodalton (kd ó kDa)

Unidad de masa equivalente a 1.000 daltons.

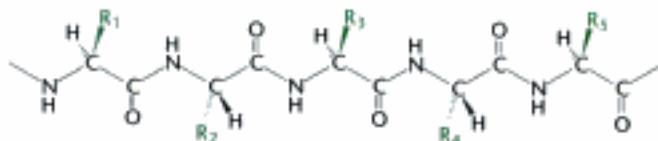


Figura 2.20 Componentes de una cadena polipeptídica. Una cadena polipeptídica consiste en un esqueleto constante (en negro) y cadenas laterales variables (en verde).

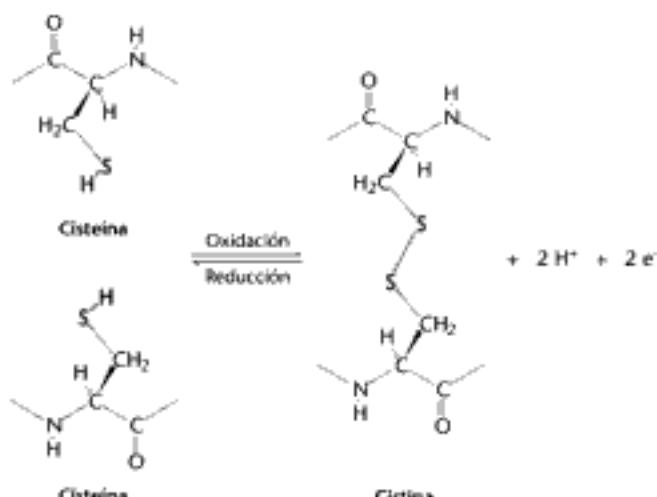


Figura 2.21 Enlaces cruzados. La formación de un enlace disulfuro a partir de dos residuos de cisteína es una reacción de oxidación.

la oxidación de un par de residuos de cisteína (Figura 2.21). El conjunto resultante de la unión de dos cisteínas se llama *cistina*. Las proteínas extracelulares tienen a menudo varios puentes disulfuro, mientras que las proteínas intracelulares normalmente no los tienen. En ocasiones, se pueden encontrar en algunas proteínas enlaces entrecruzados no-disulfuro originados por otras cadenas laterales. Por ejemplo, las fibras de colágeno en el tejido conjuntivo se refuerzan de esta forma, al igual que los coágulos sanguíneos de fibrina.

Las proteínas tienen secuencias de aminoácidos específicas determinadas por los genes

En 1953, Frederick Sanger determinó la secuencia de aminoácidos de la insulina, una hormona proteica (Figura 2.22). *Este trabajo supone un hito en la bioquímica porque demostró por primera vez que una proteína tiene una secuencia de aminoácidos definida con precisión.* Además, demostró que la insulina consta solamente de L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Este logro estimuló a otros científicos a realizar estudios de secuencias en una amplia gama de proteínas. De hecho, en la actualidad se conoce la secuencia completa de aminoácidos de más de 2 000 000 de proteínas. *El hecho excepcional es que cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos única y definida con precisión.* La secuencia de aminoácidos de una proteína se conoce a menudo como su *estructura primaria*.

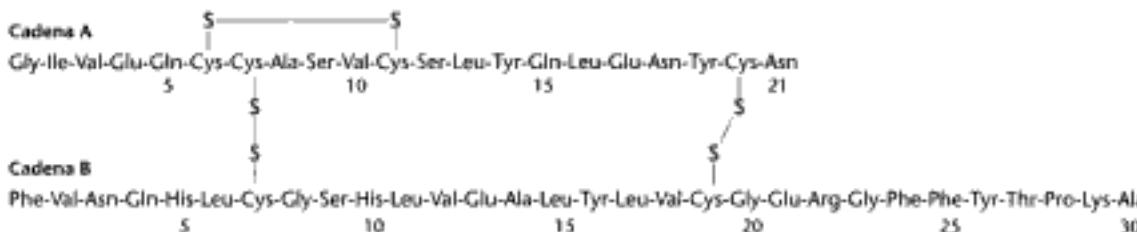


Figura 2.22 Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina.

Una serie de estudios incisivos a finales de los 50 y principios de los 60 demostraron que las secuencias de aminoácidos de las proteínas estaban determinadas genéticamente. La secuencia de nucleótidos del DNA, la molécula de la herencia, codifica una secuencia complementaria de nucleótidos en el RNA, la cual, a su vez, especifica la secuencia de aminoácidos de la proteína. En particular, cada uno de los 20 aminoácidos de la colección está codificado por una o más secuencias específicas de tres nucleótidos (Sección 5.5).

Conocer las secuencias de aminoácidos es importante por varias razones. Primero, el conocimiento de la secuencia de una proteína es normalmente esencial para averiguar su mecanismo de acción (por ejemplo, el mecanismo catalítico de un enzima). Además, se pueden generar proteínas con nuevas propiedades variando la secuencia de proteínas conocidas. Segundo, las secuencias de aminoácidos determinan las estructuras tridimensionales de las proteínas. La secuencia de aminoácidos es el enlace entre el mensaje genético en el DNA y la estructura tridimensional que desempeña la función biológica de la proteína. El análisis de las relaciones entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de las proteínas está descubriendo las reglas que gobiernan el plegamiento de las cadenas polipeptídicas. Tercero, la determinación de la secuencia es un factor importante de la patología molecular, un área de la medicina que crece rápidamente. Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden producir funciones anormales y provocar enfermedades. Algunas enfermedades graves y a veces mortales, como son la anemia falciforme (p. 195) y la fibrosis quística, se pueden producir por el cambio de un único aminoácido en la proteína. Cuarto, la secuencia de una proteína nos revela mucho sobre su historia evolutiva (Capítulo 6). Las proteínas se parecen en su secuencia de aminoácidos solamente cuando tienen un antepasado común. En consecuencia, los sucesos moleculares de la evolución se pueden indagar a partir de las secuencias de aminoácidos; la paleontología molecular es un área floreciente de investigación.

Las cadenas polipeptídicas son flexibles aunque están restringidas en su conformación

El examen de la geometría del esqueleto de una proteína revela varios rasgos importantes. Primero, el *enlace peptídico es esencialmente plano* (Figura 2.23). Por lo tanto, por cada par de aminoácidos unidos por un enlace peptídico, seis átomos están en el mismo plano: el átomo de carbono α , el grupo CO del primer aminoácido, el grupo NH y el átomo de carbono α del segundo aminoácido. Esta preferencia geométrica se explica por la naturaleza del enlace químico del péptido. El enlace peptídico tiene un *carácter parcial de doble enlace*, lo que evita la rotación a su alrededor y restringe la conformación del esqueleto polipeptídico.



Este carácter de doble enlace también se ve en la longitud del enlace entre los grupos CO y NH. La distancia C-N en un enlace peptídico es típicamente 1,32 Å, que está entre los valores esperados para un enlace C-N sencillo (1,49 Å) y un en-

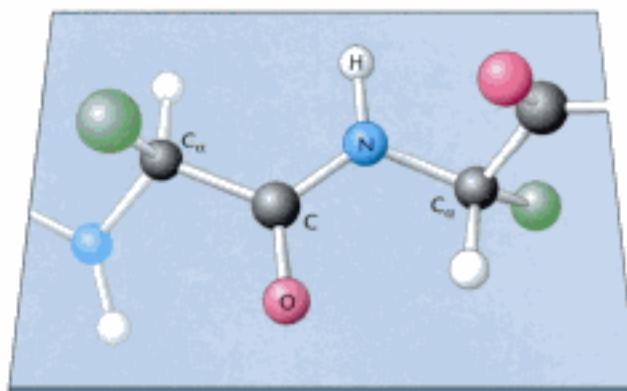


Figura 2.23 Los enlaces peptídicos son planos. En una pareja de aminoácidos unidos, seis átomos (C_{α} , C, O, N, H y C_{β}) permanecen en un mismo plano. Las cadenas laterales se muestran como esferas verdes.

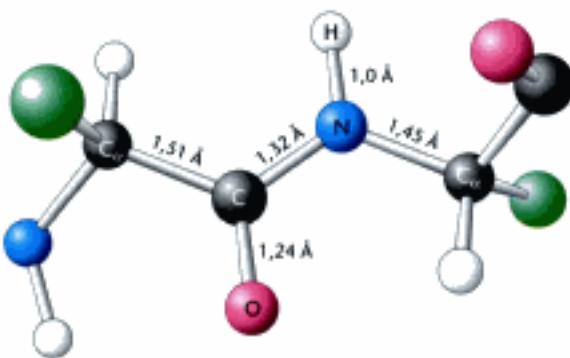


Figura 2.24 Longitudes de enlace estándar en una unidad peptídica. La unidad peptídica se muestra en la configuración *trans*.

lace C=N doble (1,27 Å), como se aprecia en la Figura 2.24. Finalmente, el enlace peptídico no tiene carga, lo que permite a los polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos formar estructuras globulares fuertemente empaquetadas.

Un enlace peptídico plano tiene dos configuraciones posibles. En la configuración *trans*, los dos átomos de carbono α están en lados opuestos del enlace peptídico. En la configuración *cis*, estos grupos están en el mismo lado del enlace peptídico. *Casi todos los enlaces en las proteínas son trans*. Esta preferencia de *trans* sobre *cis* se puede explicar por el hecho de que los choques estéricos entre los grupos unidos a los átomos de carbono α impiden la adopción de la forma *cis* mientras que no se producen en la forma *trans* (Figura 2.25). Los enlaces peptídicos *cis* más comunes son las uniones X-Pro. Dichos enlaces muestran menos preferencia por la configuración *trans* porque el nitrógeno de la prolina está unido a dos átomos de carbono tetraédricos, lo que limita las diferencias estéricas entre las formas *trans* y *cis* (Figura 2.26).

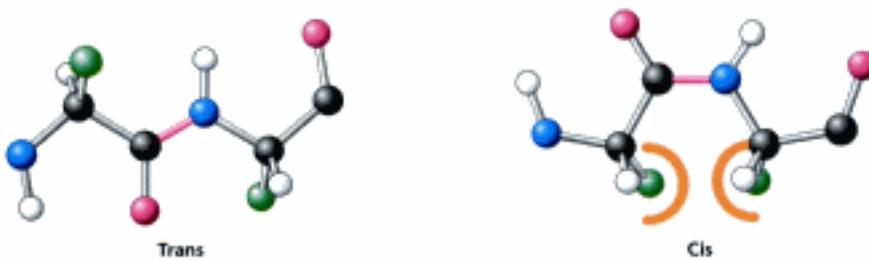


Figura 2.25 Enlaces peptídicos *cis* y *trans*. La forma *trans* está enormemente favorecida debido a los choques estéricos que se dan en la forma *cis*.

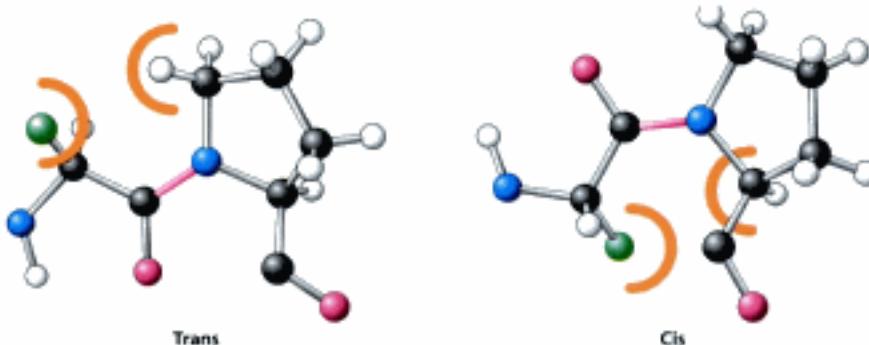


Figura 2.26 Enlaces X-Pro *cis* y *trans*. Las energías de estas formas son semejantes porque los choques estéricos se producen en las dos conformaciones.

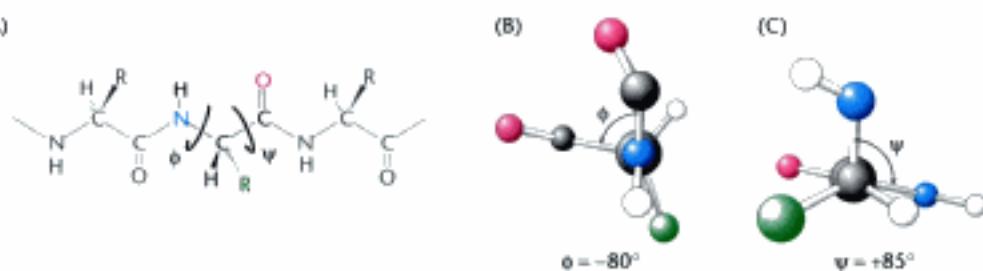


Figura 2.27 La rotación alrededor de los enlaces de un polipéptido. La estructura de cada aminoácido de un polipéptido se puede ajustar mediante la rotación alrededor de dos enlaces sencillos. (A) Fi (ϕ) es el ángulo de rotación alrededor del enlace entre el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono α mientras que ψ (ψ) es el ángulo de rotación alrededor del enlace entre el átomo de carbono α y el carbono carbonílico. (B) Vista inferior del enlace entre el nitrógeno y el carbono α , que muestra cómo se mide ϕ . (C) Vista superior del enlace entre el carbono α y el carbonilo, que muestra como se mide ψ .

A diferencia del enlace peptídico, los enlaces entre el grupo amino y el átomo de carbono α y entre el átomo de carbono α y el grupo carbonílico son enlaces sencillos puros. Las dos unidades peptídicas adyacentes rígidas pueden girar alrededor de estos enlaces de forma que se producen varias orientaciones. *Esta libertad de rotación alrededor de dos enlaces de cada aminoácido permite a las proteínas plegarse de formas muy diversas.* Los giros alrededor de estos ángulos se concretan en los llamados *ángulos de torsión* (Figura 2.27). El ángulo de giro alrededor del enlace entre el átomo de nitrógeno y el carbono α se conoce como fi (ϕ). El ángulo de giro en el enlace entre el carbono α y el carbonílico se llama ψ (ψ). Un giro en la dirección de las agujas del reloj sobre cualquiera de estos enlaces visto desde el átomo de nitrógeno hacia el carbono α o desde el carbonílico hacia el carbono α corresponde a un valor positivo. Los ángulos ϕ y ψ determinan la arquitectura de la cadena polipeptídica.

¿Son posibles todas las combinaciones de ϕ y ψ ? Gopalasamudram Ramachandran descubrió que muchas combinaciones no son posibles debido a los choques estéricos entre los átomos. Los valores permitidos se pueden visualizar en unas representaciones bidimensionales que se conocen como *diagramas de Ramachandran* (Figura 2.28). Tres cuartos de las combinaciones (ϕ , ψ) posibles están excluidas por los choques estéricos locales. *La exclusión estérica, el hecho de que dos átomos no pueden estar en el mismo sitio al mismo tiempo, puede ser un poderoso principio organizativo.*

Ángulo de torsión

Una medida de la rotación alrededor de un enlace normalmente va desde -180° hasta $+180^\circ$. Los ángulos de torsión se conocen a veces como ángulos diedros.

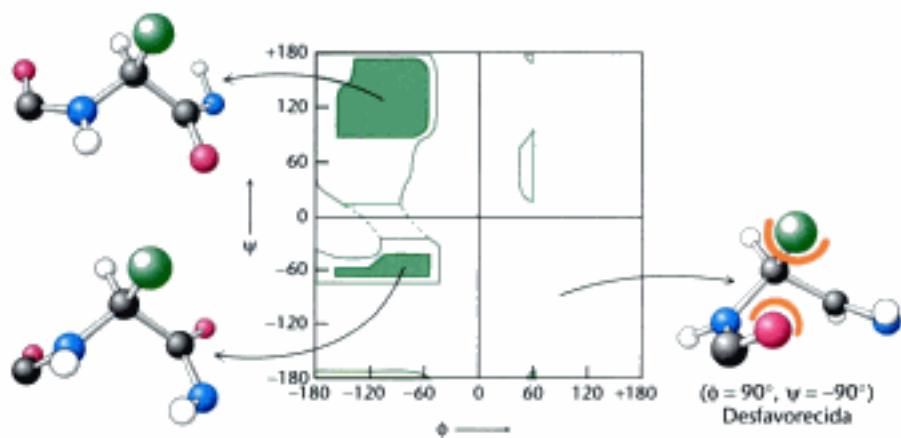


Figura 2.28 El diagrama de Ramachandran indica los valores de ϕ y de ψ . No todos los valores de ϕ y ψ son posibles sin colisiones entre los átomos. Las regiones más favorables se muestran en verde oscuro; las regiones frontera se muestran en verde claro. La estructura de la derecha es desfavorable a causa de los choques estéricos.

La capacidad de polímeros biológicos como las proteínas para plegarse en estructuras bien definidas es termodinámicamente relevante. Consideremos el equilibrio entre un polímero desplegado que existe como un ovillo estadístico, es decir, como una mezcla de muchas conformaciones posibles no estables, y la forma plegada que adopta una conformación específica. La entropía favorable asociada con el gran número de conformaciones en la forma desplegada se opone al plegamiento y debe ser superada por interacciones que favorezcan la forma plegada. De este modo, los polímeros altamente flexibles con un gran número de conformaciones posibles no se pliegan en estructuras únicas. *La rigidez de la unidad peptídica y los límites de los ángulos de enlace ϕ y ψ limitan el suficiente número de estructuras posibles para que la cadena desplegada se pliegue.*

2.3 Estructura secundaria: las cadenas polipéptidicas se pueden plegar en estructuras regulares como la hélice alfa, la hoja plegada beta y giros y bucles

¿Se puede plegar una cadena polipeptídica en una estructura regular repetitiva? En 1951 Linus Pauling y Robert Corey propusieron dos estructuras periódicas llamadas la *hélice α* y la *hoja plegada β* . Posteriormente se identificaron otras estructuras como el *giro β* y el *bucle omega (Ω)*. Aunque no son periódicas, estas estructuras habituales como los giros o los bucles están bien definidas y contribuyen junto con las hélices α y las hojas β en la formación de la estructura proteica final. Las hélices α , las hebras β y los giros son debidos a una disposición regular de los puentes de hidrógeno entre los grupos peptídico N-H y carbonílico C=O de aminoácidos que están *próximos el uno al otro en la secuencia lineal*. Tales segmentos plegados constituyen la *estructura secundaria*.

La hélice α es una estructura helicoidal estabilizada por puentes de hidrógeno intracatenarios

Al evaluar las estructuras potenciales, Pauling y Corey consideraron qué conformaciones peptídicas estaban permitidas estéricamente y cuáles aprovechaban mejor la capacidad de los grupos NH y CO del esqueleto para formar puentes de hidrógeno. La primera de las estructuras que propusieron, la hélice α , es una estructura en forma de cilindro (Figura 2.29). Un esqueleto helicoidal muy firmemente plegado, forma la parte interior del cilindro, mientras que las cadenas laterales se extienden hacia fuera en una distribución helicoidal. La hélice α se estabiliza por puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO de la cadena principal. En particular, el grupo CO de cada aminoácido forma un puente de hidrógeno con el grupo NH del aminoácido situado cuatro residuos más adelante en la cadena principal (Figura 2.30). Por lo tanto, salvo para los aminoácidos cercanos al final de una hélice α , *todos los grupos CO y NH de la cadena principal están unidos por puentes de hidrógeno*. Cada residuo se relaciona con el siguiente por un *incremento*, también llamado *traslación*, de 1,5 Å en el paso de hélice y una rotación de 100 grados, lo que equivale a 3,6 residuos de aminoácido por vuelta de la hélice. Así, aminoácidos que están a una distancia de tres o cuatro residuos en la secuencia se encuentran espacialmente muy cercanos en una hélice α . Como contraste, aminoácidos que se encuentran a una distancia de dos lugares están situados en los lados opuestos de la hélice por lo que es improbable que establezcan contactos. El *paso* de la hélice α , que es el producto de la translación (1,5 Å) por el número de residuos por giro (3,6) es 5,4 Å. El *sentido de giro* de una hélice puede ser dextrógiro (sentido de las agujas del reloj) o levógiro (sentido contrario a las agujas del reloj). El diagrama de Ramachandran nos muestra que ambas hélices, la dextrógiro y la levógiro, están entre las conformaciones permitidas (Figura 2.31). Sin embargo, las hélices dextrógiros son más favorables ener-

Sentido de giro

Describe la dirección en la que una estructura helicoidal gira con respecto a su eje. Si se observa el eje de la hélice desde abajo, la cadena gira en el sentido de las agujas del reloj, tiene un sentido de giro dextrógiro. Si el sentido es contrario a las agujas del reloj, el sentido de giro es levógiro.

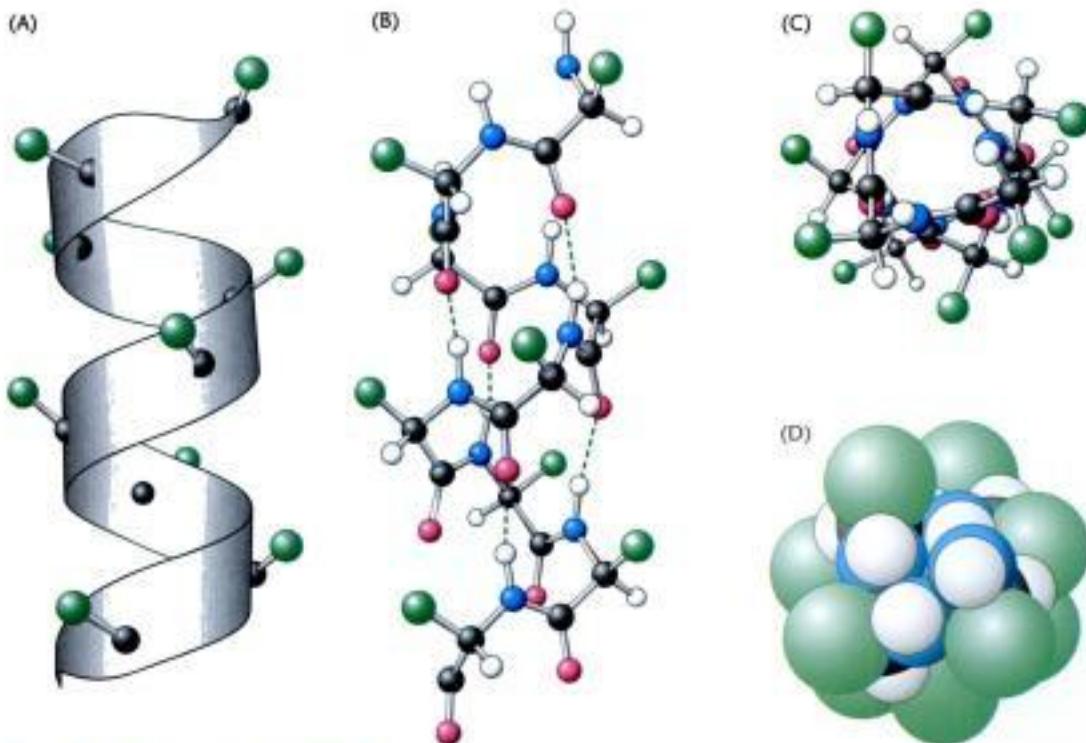


Figura 2.29. Estructura de la α -hélice. (A) Un diagrama de cintas que muestra los átomos del carbono α y las cadenas laterales (en verde). (B) Una vista lateral, en versión esferas y varillas, representa los puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) entre los grupos NH y CO. (C) Una vista apical muestra el esqueleto enrollado como el interior de la hélice y las cadenas laterales (en verde) proyectándose hacia fuera. (D) Una vista de esferas compactas de la parte C muestra el núcleo interior de la hélice estrechamente empaquetado.

géticamente porque hay menos choques estéricos entre las cadenas laterales y el esqueleto. *Esencialmente todas las hélices α que se encuentran en las proteínas son dextrógiras.* En diagramas esquemáticos de proteínas, las hélices α se representan como cintas torcidas o como cilindros (Figura 2.32).

Pauling y Corey predijeron la estructura de la hélice α 6 años antes de que se pudiera visualizar en la reconstrucción por rayos X de la estructura de la mioglobina. *La propuesta de la estructura de hélice α es un hito en bioquímica porque demostró que la conformación de una cadena polipeptídica se puede predecir si las propiedades de sus componentes se conocen de forma precisa y rigurosa.*

El contenido en hélice α de las proteínas oscila entre amplios límites, desde prácticamente nada hasta casi el 100%. Por ejemplo, aproximadamente el 75% de los residuos de la ferritina, una proteína que ayuda a almacenar hierro, están en hélices α .

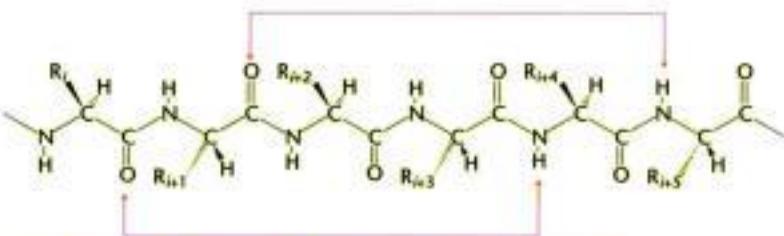


Figura 2.30. Esquema de puentes de hidrógeno para una hélice α . En la hélice α el grupo CO del residuo i forma un puente de hidrógeno con el grupo NH del residuo $i + 4$.

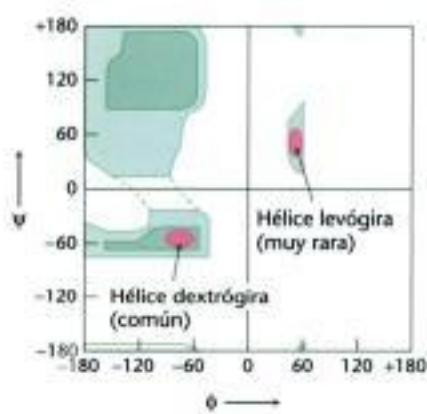


Figura 2.31. Diagrama de Ramachandran para las hélices. Tanto las hélices dextrógiras como las levóginas se encuentran en regiones de conformaciones permitidas en el diagrama de Ramachandran. Sin embargo, casi todas las hélices α de las proteínas son dextrógiras.

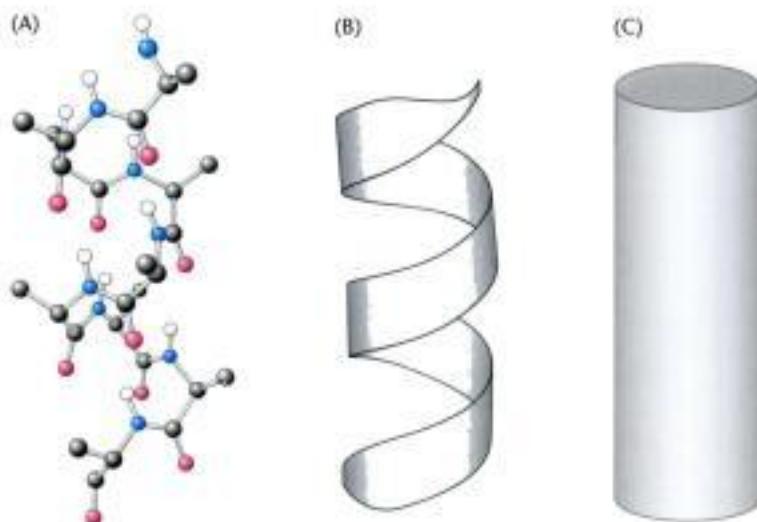


Figura 2.32. Vistas esquemáticas de hélices α . (A) Modelo de esferas y varillas. (B) Una representación de cintas. (C) Una representación cilíndrica.

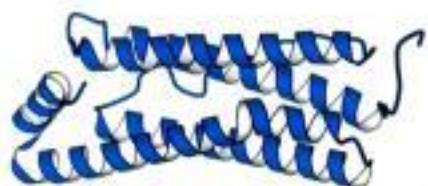


Figura 2.33. Una proteína formada principalmente por hélices α . La ferritina, una proteína de almacenamiento de hierro, está formada por un haz de hélices α . [Tomado de 1AEW.pdb.]

(Figura 2.33). De hecho, alrededor del 25% de todas las proteínas solubles, se componen de hélices α conectadas por vueltas y giros de la cadena polipeptídica. Las hélices α sencillas tienen normalmente una longitud menor que 45 Å. Muchas proteínas que atraviesan membranas biológicas contienen hélices α .

Las hojas β se estabilizan por puentes de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas

Pauling y Corey descubrieron otro motivo estructural periódico al que llamaron *hoja plegada β* (β porque era la segunda estructura que desentrañaron, siendo la hélice α la primera). La hoja plegada β (o, simplemente, hoja β) es muy diferente de las hélices α cilíndricas. Está formada por dos o más cadenas polipeptídicas, llamadas *hebras β* . Las *hebras β* están casi completamente extendidas en vez de estar enrolladas y empaquetadas como en la hélice α . Hay toda una gama de estructuras extendidas permitidas estéricamente (Figura 2.34).

La distancia entre aminoácidos adyacentes en una hebra β es aproximadamente 3,5 Å, en contraste con la distancia de 1,5 Å en una hélice α . Las cadenas laterales de aminoácidos contiguos apuntan en direcciones opuestas (Figura 2.35). Una hoja β se forma uniendo dos o más hebras β mediante puentes de hidrógeno. Las cadenas adyacentes de una hoja β pueden dirigirse en sentidos opuestos (hoja β antiparalela) o en el mismo (hoja β paralela). En el ordenamiento antiparalelo, los grupos NH y CO de cada aminoácido están unidos respectivamente a un grupo CO y NH situados en la cadena adyacente (Figura 2.36). En el ordenamiento paralelo, el esquema de puentes de hidrógeno es ligeramente más complicado. En cada aminoácido, el grupo NH forma enlaces de hidrógeno con el grupo CO de un aminoácido de la cadena adyacente, mien-

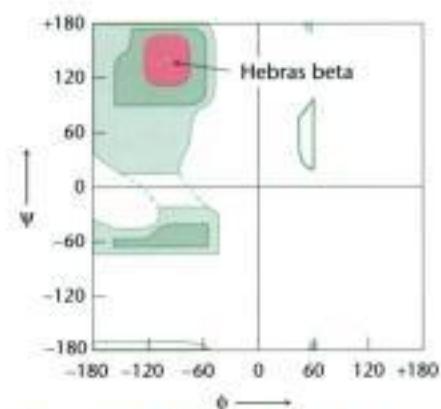


Figura 2.34. Diagrama de Ramachandran para las hebras β . El área roja muestra las conformaciones permitidas estéricamente para las estructuras extendidas, tipo hebra β .

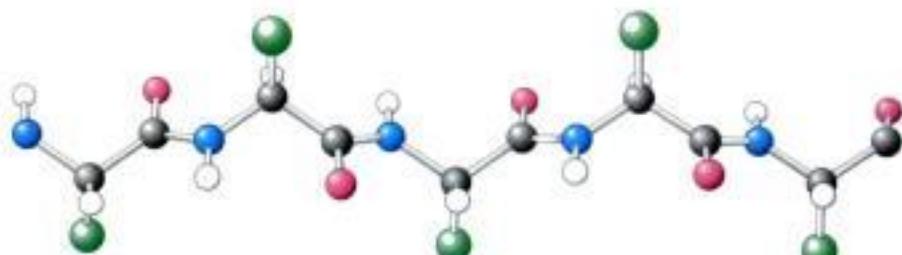


Figura 2.35. Estructura de una hebra β . Las cadenas laterales (en verde) alternan por encima y por debajo del plano de la hebra.

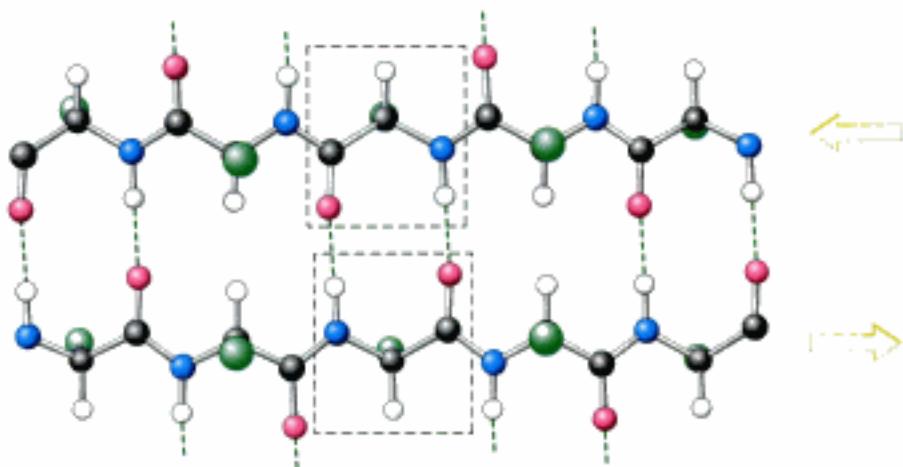


Figura 2.36 Una hoja β antiparalela. Las hebras β adyacentes transcurren en sentidos opuestos. Los puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO conectan cada aminoácido con un único aminoácido en la hebra opuesta, lo que estabiliza la estructura.

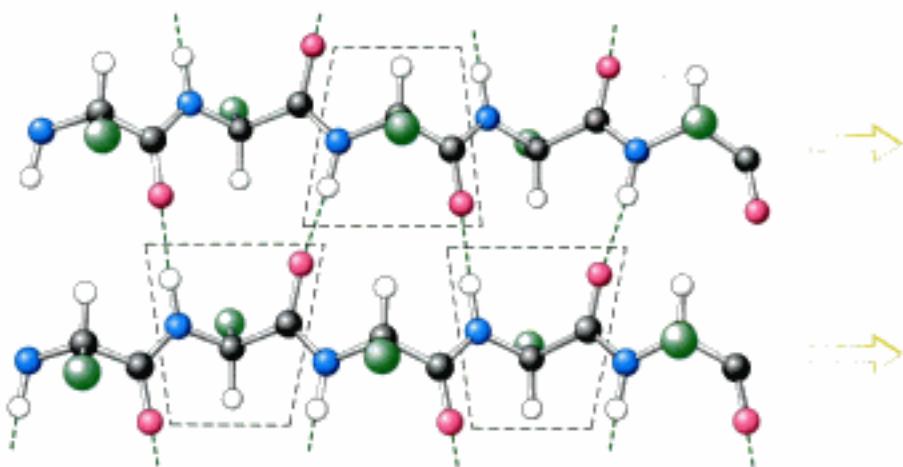


Figura 2.37 Una hoja β paralela. Las hebras β adyacentes transcurren en el mismo sentido. Los puentes de hidrógeno conectan cada aminoácido de una hebra con dos aminoácidos diferentes de la hebra opuesta.

tras que el grupo CO forma enlaces de hidrógeno con el grupo NH del aminoácido situado dos residuos más lejanos en la cadena (Figura 2.37). Muchas cadenas, normalmente 4 ó 5 pero hasta 10 o más, se pueden unir en hojas β . Tales hojas β pueden ser estrictamente antiparalelas, simplemente paralelas, o mixtas (Figura 2.38).

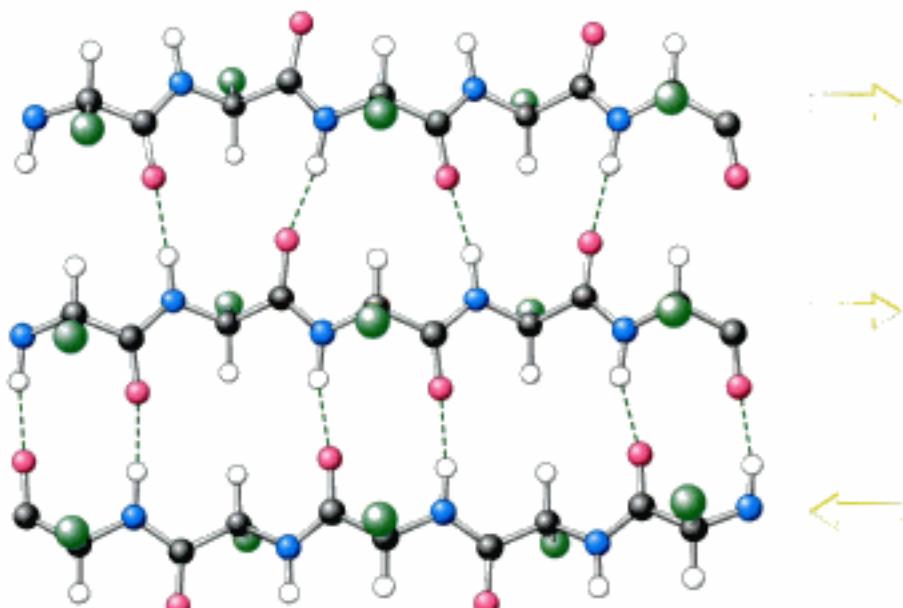


Figura 2.38 Estructura de una hoja β mixta.



Figura 2.39 Una hoja β retorcida. (A) Modelo de esferas y varillas. (B) Modelo esquemático. (C) La vista esquemática virada 90 grados para apreciar el giro más claramente.

En diagramas esquemáticos, las hebras β se representan normalmente por flechas anchas apuntando hacia el extremo carboxilo terminal para indicar el tipo de hojas β formadas: paralelas o antiparalelas. Estructuralmente más variadas que las hélices α , las hojas β pueden ser relativamente planas, aunque la mayor parte de ellas adoptan una forma más bien retorcida (Figura 2.39). La hoja β es un elemento estructural importante en muchas proteínas. Por ejemplo, las proteínas que se unen a ácidos grasos, tan importantes en el metabolismo lipídico, están prácticamente constituidas por hojas β (Figura 2.40).

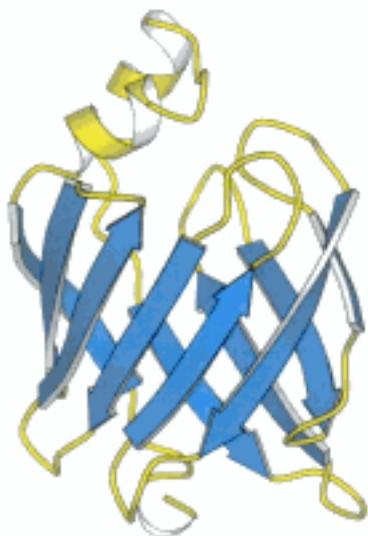


Figura 2.40 Una proteína rica en hojas β . Estructura de una proteína que une ácidos grasos. [Tomado de 1PTP.pdb.]

Las cadenas polipeptídicas pueden cambiar de dirección por medio de giros inversos y bucles

La mayor parte de las proteínas tienen formas compactas y globulares, que requieren cambios en la dirección de sus cadenas polipeptídicas. Muchos de estos cambios se acompañan por un elemento estructural común llamado el *giro inverso* (también conocido como *giro β* o *vuelta en horquilla*) ilustrado en la Figura 2.41. En muchos giros inversos, el grupo CO del residuo i de un polipéptido se une por puente de hidrógeno al NH del residuo $i + 3$. Esta interacción estabiliza cambios abruptos de dirección en la cadena polipeptídica. En otros casos, estructuras más elaboradas son responsables para las inversiones de cadena. Estas estructuras se llaman *bucles* o a veces *bucles Ω* (bucle omega) aludiendo a su forma general. Contrariamente a las hélices α y las hebras β , los bucles no tienen estructuras periódicas, regulares. Sin embargo, las estructuras en bucle son a menudo rígidas y bien definidas (Figura 2.42). Los giros y bucles se encuentran invariablemente en la superficie de las proteínas, y por ello participan en interacciones entre las proteínas y otras moléculas.

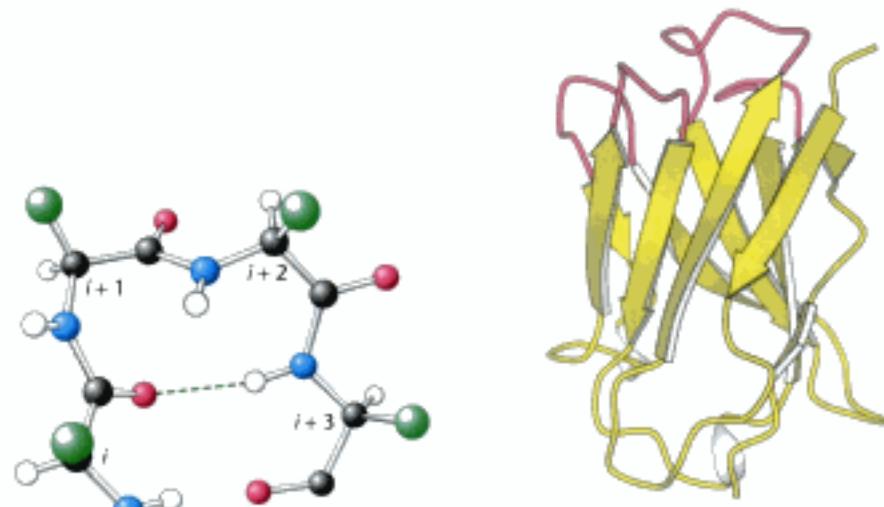


Figura 2.41 Estructura de un giro inverso. El grupo CO del residuo i de la cadena polipeptídica se une por puente de hidrógeno al grupo NH del residuo $i + 3$ para estabilizar el giro.

Figura 2.42 Bucles en una superficie proteica. Fragmento de una molécula de anticuerpo que tiene bucles en la superficie (mostrados en rojo) que median las interacciones con otras moléculas. [Tomado de 7FTP.pdb.]

Las proteínas fibrosas suministran un soporte estructural a las células y a los tejidos

En dos proteínas, la α -queratina y el colágeno, existen unos tipos especiales de hélices. Estas proteínas forman largas fibras que desempeñan una función estructural.

La α -queratina, que es el componente primordial de la lana y el cabello, consta de dos hélices α dextrógiros enrolladas mutuamente para formar un tipo de hélice de hélices levógira, llamada superhélice (en inglés "coiled-coil"). La α -queratina es miembro de una superfamilia de proteínas llamadas *proteínas superhelicoidales* (Figura 2.43). En estas proteínas pueden enrollarse dos o más hélices α para formar una estructura muy estable que puede alcanzar una longitud de 1000 Å (100 nm ó 0.1 μ m) o incluso mayor. En el hombre hay aproximadamente unos 60 miembros de esta familia, que incluyen los filamentos intermedios, proteínas que contribuyen al citoesqueleto (andamiaje interno de una célula) y las proteínas musculares miosina y tropomiosina (Sección 34.2). Los miembros de esta familia se caracterizan por tener una región central de 300 aminoácidos que contiene repeticiones imperfectas de una secuencia de siete aminoácidos llamada *héptada repetitiva*.

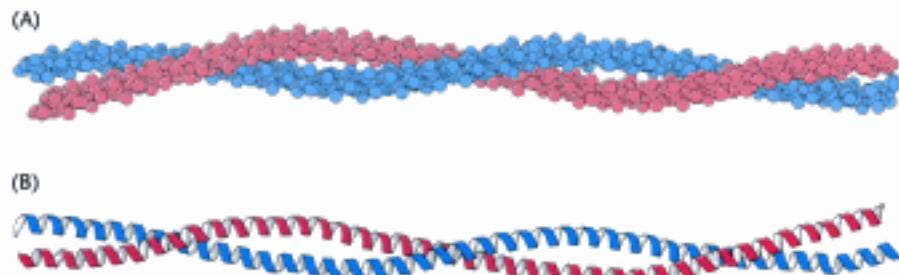


Figura 2.43 Una superhélice. (A) Modelo espacial compacto. (B) Diagrama de cintas. Las dos hélices se enrollan una alrededor de la otra para formar una superhélice. Tales estructuras se encuentran en muchas proteínas, incluyendo la queratina del pelo, plumas, uñas y cuernos. [Tomado de 1CIG.pdb.]

Los dos helicoides de la α -queratina están unidos de forma entrecruzada por interacciones débiles, tales como fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas. Estas interacciones vienen facilitadas por el hecho de que la superhélice levógira altera a las dos hélices dextrógiros, de modo que hay 3,5 residuos por vuelta en vez de 3,6. De este modo el patrón de interacciones de las cadenas laterales puede repetirse cada siete residuos, formando la héptada repetitiva. Dos helicoides con tal repetición son capaces de interactuar uno con el otro si las repeticiones son complementarias (Figura 2.44). Así, por ejemplo, los residuos que se repiten pueden ser hidrofóbicos, estableciendo entre ellos fuerzas de van der Waals, o pueden tener cargas eléctricas opuestas, permitiendo interacciones iónicas. Además, las dos hélices pueden estar unidas por puentes disulfuro formados por residuos vecinos de cisteína. La unión de las hélices da cuenta de las propiedades físicas de la lana, un ejemplo de α -queratina. La lana es extensible y puede estirarse hasta dos veces su longitud debido a la elasticidad de las α -hélices, al romper las interacciones débiles, entre hélices vecinas. Sin embargo, los puentes disulfuro covalentes se resisten a la ruptura y la fibra retorna a su estado original cuando se libera de la fuerza de tracción. El número de puentes disulfuro entrecruzados define después las propiedades de la fibra. El pelo y la lana, al tener menor número de enlaces cruzados, son flexibles. Los cuernos, uñas y pezuñas, al tener más enlaces cruzados son mucho más duros.

En el colágeno, la proteína más abundante en los mamíferos, hay un tipo diferente de hélice. El colágeno es el principal componente fibroso de la piel, los huesos, tendones, cartílagos y dientes. Esta proteína extracelular es una molécula en forma de varilla de unos 3000 Å de longitud y solamente 15 Å de diámetro. Contiene tres cadenas polipeptídicas lineales, cada una de unos 1000 residuos de longi-

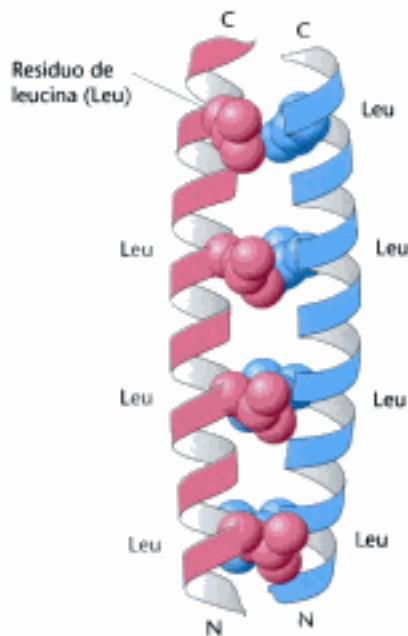


Figura 2.44 Héptada repetida en una proteína con superenrollamiento. Cada séptimo residuo en cada hélice es leucina. Las dos hélices se mantienen juntas principalmente por las interacciones de van der Waals entre los residuos de leucina. [Tomado de 2ZTA.pdb.]

31 -Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-
 22 -Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-
 31 -Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Hyp-
 40 -Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-
 49 -Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-
 58 -Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn-Gly-Asp-Asp-

Figura 2.45 Secuencia de aminoácidos de una parte de la cadena del colágeno. Cada tercer residuo es una glicina. También abundan la prolina y la hidroxiprolina.

tud. En la secuencia de aminoácidos aparece la glicina cada tercer residuo y se presenta con regularidad la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina (Figura 2.45). La hidroxiprolina es un derivado de la prolina que contiene un grupo hidroxilo en vez de uno de los hidrógenos del anillo de pirrolidina.

Las propiedades de las hélices de colágeno y de las hélices α son diferentes. Faltan los puentes de hidrógeno dentro de la hebra. En vez de ello, *la hélice está estabilizada por la repulsión estérica de los anillos de pirrolidina de los residuos de prolina e hidroxiprolina* (Figura 2.46). Los anillos de pirrolidina se mantienen mutuamente alejados cuando la cadena polipeptídica adopta su forma helicoidal, que tiene unos tres residuos por vuelta. Tres hebras se enrollan mutuamente para formar una *soga o cable superhelicoidal* estabilizado por los puentes de hidrógeno entre las hebras. Los puentes de hidrógeno se establecen entre los grupos NH peptídicos de la glicina y los grupos CO de residuos de las otras cadenas. También participan en los puentes de hidrógeno los grupos hidroxilo de las hidroxiprolinas, y precisamente la carencia de estos grupos hidroxilo ocasiona la enfermedad conocida como escorbuto (Sección 27.5).

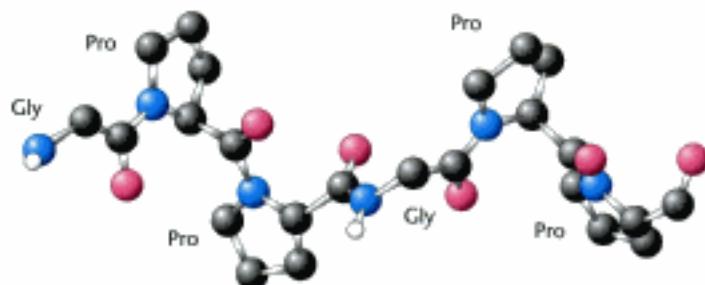


Figura 2.46 Conformación de una sola hebra de la triple hélice del colágeno.

El interior de la soga helicoidal de triple hebra está muy apretado y esto justifica que se requiera glicina en cada tercera posición de cada hebra. (*El único residuo que puede encajar en la posición interior es la glicina*). Los aminoácidos distintos de la glicina están localizados en el exterior de la soga, donde hay espacio para los anillos voluminosos de la prolina e hidroxiprolina (Figura 2.47 B)

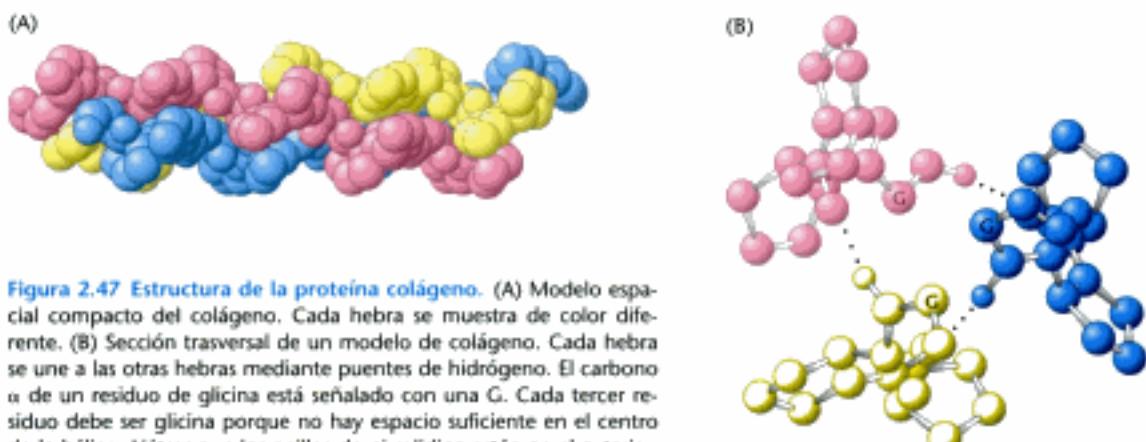


Figura 2.47 Estructura de la proteína colágeno. (A) Modelo espacial compacto del colágeno. Cada hebra se muestra de color diferente. (B) Sección transversal de un modelo de colágeno. Cada hebra se une a las otras hebras mediante puentes de hidrógeno. El carbono α de un residuo de glicina está señalado con una G. Cada tercer residuo debe ser glicina porque no hay espacio suficiente en el centro de la hélice. Nótese que los anillos de pirrolidina están en el exterior.

2.4 Estructura terciaria: las proteínas solubles en agua se pliegan en estructuras compactas con un núcleo no polar

Examinemos ahora cómo los aminoácidos se agrupan en una proteína completa. Los estudios de cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (Sección 3.6) han

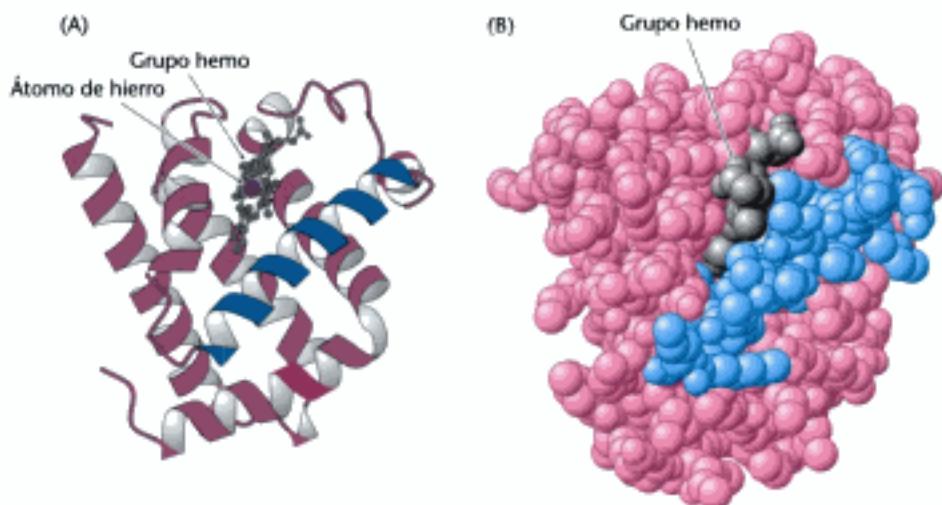


Figura 2.48 Estructura tridimensional de la mioglobina. (A) El diagrama de cintas muestra que la proteína está formada principalmente por α -hélices. (B) El modelo espacial compacto, en la misma orientación, muestra cómo la proteína está fuertemente compactada. Nótese que el grupo hemo está cobijado en una hendidura dentro de la proteína compacta con un único extremo expuesto al exterior. Una de las hélices es azul para permitir la comparación de las dos representaciones de la estructura. [Tomado de 1 AGN.pdb.]

revelado las estructuras tridimensionales detalladas de miles de proteínas. Empezamos con una visión de la *mioglobina*, la primera proteína conocida con detalle atómico.

La mioglobina, el transportador de oxígeno en el músculo, posee una cadena polipeptídica única de 153 aminoácidos (ver el capítulo 7). La capacidad de la mioglobina para unirse al oxígeno depende de la presencia de un grupo *hemo*, un *grupo prostético* (*ayudante*) no polipeptídico consistente en una protoporfirina IX y un átomo de hierro en el centro. *La mioglobina es una molécula extraordinariamente compacta*. Sus dimensiones globales son $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$, un orden de magnitud menor que si estuviese totalmente extendida (Figura 2.48). Aproximadamente el 70% de la cadena principal está plegada en ocho hélices α , y casi todo el resto de la cadena forma giros y bucles entre las hélices.

El plegamiento de la cadena principal de la mioglobina, al igual que la mayor parte de las demás proteínas, es compleja y desprovista de simetría. La forma global de la cadena polipeptídica de una proteína se conoce como su *estructura terciaria*. Un principio unificador emerge de la distribución de las cadenas laterales. Lo más llamativo es que el *interior consta casi completamente de residuos no polares*, como leucina, valina, metionina y fenilalanina (Figura 2.49). Los residuos cargados como aspartato, glutamato, lisina y arginina están ausentes del interior de la mio-

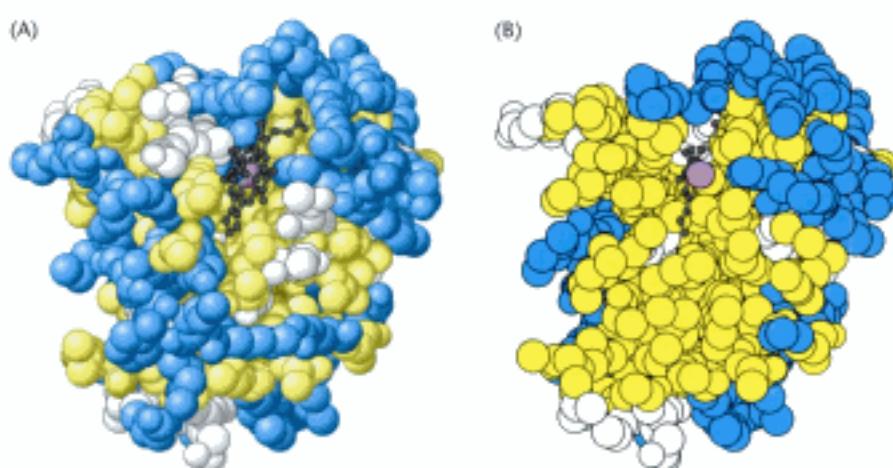
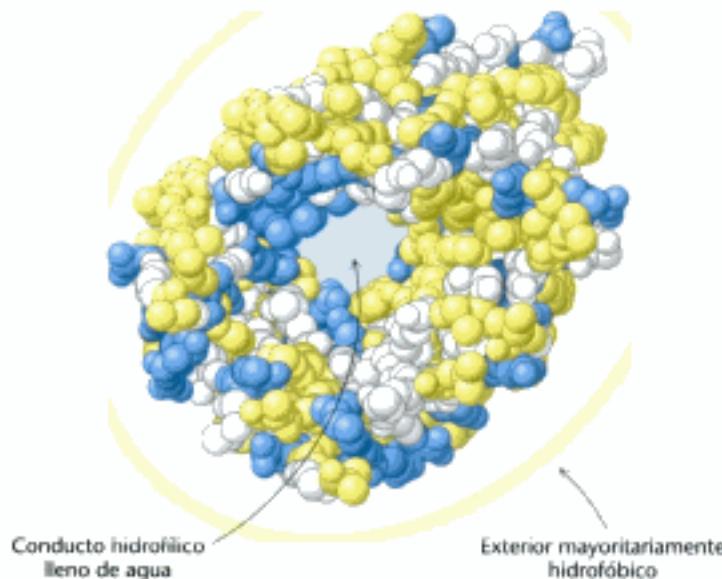


Figura 2.49 Distribución de los aminoácidos en la mioglobina. (A) Modelo espacial compacto de la mioglobina con los aminoácidos hidrofóbicos marcados en amarillo, los aminoácidos cargados en azul y el resto en blanco. La superficie de la molécula tiene muchos aminoácidos cargados así como algunos aminoácidos hidrofóbicos. (B) Un corte en sección muestra que la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el interior de la estructura, mientras que los aminoácidos cargados se encuentran en la superficie de la proteína. [Tomado de 1 MBD.pdb.]

globina. Los únicos residuos polares en el interior son dos residuos de histidina, que desempeñan papeles vitales en la unión de hierro y oxígeno. Por otra parte, el exterior de la mioglobina consiste en residuos polares y no polares. Los modelos de esferas llenas demuestran que en el interior hay muy poco espacio vacío.

Esta distribución sorprendente de residuos polares y no polares pone en claro una faceta clave de la arquitectura proteica. En un entorno acuoso, el plegamiento proteico está dirigido por la fuerte tendencia de los residuos hidrofóbicos a ser excluidos del agua. Recordemos que un sistema es más estable termodinámicamente cuando los grupos hidrofóbicos están agrupados en vez de estar expuestos al entorno acuoso. *La cadena polipeptídica se pliega por lo tanto para que sus cadenas hidrofóbicas laterales estén en el interior y sus cadenas polares, cargadas, estén en la superficie.* Muchas hélices α y hebras β son anfipáticas; esto es, la α -hélice o las hebras β tienen una cara hidrofóbica, que apunta hacia el interior de la proteína, y una cara más polar, dirigida hacia el entorno acuoso. El destino de la cadena principal que acompaña a las cadenas laterales hidrofóbicas es también importante. Un grupo peptídico NH o CO despareado prefiere sustancialmente el agua a un medio no polar. El secreto de enterrar un segmento de la cadena principal en un entorno hidrofóbico es el emparejamiento de todos los grupos NH y CO por medio de puentes de hidrógeno. Este emparejamiento se cumple totalmente en una α -hélice o una hoja β . Las interacciones de Van der Waals entre las cadenas laterales fuertemente empaquetadas también contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Podemos entender ahora por qué la serie de 20 aminoácidos contiene varios que difieren sutilmente en tamaño o forma: proporcionan una oferta desde la que se puede escoger para llenar perfectamente el interior de una proteína, potenciando al máximo las interacciones de van der Waals que requieren un contacto íntimo.

Las proteínas que atraviesan las membranas biológicas son excepciones que confirman la regla, porque presentan una distribución inversa de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofilicos. Consideremos, por ejemplo, las porinas, proteínas que se encuentran en las membranas externas de muchas bacterias (Figura 2.50). Las barreras de permeabilidad de las membranas se construyen principalmente por cadenas hidrofóbicas de alcanos (Sección 12.2). Así, las porinas están recubiertas principalmente



 **Figura 2.50 Distribución de aminoácidos invertida en la porina.** El exterior de la porina (que establece contacto con los grupos hidrofóbicos de las membranas) está cubierto principalmente por residuos hidrofóbicos, mientras que el centro contiene un conducto acuoso lineal con aminoácidos polares y cargados. [Tomado de 1PRN.pdb.]

en su exterior con residuos que interaccionan con las cadenas de alcano vecinas. En contraste, el centro de la proteína contiene muchos aminoácidos cargados y polares que rodean un conducto lleno de agua que pasa por el medio de la proteína. Por ello, como las porinas funcionan en entornos hidrofóbicos, están dispuestas de forma invertida con respecto a las proteínas que funcionan en disoluciones acuosas.

En muchas proteínas se presentan ciertas combinaciones de estructuras secundarias y con frecuencia desempeñan funciones semejantes. Estas combinaciones se llaman *motivos* o *estructuras supersecundarias*. Así, por ejemplo, una hélice α separada de otra hélice α por una vuelta o giro constituye la unidad *hélice-vuelta-hélice*; este motivo se encuentra en muchas proteínas que se unen al DNA (Figura 2.51).

Hay cadenas polipeptídicas que se pliegan en dos o más regiones compactas que pueden estar conectadas por un segmento flexible de la cadena polipeptídica, como perlas en un collar. Estas unidades globulares compactas, llamadas *dominios*, tienen un tamaño entre 30 y 400 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la parte extracelular de CD4, la proteína de la superficie celular del sistema inmune a la que se une el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV *human immunodeficiency virus*), está compuesto de cuatro dominios similares de aproximadamente 100 aminoácidos cada uno de ellos (Figura 2.52). A menudo, las proteínas tienen dominios comunes incluso si sus estructuras terciarias globales son diferentes.

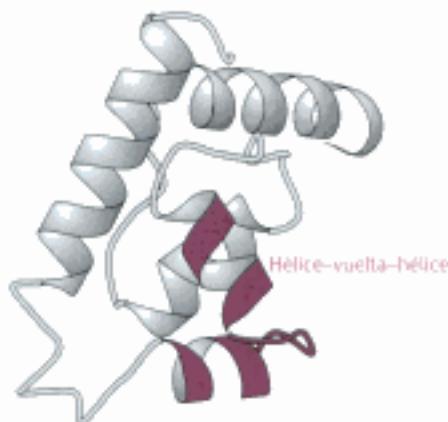


Figura 2.51 El motivo hélice-vuelta-hélice, un elemento de estructura supersecundaria. Los motivos hélice-vuelta-hélice se encuentran en muchas proteínas que se unen al DNA. [Tomado de 1LMB.pdb.]

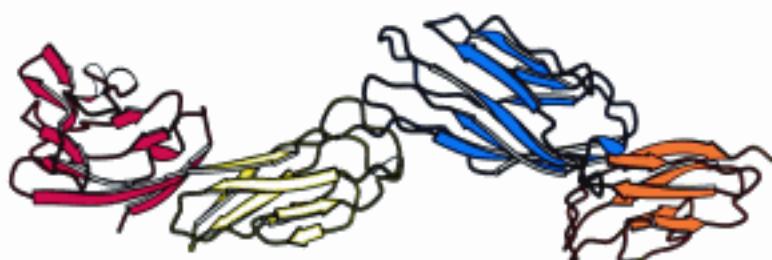


Figura 2.52 Dominios proteicos. La proteína CD4 de la superficie celular consta de cuatro dominios similares. [Tomado de 1WIO.pdb.]

2.5 Estructura cuaternaria: las cadenas polipeptídicas pueden ensamblarse en estructuras de múltiples subunidades

Frecuentemente, se citan cuatro niveles de estructura en las discusiones sobre arquitectura de proteínas. Hasta ahora, hemos considerado tres de ellas. *La estructura primaria* es la secuencia de aminoácidos. *La estructura secundaria* nos habla del ordenamiento espacial de los residuos de aminoácido que están cerca en la secuencia. Alguno de estos ordenamientos es regular, lo que da lugar a estructuras periódicas. La hélice α y la hebra β son elementos de estructura secundaria. *La estructura terciaria* nos habla del ordenamiento espacial de los residuos de aminoácido que se encuentran alejados en la secuencia y del esquema de enlaces disulfuro. Ahora nos dirigimos a las proteínas que tienen más de una cadena polipeptídica. Tales proteínas contienen un cuarto nivel de organización estructural. Cada cadena polipeptídica en estas proteínas se conoce como una *subunidad*. *La estructura cuaternaria* se refiere al ordenamiento espacial de las subunidades y la naturaleza de sus interacciones. La forma más simple de estructura cuaternaria es un *dímero*, que consta de dos subunidades idénticas. Esta organización se presenta en la proteína de unión a DNA, Cro, que se encuentra en un virus bacteriano llamado λ (Figura 2.53). También son comunes estructuras cuaternarias más complicadas. Podemos encontrar más de un tipo de subunidades, a menudo en proporciones variables. Por ejemplo, la hemoglobina humana, la proteína transportadora de oxígeno en la sangre, contiene dos subunidades de un tipo (llamadas α) y dos subunidades de otro tipo (conocidas como β), como se mues-

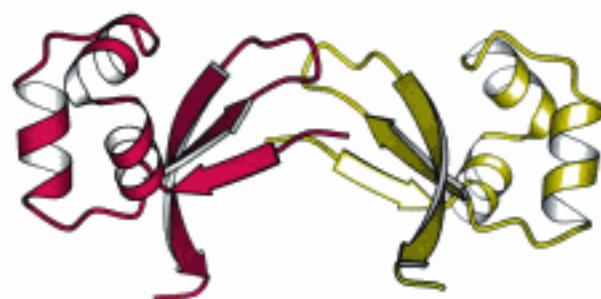


Figura 2.53 Estructura cuaternaria. La proteína Cro del bacteriófago λ es un dímero de subunidades idénticas. [Tomado de 5CRO.pdb.]

Figura 2.54 El tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de la hemoglobina humana. La estructura de dos subunidades α idénticas (en rojo) es similar pero no idéntica a la de las dos subunidades β (en amarillo). La molécula contiene cuatro grupos hemo (en gris con el átomo de hierro púrpura). (A) El diagrama de cintas resalta la similitud de las subunidades y muestra que están compuestas principalmente de hélices α . (B) El modelo espacial compacto ilustra como los grupos hemo ocupan oquedades de la proteína. [Tomado de 1A3N.pdb.]

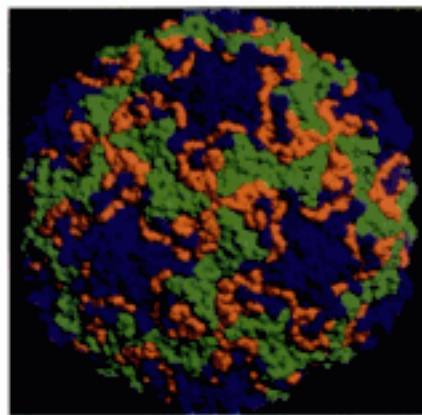
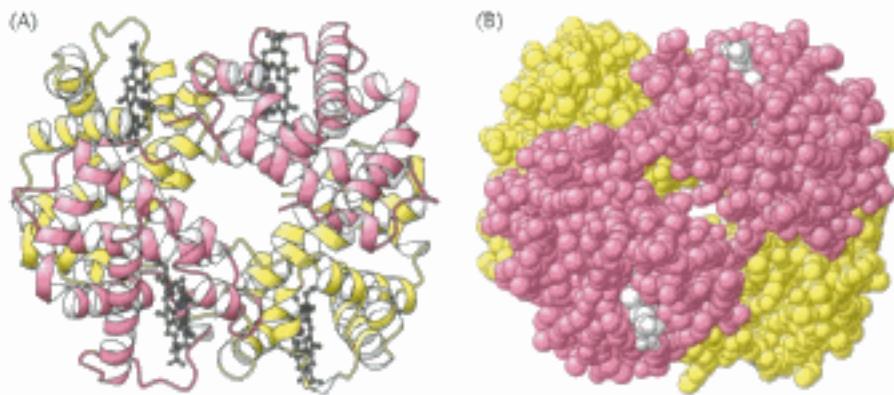
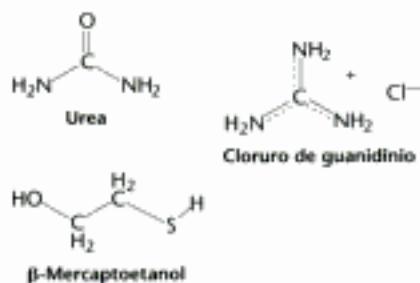


Figura 2.55 Estructura cuaternaria compleja. La envoltura del rinoavirus humano contiene 60 copias de sus cuatro subunidades proteicas (mostradas en colores diferentes).



tra en la Figura 2.54. Así, la molécula de hemoglobina es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Cambios sutiles en el ordenamiento de las subunidades en la molécula de hemoglobina le permiten transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos con una gran eficiencia (Capítulo 7).

Los virus aprovechan al máximo una cantidad limitada de información genética formando envolturas que usan el mismo tipo de subunidad de forma repetitiva en un ordenamiento simétrico. La envoltura del rinoavirus, el virus que produce el resfriado común, incluye 60 copias de cada una de las cuatro subunidades que la integran (Figura 2.55). Las subunidades se agrupan para formar una cápsida prácticamente esférica que encierra al genoma vírico.

2.6 La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional

¿Cómo se consigue la elaborada estructura tridimensional de las proteínas? El trabajo clásico de Christian Anfinsen en los años 1950 sobre el enzima ribonucleasa manifestó la relación entre la secuencia de aminoácidos de una proteína y su conformación. La ribonucleasa tiene una cadena polipeptídica única con 124 residuos de aminoácidos unidos por cuatro puentes disulfuro (Figura 2.56). La estrategia de Anfisen fue destruir la estructura tridimensional del enzima y luego determinar qué condiciones se requerían para restaurar esa estructura.

Agentes como la urea o el cloruro de guanidinio rompen eficazmente los enlaces no covalentes, aunque su mecanismo de acción no se comprende totalmente. Los puentes disulfuro se pueden romper reversiblemente si se reducen con un reactivo como el β -mercaptopropano (Figura 2.57). En presencia de un gran exceso de β -mercaptopropano, se origina una proteína en la que los disulfuros (cistinas) se convierten completamente en sulfhidrilos (cisteínas).

La mayoría de las cadenas polipeptídicas desprovistas de enlaces cruzados adoptan una *conformación de ovillo estadístico* en urea 8 M o cloruro de guanidinio 6 M.



Figura 2.56 Secuencia de aminoácidos de la ribonucleasa bovina. Los cuatro puentes disulfuro se muestran en color. [Tomado de C. H. W. Hirs, S. Moore y W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 235 (1960); 633–647.]

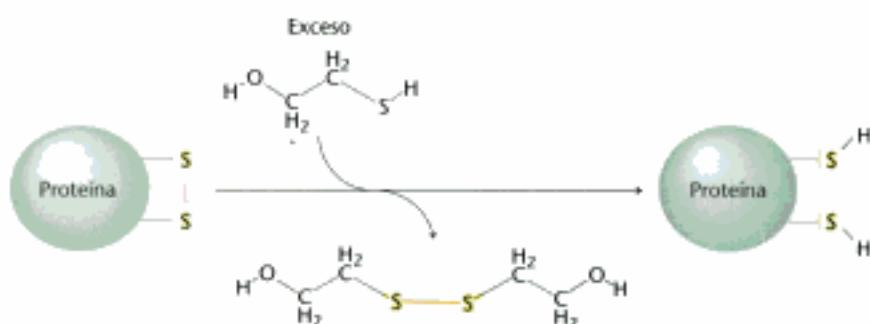


Figura 2.57 Papel del β -mercaptoetanol en la reducción de los puentes disulfuro. Nótese que cuando se reducen los disulfuros, el β -mercaptoetanol se oxida y forma dímeros.

Cuando la ribonucleasa se trató con β -mercaptoetanol en urea 8 M, el producto era una cadena polipeptídica completamente reducida, en conformación de ovillo estatístico y desprovista de actividad enzimática. En otras palabras, la ribonucleasa se *desnaturalizó* con este tratamiento (Figura 2.58).

Anfisen hizo entonces la observación clave de que la ribonucleasa desnaturalizada, liberada de la urea y del β -mercaptoetanol por dialisis, recuperaba lentamente la actividad enzimática. El se dio cuenta enseguida del significado de este hallazgo casual: los grupos sulfhidrilo del enzima desnaturalizado se oxidaban por el aire, y el enzima se replegaba en una forma catalíticamente activa. Estudios detallados demostraron entonces que casi toda la actividad enzimática original se recobraba si los grupos sulfhidrilos se oxidaban en condiciones adecuadas. Todas las propiedades físicas y químicas medidas en el enzima replegado eran casi idénticas a las del enzima nativo. Estos experimentos demostraron que *la información necesaria para especificar la estructura catalíticamente activa está contenida en su secuencia de aminoácidos*. Estudios posteriores han establecido la generalidad de este principio primordial de la bioquímica: *la secuencia específica la conformación*. La dependencia de la conformación con respecto a la secuencia es especialmente significativa debido a la conexión íntima entre la conformación y la función.

Un resultado muy diferente se obtuvo cuando la ribonucleasa reducida se reoxidó mientras estaba todavía en urea 8 M y la preparación se dializó posteriormente para quitar la urea. La ribonucleasa reoxidada de esta forma tenía solamente el 1% de la actividad enzimática de la proteína nativa. ¿Por qué eran los resultados tan distintos cuando la ribonucleasa reducida se reoxidaba en ausencia o presencia de urea? La razón radica en que en presencia de la urea se forman puentes disulfuro equivocados. Hay 105 modos diferentes de aparear ocho moléculas de cisteína para formar cuatro puentes disulfuro; y solo una de estas combinaciones es enzimáticamente activa. Los 104 apareamientos erróneos se han llamado de forma pintoresca ribonucleasas "revueltas". Anfisen encontró que la ribonucleasa revuelta se convertía espontáneamente en ribonucleasa nativa, totalmente activa, cuando a una disolución acuosa del enzima se le añadían cantidades mínimas de β -mercaptoetanol (Figura 2.59).

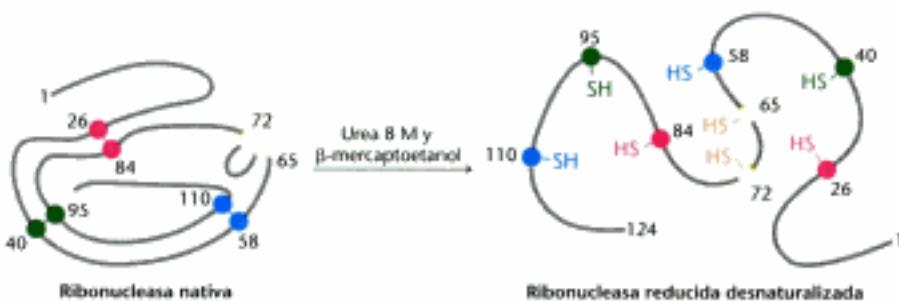


Figura 2.58 Reducción y desnaturalización de la ribonucleasa.

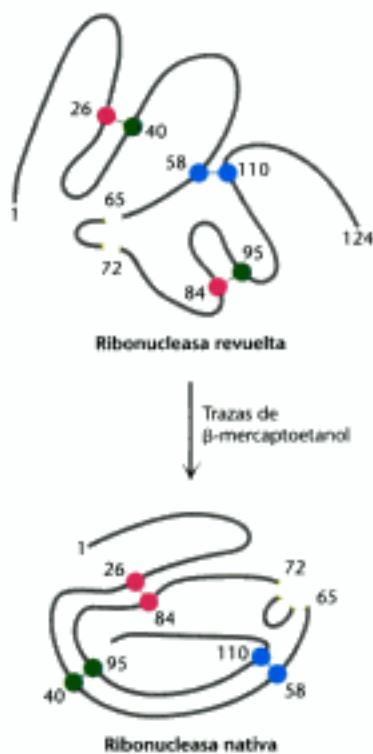


Figura 2.59 Restablecimiento del emparejamiento correcto de los pares disulfuro. La ribonuclease nativa se puede regenerar desde la ribonuclease revuelta en presencia de trazas de β -mercaptopetanol.

El β -mercaptopetanol añadido catalizaba el reordenamiento de los pares disulfuro hasta que la estructura nativa se recuperaba en unas 10 horas aproximadamente. *Este proceso estaba guiado por el descenso en energía libre cuando las conformaciones revueltas se convertían en la conformación nativa y estable del enzima.* Los apareamientos nativos de los pares disulfuro de la ribonuclease contribuían de esta manera a la estabilización preferida estructuralmente.

Experimentos similares de replegamiento se han efectuado en muchas otras proteínas. En muchos casos, la estructura nativa puede regenerarse en condiciones apropiadas. Sin embargo, para otras proteínas, el replegamiento no se produce con eficiencia. En estos casos, las moléculas de proteína desplegadas normalmente se quedan enredadas entre ellas formando agregados. En el interior de la célula, unas proteínas especiales, llamadas *chaperonas*, bloquean tales interacciones inconvenientes.

Los aminoácidos tienen diferentes propensiones a formar hélices α , hojas β y giros β

¿Cómo puede la secuencia de aminoácidos de una proteína especificar su estructura tridimensional? ¿Cómo una cadena polipeptídica alcanza la forma de la proteína nativa? Estas cuestiones fundamentales en bioquímica se pueden abordar preguntándose primero una más sencilla: ¿qué determina si una secuencia particular de una proteína va a formar una hélice α , una hoja β , o un giro? El examen de la frecuencia de aparición de un residuo particular de aminoácido en estas estructuras secundarias (Tabla 2.3) puede ser una fuente de conocimiento para esta determinación. Hay residuos como la alanina, el glutamato y la leucina que suelen estar presentes en hélices α , mientras que la valina y la isoleucina suelen estarlo en hebras β . La glicina, asparagina y prolina tienen tendencia a estar en los giros.

Los resultados de estudios en proteínas y péptidos sintéticos han desvelado algunas de las razones para estas preferencias. La hélice α se puede considerar como la conformación habitual. Las ramificaciones del átomo de carbono β , como en la valina, la treonina y la isoleucina, tienden a desestabilizar las hélices α debido a cho-

TABLA 2.3 Frecuencias relativas de los residuos aminoacídicos en estructuras secundarias

Aminoácido	hélice α	hoja β	Giro
Glu	1,59	0,52	1,01
Ala	1,41	0,72	0,82
Leu	1,34	1,22	0,57
Met	1,30	1,14	0,52
Gln	1,27	0,98	0,84
Lys	1,23	0,69	1,07
Arg	1,21	0,84	0,90
His	1,05	0,80	0,81
Val	0,90	1,87	0,41
Ile	1,09	1,67	0,47
Tyr	0,74	1,45	0,76
Cys	0,66	1,40	0,54
Trp	1,02	1,35	0,65
Phe	1,16	1,33	0,59
Thr	0,76	1,17	0,96
Gly	0,43	0,58	1,77
Asn	0,76	0,48	1,34
Pro	0,34	0,31	1,32
Ser	0,57	0,96	1,22
Asp	0,99	0,39	1,24

Nota: Los aminoácidos están ordenados según su preferencia por las hélices α (grupo superior), hojas β (segundo grupo) o giros (tercer grupo). La arginina no demuestra una preferencia significativa por ninguna de estas estructuras.

Basado en T. E. Creighton. Proteins: Structures and Molecular Properties, 2^a ed. (W. H. Freeman and Company, 1992) p. 256.

ques estéricos. Estos residuos se acomodan fácilmente en las hebras β , en las que sus cadenas laterales se proyectan hacia fuera del plano que comprende la cadena principal. La serina, el aspartato y la asparragina tienden a romper las hélices α porque sus cadenas laterales contienen dadores o aceptores de puentes de hidrógeno que están muy cerca de la cadena principal, que compiten por los grupos NH y CO de dicha cadena. La prolina tiende a desestabilizar tanto las hélices α como las hebras β porque le falta un grupo NH y porque su estructura en anillo restringe su valor de ϕ alrededor de 60 grados. La glicina encaja fácilmente en todas las estructuras y por esa razón no favorece en particular la formación de las hélices α .

¿Se puede predecir la estructura de las proteínas usando este conocimiento de las preferencias conformacionales de los residuos de aminoácidos? Las predicciones de la estructura secundaria adoptada por un fragmento de seis o menos residuos han demostrado que son correctos en un 60–70%. ¿Qué se opone a una predicción más precisa? Tengamos en cuenta que las preferencias conformacionales de los residuos de aminoácidos no están limitadas simplemente a una estructura (ver Tabla 2.3). Por ejemplo, el glutamato, uno de los más firmes formadores de hélices, prefiere la hélice α a las hojas β únicamente por un factor de dos. Las relaciones de preferencia de la mayor parte de los otros residuos son aún más pequeñas. De hecho, se ha visto que algunas secuencias de penta y hexapéptidos adoptan una estructura en una proteína y otra completamente diferente en otra proteína (Figura 2.60). Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos definidas no son los únicos determinantes de la estructura secundaria. Las interacciones terciarias –interacciones entre residuos lejanos en la secuencia– pueden ser decisivas para especificar la estructura secundaria de algunos segmentos. El contexto es a menudo crucial para determinar el resultado conformacional. La conformación de una proteína ha evolucionado para trabajar en un entorno o contexto particular. Se han alcanzado grandes avances en la predicción de estructuras secundarias mediante la utilización de familias de secuencias emparejadas, las cuales adoptan la misma estructura.

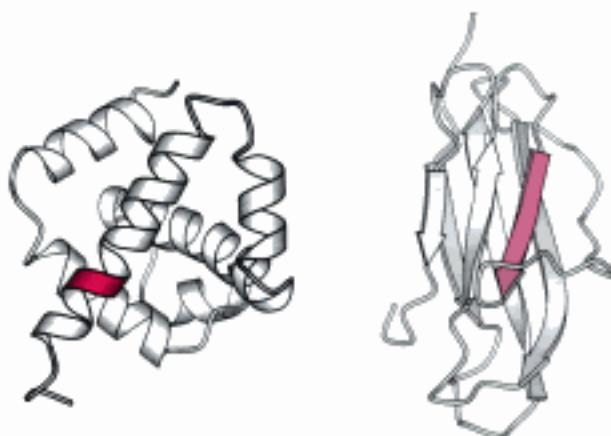


Figura 2.60 Conformaciones alternativas de una secuencia peptídica. En diferentes proteínas, muchas secuencias pueden adoptar conformaciones alternativas. La secuencia VDLLKN que se muestra en rojo, adopta una conformación en hélice β en un contexto proteico (izquierdo) y una hebra β , en otro (derecho). [Tomado de 3WRP.pdb (izq.) y 2HLA.pdb (dcha.).]

Algunas enfermedades neurológicas están asociadas a plegamientos y agregaciones de proteínas erróneas

 Hasta hace poco se creía que todas las enfermedades infecciosas eran transmitidas por virus o bacterias. Fue una enorme sorpresa para la medicina moderna el encontrar que ciertas enfermedades infecciosas de tipo neurológico se transmiten por agentes semejantes en tamaño a los virus pero compuestos únicamente por proteínas. Estas enfermedades incluyen la *encefalopatía espongiforme bovina* (popularmente conocida como *enfermedad de las vacas locas*) y las enfermedades análogas en otros organismos, incluyendo la *enfermedad de Creutzfeld-Jacob* (CJD) en el ser humano y la *scrapie* en ovinos. Los agentes que originan estas enfermedades se denominan *priones*. El primer proponente de la hipótesis de que algunas enfermedades podían transmitirse solamente por proteínas, Stanley Prusiner fue galardonado con el Premio Nobel en Medicina y Fisiología en el año 1997.

El estudio de estos agentes infecciosos reveló las siguientes características:

1. El agente transmisible consiste en formas agregadas de una proteína específica. Los agregados tienen un cierto margen de pesos moleculares.
2. Los agregados proteicos son resistentes a tratamientos con agentes que degradan a la mayoría de las proteínas.
3. La proteína es por completo o en su mayor parte derivada de una proteína celular, llamada PrP, normalmente presente en el cerebro.

¿Cómo la estructura de la proteína en la forma agregada se diferencia de la proteína en su estado normal en el cerebro? La estructura de la proteína PrP normal celular contiene extensas regiones de hélice α y relativamente pocas hebras β . La estructura de la forma de la proteína presente en los cerebros infectados, llamada PrP^c, no ha sido aún determinada debido a la dificultad basada en su insolubilidad y naturaleza heterogénea. Sin embargo, una serie de evidencias indican que algunas partes de la proteína que habían sido hélices α o giros se han convertido en hebras β . Las hebras β de una proteína se unen a otras para formar hojas β , uniendo así dos proteínas y dando lugar a la formación de agregados. Estos agregados fibrosos de proteína se llaman con frecuencia formas *amiloideas*.

Al comprobar que el agente infeccioso de la enfermedad priónica es la forma agregada de una proteína que ya estaba presente en el cerebro, aparece un modelo para la transmisión de la enfermedad (figura 2.61). Los agregados proteicos integrados por formas anormales de PrP actúan como núcleos a los que se unen otras moléculas de PrP. Las enfermedades priónicas pueden así contagiarse de un organismo individual a otro por medio de la transferencia de un núcleo agregado, como realmente ocurrió en la epidemia de la enfermedad de las vacas locas que apareció en el Reino Unido en la década de los 90. El ganado alimentado con piensos animales que contenían material procedente de vacas enfermas desarrolló a su vez la enfermedad.

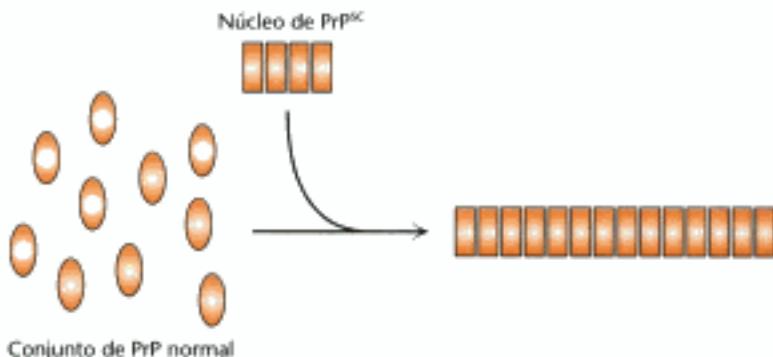


Figura 2.61 Modelo proteico de la transmisión de la enfermedad priónica. Un núcleo formado por proteínas con una configuración anómala crece por la adición de proteínas del conjunto normal.

También se han visto fibras amiloideas en los cerebros de los pacientes con ciertas enfermedades neurodegenerativas no infecciosas tales como el Alzheimer o el Parkinson. Así, por ejemplo, los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer contienen agregados proteicos, llamados *placas amiloideas*, que consisten principalmente en agregados de un único polipéptido llamado A β . Este polipéptido deriva de una proteína celular, la *proteína precursora del amiloide*, o APP, por acción de proteasas específicas. El polipéptido A β tiende a formar agregados insolubles. A pesar de las dificultades derivadas de la insolubilidad de la proteína, se ha obtenido un modelo estructural detallado de A β mediante el uso de técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) que se aplican mejor a los materiales sólidos que a las disoluciones. Tal como se esperaba, la estructura es rica en hebras β que se juntan para formar extensas estructuras de láminas β paralelas (fig. 2.62).

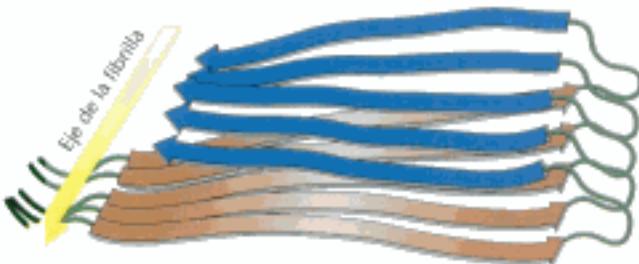


Figura 2.62 Estructura de las fibras amiloideas. Un modelo detallado para las fibrillas A β , deducido de estudios de RMN en fase sólida muestra que la agregación proteica se debe a la formación de grandes láminas β paralelas. [Tomado de A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzukin, R. D. Leapman, F. Delaglio y R. Tycko. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 (2002) 16742-16747.]

¿Cómo pueden los agregados conducir a la muerte de las células que los albergan? La respuesta es aún controvertida. Una hipótesis afirma que los agregados grandes no son tóxicos por sí mismos, sino que los culpables pueden ser los agregados menores de la misma proteína, quizás por dañar a las membranas celulares.

El plegamiento proteico es un proceso muy cooperativo

Como se ha señalado anteriormente, las proteínas se pueden desnaturalizar por calor o por medio de desnaturalizantes químicos como la urea o el cloruro de guanidinio. En muchas proteínas, una comparación del grado de despliegue cuando se incrementa la concentración del agente desnaturalizante ha revelado una transición relativamente abrupta de la forma plegada, o nativa, a la desplegada, o desnaturalizada, sugiriendo que estas dos conformaciones son las únicas presentes con entidad significativa (Figura 2.63). Si se comienza con proteínas desplegadas y se quita el desnaturalizante, permitiendo que las proteínas se plieguen, se observa una transición brusca similar.

La brusca transición que se aprecia en la figura 2.63 sugiere que el plegamiento y el despliegamiento de una proteína es *un proceso* de prácticamente "todo o nada" que se produce por una *transición cooperativa*. Por ejemplo, supongamos que una proteína está en unas condiciones en las que algunas partes de la estructura proteica son termodinámicamente inestables. Cuando esta parte de la estructura plegada se desorganiza, se pierden sus interacciones con el resto de la proteína. La pérdida de estas interacciones, desestabilizará a su vez al resto de la estructura. Así, las condiciones que producen la desestabilización de cualquier parte de la estructura proteica probablemente desenredan completamente la proteína. Las propiedades estructurales de las proteínas proporcionan una base clara para la transición cooperativa.

Las consecuencias del plegamiento cooperativo se pueden ilustrar considerando el contenido de una disolución proteica en condiciones que corresponden al punto medio de la transición entre las formas plegada y desplegada. En estas condiciones, la proteína está "medio plegada". Sin embargo, la disolución no contendrá moléculas medio plegadas sino que, en cambio, habrá una mezcla al cincuenta por ciento de moléculas completamente plegadas y otras completamente desplegadas (Figura 2.64). Aunque la proteína parezca comportarse como si sólo existiera en dos estados, a nivel atómico, esta existencia simple en dos estados resulta imposible. Deben existir estructuras intermedias transitorias e inestables entre los estados nativo y desnaturalizado (p. 56). La determinación de la naturaleza de estas estructuras intermedias constituye un área de intensa investigación bioquímica.

Las proteínas se pliegan por estabilización progresiva de intermediarios más que por búsqueda aleatoria

¿Cómo realiza una proteína la transición de una estructura desplegada a una conformación única en la forma nativa? Una posibilidad *a priori* sería que se intentasen todas las conformaciones posibles para hallar la más favorable energéticamente. ¿Cuánto tardaría esta búsqueda aleatoria? Consideremos una proteína pequeña de 100 residuos. Cyrus Levinthal calculó que, si cada residuo puede asumir tres conformaciones diferentes, el número total de estructuras sería 3^{100} , que es igual a 5×10^{47} . Si la conversión de una estructura en otra tarda 10^{-13} s, el tiempo total de búsqueda sería $5 \times 10^{47} \times 10^{-13}$ s, lo que equivale a 5×10^{34} s, es decir, 1.6×10^{27} años. Sin duda, llevaría mucho tiempo, incluso para una proteína pequeña, plegarse adecuadamente intentando todas las conformaciones posibles de forma aleatoria. La enorme diferencia entre los tiempos calculados y los reales para el plegamiento se conoce como *la paradoja de Levinthal*. Esta paradoja revela que las proteínas no se

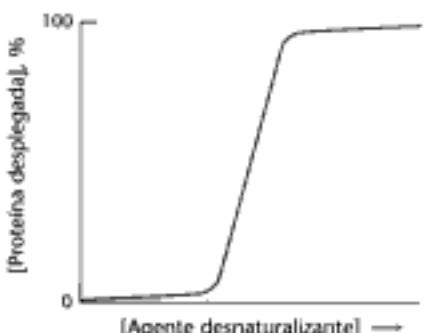


Figura 2.63 Transición desde el estado plegado al desplegado. La mayor parte de las proteínas experimentan una transición brusca desde la forma plegada hasta la desplegada cuando se les trata con concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes.

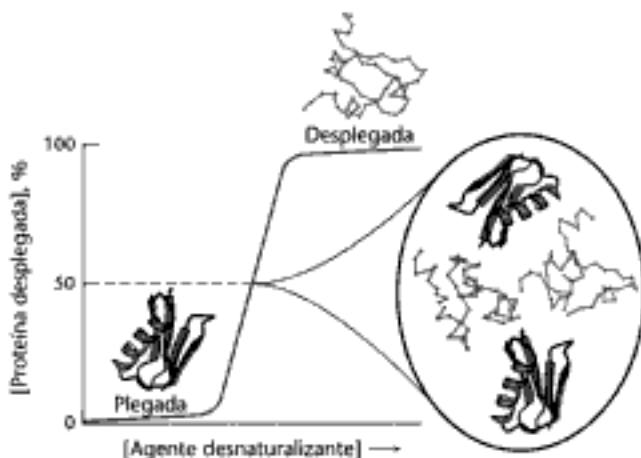


Figura 2.64 Componentes de una disolución proteica desnaturalizada parcialmente. En una disolución de proteína medio desplegada, la mitad de las moléculas están completamente plegadas y la otra mitad completamente desplegadas.

```

200 ?T\NG(+*x[A.N5~, #ATxSGpn-@0
400 oDr'Jh?#DFR:W4!u+v6zpJ@01
600 e2i@'8z@n527x8@8d_5h-Bldgeb,
800 S#d@>)/@ J@ZqC@P@DK<|^*asez,
1000 V0E@>@L@ut/1@j@_woj@#aser,
1200 ju@+@v@ it is !@uh?SC-ase5,
1400 I@ed@4@ it is @s/Ix@ase-,
1600 @?E@H@r@ it is EX@?T@_weasel,
1800 @ethinks it is @w@N7@K@_weasel,
2000 @ethinks it is like@,weasel,
2200 @ethinks it is like@5@weasel,
2400 @ethinks it is likyda@,weasel,
2600 @ethinks it is lik2d@weasel,
2800 @ethinks it is like@,weasel,
2883 @ethinks it is like a weasel.

```

```

200 1z-Bq)W4([cu!kD|d6jS!NIEyUxp
400 "W h@,ER.<&CfAV4-Y1G!iT@6(|@6
600 .L-hink@4(uMGP@^A@oE6klwM=yiS
800 @ethinks@Pa_vYH@,R@Hb,Do4`-(,
1000 OF@hinks@P@fZ0@li8v] +/Eln26B
1200 6@hinks@MVT -V@likm+g1@K-)BFk
1400 vx@hinks@Et@_Ow like@SIG@utks,
1600 :O@hinks@lt@ MC likesN2@,V@4,
1800 ux@hinks@qt@ Or like@Qh@weo@M,
2000 Y@hinks it id like@7@wed@e@,
2200 @ethinks it i@ like a@weasel,
2400 @ethinks it is like a@weasel,
2431 @ethinks it is like a weasel.

```

Figura 2.65 Analogía del mono mecanógrafo. Un mono tecleando al azar en una máquina de escribir podría escribir una línea del Hamlet de Shakespeare, siempre que las pulsaciones correctas se conservaran. En las dos simulaciones por ordenador que se muestran, el número acumulativo de pulsaciones se indica a la izquierda de cada línea.

pliegan intentando adoptar todas las conformaciones posibles, sino que deben seguir al menos unas vías de plegado parcialmente definidas por medio de ciertos intermedios entre la proteína totalmente desnaturalizada y la estructura nativa.

La salida a este dilema es reconocer la fuerza de la *selección acumulativa*. Richard Dawkins en *El relojero ciego*, se preguntaba cuánto tardaría un mono tecleando al azar en una máquina de escribir para reproducir el comentario de Hamlet a Polonio, *Methinks it is like a weasel* (A mi parecer es como una comadreja) (Figura 2.65). Se requerirían un número astronómicamente grande de pulsaciones, del orden de 10^{40} . Sin embargo supongamos que guardamos cada carácter correcto y permitimos al mono volver a teclear sólo los incorrectos. En este caso, sólo se necesitarían unos miles de pulsaciones, como media. La diferencia crucial entre estos casos es que el primero emplea una búsqueda completamente aleatoria, mientras que en el segundo, *los intermedios parcialmente correctos se guardan*.

La esencia del plegamiento proteico es la retención de los intermedios parcialmente correctos. Sin embargo, el problema del plegamiento proteico es mucho más difícil que el que se le presenta a nuestro simio shakespeareano. Primero, el criterio de exactitud no se deriva de un escrutinio residuo a residuo de la conformación por un observador omnisciente sino de la energía libre total de las especies transitórias. Segundo, las proteínas son sólo ligeramente estables. La diferencia de energía libre entre los estados plegado y desplegado de una proteína típica de 100 residuos es 42 kJ mol^{-1} (10 kcal mol^{-1}) y por ello cada residuo contribuye por media solamente en $0,42 \text{ kJ mol}^{-1}$ (1 kcal mol^{-1}) de energía a mantener el estado plegado. Esta cantidad es menor que la de la energía térmica, que es $0,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) a temperatura ambiente. Esta escasa energía de estabilización indica que se pueden perder los intermedios correctos, especialmente los formados al comienzo del plegamiento. La analogía es que el mono sería, en cierto modo, libre para deshacer sus pulsaciones correctas. Sin embargo, las interacciones que conducen al plegamiento cooperativo pueden estabilizar intermedios cuando se van construyendo las estructuras. Por ello, las regiones locales, que tienen una preferencia estructural significativa, aunque no necesariamente estables por sí mismas, tenderán a adoptar sus estructuras favorecidas y, cuando se formen, podrán interaccionar entre ellas, produciendo una estabilización incrementada. Este entrampado conceptual se suele denominar *el modelo de nucleación-condensación*.

En la figura 2.66 se muestra una simulación del plegamiento de una proteína basado en el modelo de nucleación–condensación. Este modelo sugiere que ciertas vías pueden ser preferidas. Aunque la figura 2.66 sugiere una vía diferenciada, cada uno de los intermedios mostrados representa un conjunto de estructuras similares y así la proteína sigue un camino genérico en vez de preciso en su transición desde el estado desenrollado al nativo. La energía superficial para el proceso conjunto del plegado de la proteína puede compararse con un embudo. La parte ancha del embudo representa la amplia posibilidad de estructuras accesibles al ensamblaje de las moléculas proteicas desnaturalizadas. A medida que la energía libre de la población de

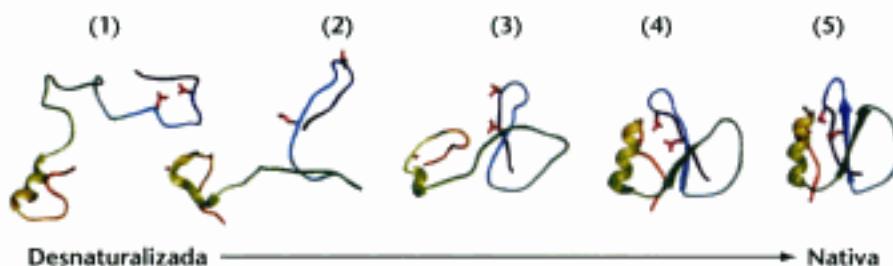


Figura 2.66 Vía de plegamiento propuesta para el inhibidor de la quimotripsina. Inicialmente las regiones locales con suficiente preferencia estructural tienden a adoptar sus estructuras favorables (1). Estas estructuras se juntan para formar un núcleo con una estructura tipo nativo, pero todavía móvil (4). Esta estructura entonces se condensa plenamente para formar la estructura nativa más rígida (5). [Tomado de A. R. Fersht y V. Daggett, Cell 108 (2002); 573–582, con permiso de Elsevier.]

moléculas proteicas disminuye, las proteínas se desplazan bajando a las partes más estrechas del embudo que corresponde al estado plegado con su conformación bien definida. Para alcanzar este mismo estado de mínima energía se pueden seguir caminos diversos.

La predicción de la estructura tridimensional a partir de la secuencia continua siendo un gran reto

La predicción de una estructura tridimensional de una proteína a partir de la secuencia ha resultado ser extremadamente difícil. Como hemos visto, la secuencia local parece determinar sólo entre el 60 y el 70% de la estructura secundaria; se requieren interacciones de largo alcance para fijar la estructura secundaria completa y la estructura terciaria.

Los investigadores están explorando dos aproximaciones completamente diferentes para predecir la estructura tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos. La primera es la *predicción ab initio* (desde el comienzo), que intenta predecir el plegamiento de una secuencia de aminoácidos sin ninguna referencia directa a otras estructuras conocidas en proteínas. Se emplean cálculos computacionales para intentar reducir al mínimo la energía libre de una estructura con una determinada secuencia de aminoácidos o para simular el proceso de plegamiento. La utilidad de estos métodos es limitada debido al inmenso número de conformaciones posibles, la estabilidad marginal de las proteínas y la sutil energética de las interacciones débiles en disoluciones acuosas. El segundo abordaje se aprovecha de nuestro conocimiento creciente de las estructuras tridimensionales de muchas proteínas. En estos *métodos basados en el conocimiento*, una secuencia de aminoácidos de estructura desconocida se compara con cualquier estructura proteica ya conocida. Si se detecta un emparejamiento significativo, la estructura conocida se usa como modelo inicial. Los métodos basados en el conocimiento han sido fuente de intuición sobre la conformación tridimensional de proteínas de secuencia conocida pero estructura desconocida.

La modificación y escisión de las proteínas les confieren nuevas capacidades

 Las proteínas son capaces de realizar numerosas funciones basándose únicamente en la versatilidad de sus 20 aminoácidos. Además, muchas proteínas están modificadas covalentemente para aumentar sus funciones por unión de grupos que no son aminoácidos (Figura 2.67). Por ejemplo, se pueden unir *grupos acetilo* al grupo aminoterminal de muchas proteínas, una modificación que convierte a estas proteínas en más resistentes a la degradación. Como ya se ha visto (p. 46) la adición de *grupos hidroxilo* a muchos residuos de prolina estabiliza las fibras recién sintetizadas de colágeno. El significado biológico de esta modificación es evidente en la enfermedad del escorbuto: una deficiencia de vitamina C ocasiona una hidroxila-

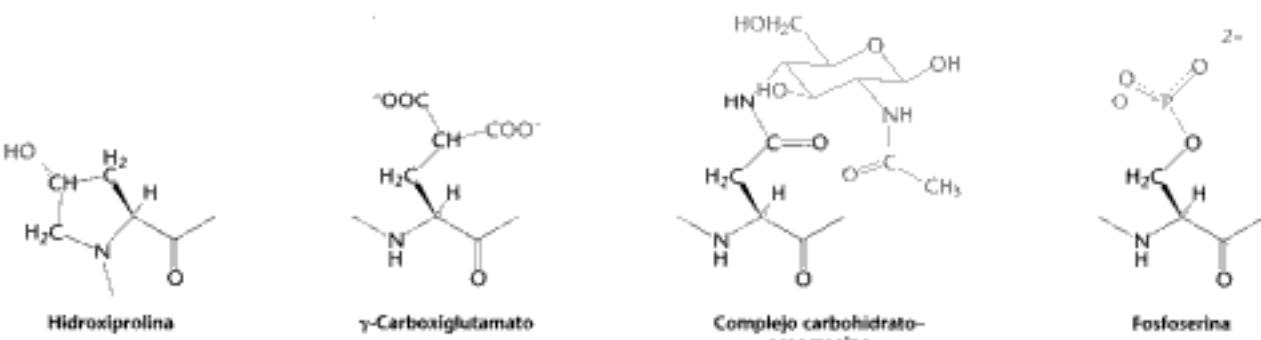


Figura 2.67 Toques finales. Se muestran algunas modificaciones covalentes comunes e importantes de las cadenas laterales.

ción insuficiente del colágeno, y las fibras anormales resultantes de colágeno son incapaces de mantener la resistencia normal del tejido (Sección 27.5). Otro aminoácido especializado producido por un cambio final es el γ -carboxiglutamato. En la deficiencia de vitamina K, la carboxilación insuficiente del glutamato de la protrombina, una proteína de la coagulación, puede producir hemorragias (p. 295). Muchas proteínas, especialmente las que están presentes en la superficie celular o se secretan, llevan *unidades de carbohidrato* unidas a residuos específicos de asparragina (Capítulo 11). El añadir azúcares hace a las proteínas más hidrofílicas y capaces de participar en interacciones con otras proteínas. A la inversa, el añadir un *ácido graso* a un grupo α -amino o al grupo sulfhidrilo de una cisteína produce una proteína más hidrofóbica.

Muchas hormonas, como la adrenalina (epinefrina), alteran las actividades de los enzimas a través de la estimulación de la fosforilación de los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina. La *fososerina* y la *fosftreonina* son los aminoácidos modificados más comunes en las proteínas. Los factores de crecimiento como la insulina desencadenan la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos de tirosina hasta formar *fosftirosina*. Los grupos fosforilo de estos tres aminoácidos modificados se pueden liberar con facilidad; por ello, son capaces de actuar como interruptores reversibles en la regulación de los procesos celulares. Los papeles de la fosforilación en la transducción de señales se tratarán ampliamente en el Capítulo 14.

Las modificaciones precedentes consisten en añadir grupos especiales a los aminoácidos. Otros grupos especiales se generan por reorganización química de las cadenas laterales y, a veces, del esqueleto peptídico. Por ejemplo, algunas medusas producen una proteína fluorescente verde (Figura 2.68). La fuente de la fluorescencia es un grupo formado por reorganización espontánea y oxidación de la secuencia Ser-

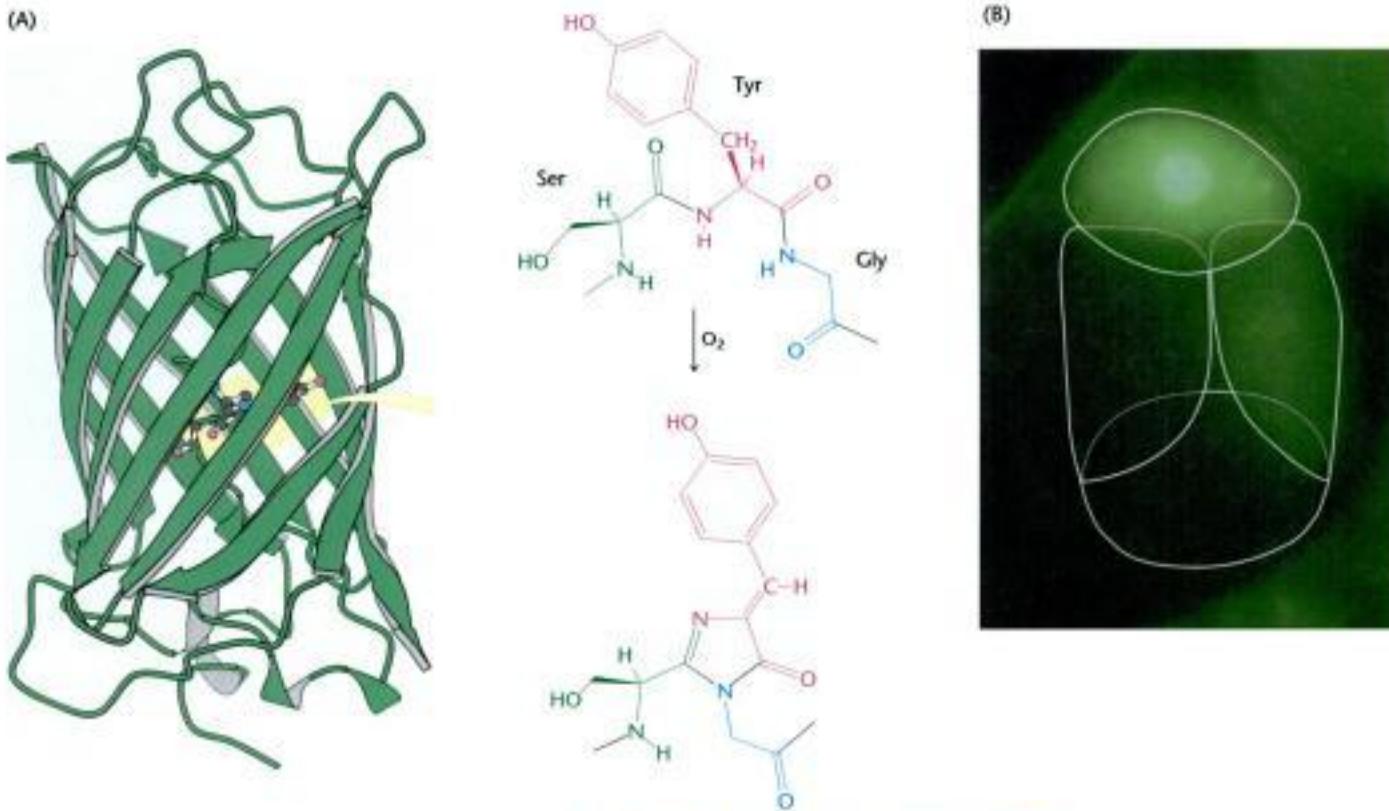


Figura 2.68 Reorganizaciones químicas en la GFP. (A) Estructura de la proteína verde fluorescente (GFP, "green fluorescent protein"). La reorganización y oxidación de la secuencia Ser-Tyr-Gly es la fuente de la fluorescencia. (B) Micrografía fluorescente de un embrión de cuatro células (las células están resaltadas) del gusano *Caenorhabditis elegans* que contiene una proteína, PIE-1, marcada con GFP. La proteína se expresa sólo en la célula (arriba) que dará lugar a la línea germinal [(A) Tomado de 1GFL.pdb; (B) Cortesía de Geraldine Seydoux.]

Tyr-Gly en el centro de la proteína. Esta proteína es de gran utilidad a los investigadores como marcador intracelular (p. 89).

Por último, muchas proteínas se cortan y adaptan tras la síntesis. Por ejemplo, los enzimas digestivos se sintetizan como precursores inactivos que se pueden almacenar con seguridad en el páncreas. Tras su liberación al intestino, estos precursores se activan por ruptura de enlaces peptídicos (p. 289). En la coagulación sanguínea, la ruptura de enlaces convierte el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble (p. 293). Una serie de hormonas polipeptídicas, como la hormona adrenocorticotrópica, se producen por la división de una proteína precursora más extensa. De modo similar, muchas proteínas víricas se producen por escisión de proteínas precursoras de mayor tamaño. Encontraremos muchos más ejemplos de modificación y ruptura como rasgos claves en la formación y función de las proteínas. Evidentemente, estos toques finales tienen mucho que ver con la versatilidad, precisión y elegancia de la acción proteica y su regulación.

Resumen

La estructura de las proteínas se puede describir en cuatro niveles. La estructura primaria se relaciona con la secuencia de aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a la conformación adoptada por regiones locales de la cadena polipeptídica. La estructura terciaria describe el plegamiento global de la cadena polipeptídica. Finalmente, la estructura cuaternaria se refiere a la asociación específica de múltiples cadenas polipeptídicas para formar complejos de múltiples subunidades.

2.1 Las proteínas se construyen a partir de una colección de veinte aminoácidos

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos. Cada aminoácido está formado por un átomo de carbono central tetraédrico unido a un grupo amino, un grupo ácido carboxílico, una cadena lateral específica y un hidrógeno. Estos centros tetraédricos, con la excepción del de la glicina, son quirales; existiendo sólo el isómero L en proteínas naturales. Todas las proteínas naturales se construyen a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos. Las cadenas laterales de estos 20 sillares de construcción varían enormemente en tamaño, forma y presencia de grupos funcionales. Se pueden agrupar como sigue: (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina y prolina; (2) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (3) cadenas laterales alifáticas con grupos hidroxilo: serina y treonina; (4) cisteína con un grupo sulfhidrilo; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales acídicas: ácido aspártico y ácido glutámico y (7) cadenas laterales con carboxiamida: asparagina y glutamina. Estos agrupamientos son en cierto modo arbitrarios y también son posibles otros muchos agrupamientos razonables.

2.2 Estructura primaria: los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas polipeptídicas

Los aminoácidos de un polipéptido están unidos por enlaces amida formados entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente. Esta unión, conocida como enlace peptídico, tiene varias propiedades importantes. Primero, es resistente a la hidrólisis por lo que las proteínas son muy estables cinéticamente. Segundo, el grupo peptídico es plano porque el enlace C–N tiene un fuerte carácter de doble enlace. Tercero, cada enlace peptídico tiene tanto un dador de puente de hidrógeno (el grupo NH) como un acceptor (el grupo CO). El puente de hidrógeno entre estos grupos del esqueleto es un rasgo característico de la estructura proteica. Finalmente, el enlace peptídico no tiene carga, lo que permite a las proteínas formar estructuras globulares fuertemente empaquetadas que tienen cantidades significativas del esqueleto enterradas en

el interior de la proteína. Debido a que son polímeros lineales, las proteínas se pueden describir como secuencias de aminoácidos. Tales secuencias se escriben desde el extremo aminoácido hasta el carboxiterminal.

2.3 Estructura secundaria: las cadenas polipeptídicas se pueden plegar en estructuras regulares como la hélice α , la hoja β y giros y bucles

Dos elementos principales de la estructura secundaria son la hélice α y la hebra β . En la hélice α , la cadena polipeptídica se enrosca en un cilindro muy empaquetado. Dentro de la hélice, el grupo CO de cada aminoácido se une por puente de hidrógeno al grupo NH del aminoácido situado cuatro residuos más lejos en la cadena polipeptídica. En la hebra β , la cadena polipeptídica está prácticamente de forma totalmente extendida. Dos o más hebras β conectadas por puentes de hidrógeno entre NH y CO se juntan para formar hojas β . Las hebras de las hojas β pueden ser antiparalelas, paralelas o mixtas.

2.4 Estructura terciaria: las proteínas solubles en agua se pliegan en estructuras compactas con un interior no polar

La estructura compacta y asimétrica que forman las proteínas se conoce como estructura terciaria. Las estructuras terciarias de las proteínas solubles en agua tienen características comunes: (1) un interior formado por aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y (2) una superficie formada principalmente por aminoácidos hidrofilicos que interactúan con el entorno acuoso. La fuerza que provoca la formación de la estructura terciaria de las proteínas solubles en agua reside en las interacciones hidrofóbicas entre los residuos interiores. Algunas proteínas que se encuentran en un entorno hidrofóbico, en membranas, poseen una distribución inversa de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofilicos. En estas proteínas, los aminoácidos hidrofóbicos están en la superficie para interactuar con el entorno, mientras que los grupos hidrofilicos están apantallados del entorno en el interior de la proteína.

2.5 Estructura cuaternaria: las cadenas polipeptídicas se pueden ensamblar en estructuras de múltiples subunidades

Las proteínas que contienen más de una cadena polipeptídica presentan estructura cuaternaria, y cada cadena polipeptídica individual se conoce como una subunidad. La estructura cuaternaria puede ser tan simple como dos subunidades idénticas o tan compleja como docenas de subunidades diferentes. En la mayor parte de los casos, las subunidades se mantienen unidas por enlaces no covalentes.

2.6 La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional

La secuencia de aminoácidos determina totalmente la estructura tridimensional y, por ello, todas las otras propiedades de la proteína. Algunas proteínas se pueden desplegar completamente y luego replegarse de forma eficaz cuando se las coloca en condiciones en las que la forma plegada de la proteína es estable. La secuencia de aminoácidos de una proteína está determinada por la secuencia de bases de una molécula de DNA. Esta información unidimensional de la secuencia se proyecta al mundo tridimensional por la capacidad de plegarse espontáneamente. El plegamiento de proteínas es un proceso altamente cooperativo; no se acumulan los intermediarios estructurales entre las formas plegada y desplegada.

La versatilidad de las proteínas se ve incrementada posteriormente por las modificaciones covalentes. Tales modificaciones pueden incorporar grupos funcionales no presentes en los 20 aminoácidos. Otras modificaciones son importantes para la regulación de la actividad proteica. Gracias a su estabilidad estructural, diversidad y reactividad química, las proteínas posibilitan la mayor parte de los procesos clave asociados con la vida.

APÉNDICE: Visualización de estructuras moleculares II: Proteínas

Los científicos han desarrollado poderosas técnicas para determinar las estructuras de las proteínas, tal como se estudiará en el capítulo 3. En la mayoría de los casos, estas técnicas permiten establecer la posición de los millares de átomos de una estructura proteica. Los resultados finales de estos estudios incluyen el conocimiento de las coordenadas x , y y z de cada átomo de la estructura. Los archivos de coordenadas se recompilan en el *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) de donde pueden descargarse fácilmente. Estas estructuras comprenden miles y aun decenas de miles de átomos. La complejidad de las proteínas con miles de átomos constituye un desafío para la fijación de su estructura. Para describir esas proteínas se utilizan diferentes tipos de representaciones. Los tipos que veremos con más frecuencia en este libro son los modelos espaciales compactos, los modelos de esferas y varillas, los modelos de esqueleto y los diagramas de cintas. Donde sea conveniente anotaremos los aspectos estructurales de importancia o relevancia especiales en el pie de las figuras.

Modelos espaciales compactos

Los modelos espaciales compactos son el tipo de representación más realista. Cada átomo se muestra como una esfera con el tamaño que corresponde a su propio radio de van der Waals (p. 8). Los enlaces no se muestran explícitamente pero quedan representados por la intersección de sus esferas cuando estos átomos están más próximos entre sí de lo que sería la suma de sus radios de van der Waals. Se muestran todos los átomos, incluidos los que constituyen el esqueleto y los de las cadenas laterales. En la figura 2.69 se describe el modelo espacial compacto de la lisozima.

Los modelos compactos informan sobre el poco espacio abierto que hay en el interior de la estructura de las proteínas, que siempre contienen muchos átomos en contacto de van der Waals, uno con otro. Estos modelos son especialmente útiles para mostrar los cambios conformatacionales de una proteína al pasar de una serie de circunstancias a otras. Una desventaja de los modelos espaciales compactos es que con ellos resulta difícil visualizar las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas. En efecto, estos modelos no son eficaces para distinguir una proteína de otra: muchos modelos de proteínas así representadas resultan muy parecidos.

Modelos de esferas y varillas

Los modelos de esferas y varillas no resultan tan realistas como los espaciales compactos. Los átomos representados de forma más realista ocupan más espacio, determinado por los radios de van der Waals, que los descritos por los modelos de esferas y varillas. Sin embargo, la disposición de los enlaces resulta más fácil de visualizar porque estos enlaces están representados como varillas (Figura 2.70). El modelo de esferas y varillas revela una estructura compleja con más claridad que el modelo compacto. Sin embargo, esta representación re-

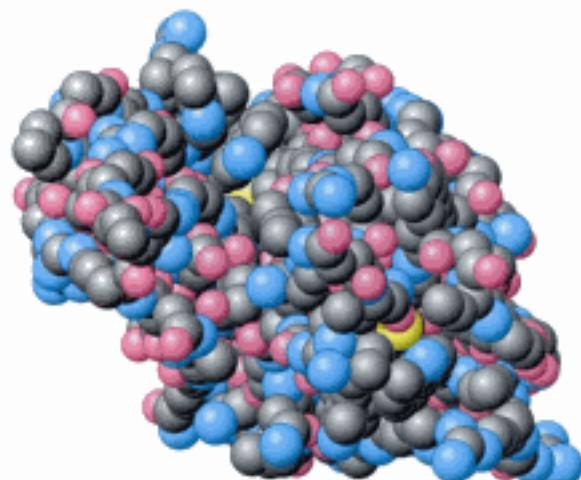


Figura 2.69 **Modelo espacial compacto de la lisozima.** Nótese lo fuertemente empaquetados que están los átomos, con muy poco espacio sin llenar. Se representan todos los átomos excepto los de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno se omiten con frecuencia porque sus posiciones no suelen determinarse por métodos de cristalografía de rayos X y porque su omisión mejora algo la claridad en la descripción de las estructuras.

sulta tan complicada que algunos aspectos estructurales, tales como las hélices α u otros sitios potenciales de enlace, son difíciles de distinguir.

Debido a que tanto el modelo espacial compacto como el de esferas y varillas describen las proteínas a nivel atómico, un elevado número de átomos en una estructura compleja hace difícil el discernir los aspectos estructurales relevantes. Por ello, para describir las estructuras macromoleculares se han ideado representaciones más esquemáticas, tales como los modelos de esqueleto o los diagramas de cintas. En estas representaciones no se representan de forma explícita la mayoría de los átomos integrantes.

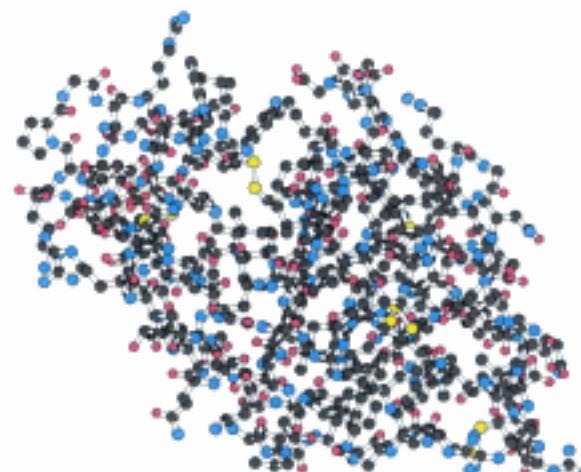


Figura 2.70 **Modelo de esferas y varillas de la lisozima.** De nuevo, se omiten los átomos de hidrógeno.

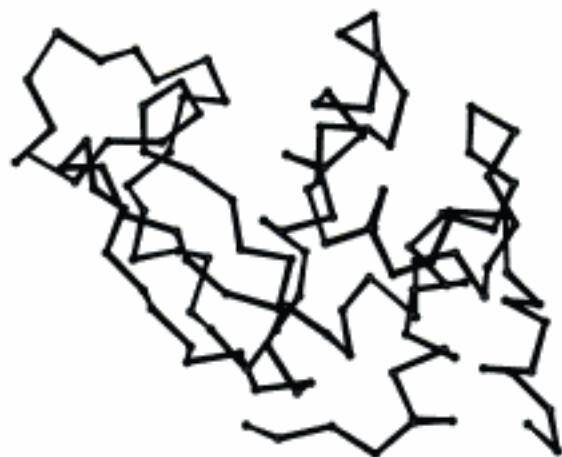


Figura 2.71 Modelo de esqueleto de la lisozima.

Modelos de esqueleto

Los modelos esqueleto muestran solamente los átomos del esqueleto de un polipéptido o incluso sólo los carbonos α de cada aminoácido. Los átomos están unidos por líneas que representan los enlaces; si solamente se representan los carbonos α , las líneas conectan el átomo de carbono α de una aminoácido con el átomo de carbono α del aminoácido adyacente en la secuencia (Figura 2.71). En este libro los modelos de esqueleto muestran sólo las líneas que conectan los átomos de carbono α ; los otros carbonos no se representan.

Los modelos de esqueleto muestran el curso completo de la cadena polipeptídica mucho mejor que los modelos compactos o los de esferas y varillas. Sin embargo los elementos estructurales secundarios son difíciles de visualizar.

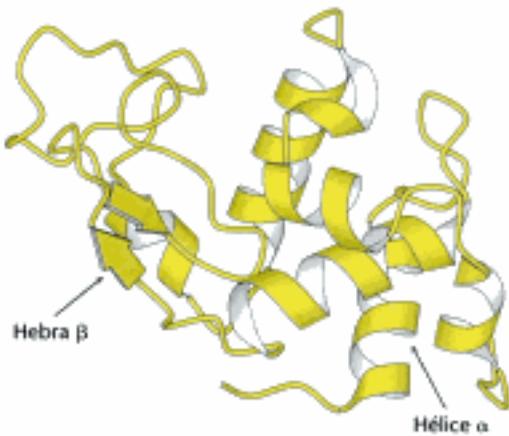


Figura 2.72 Diagrama de cintas de la lisozima. Las hélices α se muestran como cintas enrolladas; las hebras β se describen como flechas. Las estructuras más irregulares se ven como tubos delgados.

Diagramas de cintas

Los diagramas de cintas son muy esquemáticos y son los más utilizados para resaltar algunos aspectos trascendentales de la estructura proteica, tales como la hélice α (representada por una cinta enrollada o por un cilindro) la hebra β (una flecha ancha) y los lazos (líneas simples) para aportar visiones claras de los patrones de plegado de las proteínas (Figura 2.72). Los diagramas de cintas permiten que el curso de la cadena polipeptídica se siga fácilmente y muestran los elementos de la estructura secundaria. Por consiguiente, los diagramas de proteínas que están emparentadas unas con otras por evolución divergente son semejantes (Figura 6.14), mientras que las proteínas no emparentadas resultan claramente distintas.

En este libro se utilizarán normalmente las cintas enrolladas para describir las hélices α . Sin embargo, para las proteínas de membrana, que suelen ser muy complejas, se preferirán los cilindros a las cintas enrolladas. Esta convención permite reconocer fácilmente a las proteínas de membrana con sus hélices α que atraviesan la membrana (Figura 12.18).

Es de advertir que la apariencia abierta de los diagramas de cintas es decepcionante. Como se ha visto antes, las estructuras de las proteínas están fuertemente empaquetadas y tienen poco espacio abierto. La apertura de los diagramas de cintas las hace particularmente útiles como armazón sobre el que reseñar aspectos adicionales de la estructura proteica. Los centros activos, los sustratos y otros fragmentos estructurales pueden incluirse en forma de esferas y varillas o de espacios llenos dentro de un diagrama de cintas (Figura 2.73).

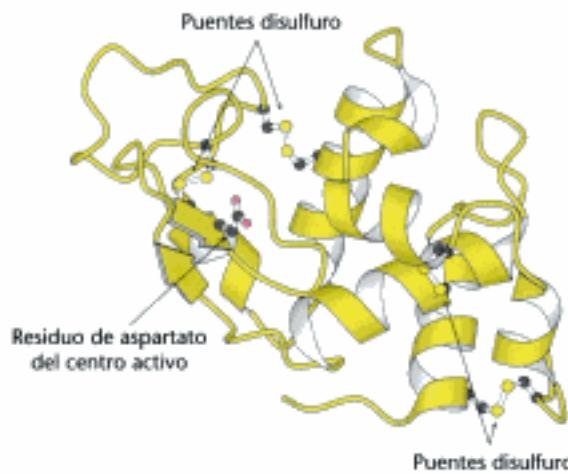


Figura 2.73 Diagrama de cintas de la lisozima con zonas resaltadas. Los cuatro puentes disulfuro y un residuo de aspartato funcionalmente importante se muestran en forma de esferas y varillas.

Términos clave

cadena lateral (grupo R) (p. 27)
L-aminoácido (p. 27)
ión dipolar (zwitterión) (p. 27)

enlace peptídico (enlace amida) (p. 34)
puente disulfuro (p. 35)
estructura primaria (p. 36)

ángulo de torsión (p. 39)
ángulo ϕ (ϕ) (p. 39)
ángulo ψ (ψ) (p. 39)

diagrama de Ramachandran (p. 39)	giro inverso (giro β ; giro en horquilla) (p. 44)	dominio (p. 49)
estructura secundaria (p. 40)	superenrollamiento (p. 45)	subunidad (p. 49)
hélice α (p. 40)	héptadas repetidas (p. 45)	estructura cuaternaria (p. 49)
ascenso (p. 40)	estructura terciaria (p. 47)	príon (p. 53)
traslación (p. 40)	motivo estructural (p. 49)	transición cooperativa (p. 55)
hoja plegada β (p. 42)	estructura supersecundaria (p. 49)	
hebra β (p. 42)		

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Richardson, J. S., 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167–339.
 Doolittle, R. F., 1985. Proteins. *Sci. Am.* 253(4):88–99.
 Richards, E. M., 1991. The protein folding problem. *Sci. Am.* 264(1): 54–57.
 Weber, A. L. y Miller, S. L., 1981. Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J. Mol. Evol.* 17:273–284.

Libros

- Petsko, G. A. y Ringe, D., 2004. *Protein Structure and Function*. New Science Press.
 Branden, C., Tooze, J., 1999. *Introduction to Protein Structure* (2d ed.). Garland.
 Perutz, M. E., 1992. *Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy*. W. H. Freeman and Company.
 Creighton, T. E., 1992. *Proteins: Structures and Molecular Principles* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.

Conformación de proteínas

- Dobson, C. M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884–890.
 Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., Quinn, T. P., Hecht, M. H., Erickson, B. W., Yan, Y., McClain, R. D., Donlan, M. E. y Surles, M. C., 1992. Looking at proteins: Representations, folding, packing, and design. *Biophys. J.* 63: 1186–1220.
 Chothia, C. y Finkelstein, A. V., 1990. The classification and origin of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.* 59:1007–1039.

Hélices α , hojas β y bucles

- O'Neil, K. T. y DeGrado, W. F., 1990. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250:646–651.
 Zhang, C. y Kim, S. H., 2000. The anatomy of protein beta-sheet topology. *J. Mol. Biol.* 299:1075–1089.
 Regan, L., 1994. Protein structure: Born to be beta. *Curr. Biol.* 4:656–658.
 Leszczynski, J. F. y Rose, G. D., 1986. Loops in globular proteins: A novel category of secondary structure. *Science* 234:849–855.
 Srinivasan, R. y Rose, G. D., 1999. A physical basis for protein secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14258–14263.

Dominios

- Bennett, M. J., Choe, S. y Eisenberg, D., 1994. Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3127–3131.
 Bergdoll, M., Ellis, L. D., Cameron, A. D., Dumas, P. y Bolin, J. T., 1998. All in the family: Structural and evolutionary relationships

among three modular proteins with diverse functions and variable assembly. *Protein Sci.* 7:1661–1670.

- Hopfner, K. P., Kopecky, E., Kresse, G. B., Bode, W., Huber, R. y Engh, R. A., 1998. New enzyme lineages by subdomain shuffling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9813–9818.
 Poeting, C. P., Schultz, J., Copley, R. R., Andrade, M. A. y Bork, P., 2000. Evolution of domain families. *Adv. Protein Chem.* 54: 185–244.

Plegamiento de proteínas

- Caughey, B. y Lansbury, P. T., 2003. Protobibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 267–298.
 Daggett, V. y Fersht, A. R., 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* 28: 18–25.
 Selkoe, D. J., 2003. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426: 900–904.
 Anfinsen, C. B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223–230.
 Baldwin, R. L. y Rose, G. D., 1999. Is protein folding hierachic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* 24:26–33.
 Baldwin, R. L. y Rose, G. D., 1999. Is protein folding hierachic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* 24:77–83.
 Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L. y Baker, D., 2003. Design of a novel globular protein with atomic level accuracy. *Science* 302: 1364–1368.
 Staley, J. P. y Kim, P. S., 1990. Role of a subdomain in the folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Nature* 344:685–688.

Modificación covalente de proteínas

- Krishna, R. G. y Wold, F., 1993. Post-translational modification of proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 67:265–298.
 Aletta, J. M., Cimato, T. R. y Ettinger, M. J., 1998. Protein methylation: A signal event in post-translational modification. *Trends Biochem. Sci.* 23:89–91.
 Glazer, A. N., DeLange, R. J. y Sigman, D. S., 1975. *Chemical Modification of Proteins*. North-Holland.
 Tsien, R. Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.

Gráficas moleculares

- Kraulis, P., 1991. MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24:946–950.
 Ferrin, T., Huang, C., Jarvis, L. y Langridge, R., 1988. The MIDAS display system. *J. Mol. Graphics* 6:13–27.
 Richardson, D. C. y Richardson, J. S., 1994. Kinemage: Simple macromolecular graphics for interactive teaching and publication. *Trends Biochem. Sci.* 19:135–138.

Problemas

1. *Forma y dimensión.* (a) La tropomiosina, una proteína muscular de 70 kd, está formada por un superhelicoide de hélices α con dos hebras. Calcular la longitud de la molécula. (b) Suponer que un seg-

mento proteico de 40 residuos se pliega en una estructura β antiparalela de dos hebras con un giro en horquilla de 4 residuos. ¿Cuál es la longitud máxima de este motivo?

2. *Contraste entre isómeros.* La poli-L-leucina es hélice α en un disolvente orgánico como el dioxano, mientras que la poli-L-isoleucina no lo es. ¿Por qué estos aminoácidos con el mismo número y tipo de átomos tienen diferentes tendencias para formar hélices?

3. *De nuevo activo.* Una mutación que cambia un residuo de alanina por valina en el interior de una proteína produce pérdida de actividad. Sin embargo, la actividad se recupera cuando una segunda mutación en una posición diferente cambia un residuo de isoleucina por glicina. ¿Cómo podría esta segunda mutación conducir a un restablecimiento de la actividad?

4. *Ensayo desconcertante.* Se ha aislado un enzima llamado proteína disulfuro isomerasa (PDI) que cataliza las reacciones de intercambio disulfuro-sulfhidrilo. El PDI convierte rápidamente la ribonucleasa revuelta en ribonucleasa enzimáticamente activa. Por otra parte, la insulina se inactiva rápidamente por PDI. ¿Qué implica esta importante observación en la relación entre la secuencia de aminoácidos de la insulina y su estructura tridimensional?

5. *Extender una diana.* Una proteasa es un enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas diana. ¿Cómo puede la proteasa unirse a la proteína diana de modo que la cadena principal del péptido se extienda completamente en la cercanía del enlace peptídico vulnerable?

6. *A menudo irremplazable.* La glicina es un residuo de aminoácido muy conservado en la evolución de las proteínas. ¿Por qué?

7. *Socios potenciales.* Identificar los grupos de una proteína que pueden formar puentes de hidrógeno y enlaces electrostáticos con una cadena lateral de arginina a pH 7.

8. *Ondulación permanente.* La forma del pelo está determinada en parte por el patrón de puentes disulfuro de la queratina, su proteína principal. ¿Cómo se pueden crear rizos?

9. *La ubicación lo es todo.* Las proteínas que atraviesan las membranas biológicas contienen a menudo hélices α . Habida cuenta que el interior de las membranas es muy hidrofóbico (Sección 12.2), predecir qué tipo de aminoácidos habría en estas hélices. ¿Por qué una hélice α es especialmente adecuada para encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una membrana?

10. *Rasgos de estabilidad.* Las proteínas son muy estables. La vida media de un enlace peptídico en disolución acuosa es casi 1000 años. Sin embargo, la energía libre de la hidrólisis de las proteínas es negativa y muy grande. ¿Cómo se puede justificar la estabilidad del enlace peptídico teniendo en cuenta el hecho de que la hidrólisis libera una gran cantidad de energía?

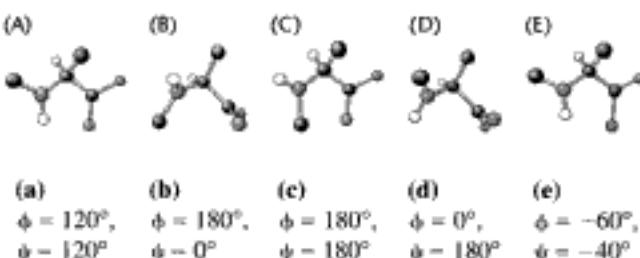
11. *Especies menores.* En un aminoácido como la alanina, la forma principal a pH 7 en disolución es la zwitteriónica. Suponiendo un valor de pK_a de 8 para el grupo amino y un valor de pK_b de 3 para el ácido carboxílico, calcular la proporción entre la concentración de la forma neutra del aminoácido (con el ácido carboxílico protonado y el grupo amino neutro) y la forma zwitteriónica a pH 7.

12. *Cuestión de convención.* Todos los L-aminoácidos tienen una configuración absoluta S, excepto la L-cisteína que tiene una configuración R. Explicar por qué se considera que la L-cisteína tiene una configuración absoluta R.

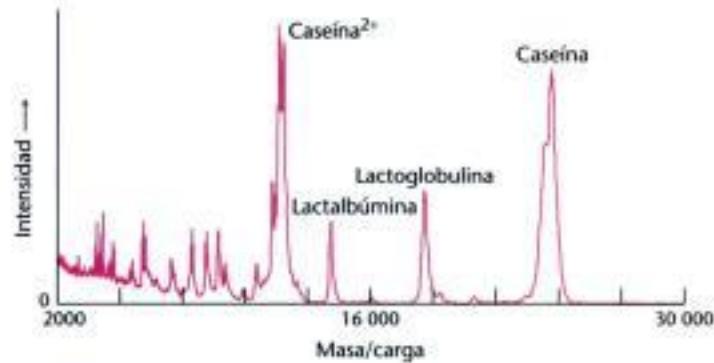
13. *Mensaje oculto.* Traducir la siguiente secuencia de aminoácidos en código de una letra: Glu-Leu-Val-Ile-Ser-Ile-Ser-Leu-Ile-Val-Ile-Asn-Gly-Ile-Asn-Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Gly-Ala-Ser.

14. *¿Quién va primero?* ¿Se esperaría que los enlaces peptídicos Pro-X tendieran a adoptar una conformación cis como los enlaces X-Pro? ¿Por qué sí o por qué no?

15. *Emparejando.* Para cada uno de los derivados de aminoácidos mostrados abajo (A-E) encontrar su correspondiente serie de valores ϕ y ψ (a-e).



Investigación en proteínas y proteomas



La leche, una fuente de alimento para todos los mamíferos, se compone, en parte, de un conjunto de proteínas. Los componentes proteicos de la leche se desvelan mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, que separa las moléculas en base a su relación entre masa y carga. (Izquierda) Jean Paul Iris/FPG; (derecha) cortesía de Brian Chait.]

Las proteínas desempeñan un papel crucial en casi todos los procesos biológicos: en la catálisis, la transducción de señales y como soportes estructurales. Esta gama considerable de funciones diferentes se debe a la existencia de miles de proteínas, cada una plegada en una estructura tridimensional específica, que le permite interaccionar con una o más de un conjunto de moléculas muy variado. Una finalidad primordial de la bioquímica es el determinar cómo las secuencias de aminoácidos especifican la conformación y, por tanto, la función de las proteínas. Otras metas son el saber cómo las proteínas individuales se unen a sustratos específicos y a otras moléculas, cómo median en la catálisis y transducen energía e información.

Habitualmente, el primer paso en estos estudios es la purificación de la proteína que nos interesa. Las proteínas se pueden separar en base a su solubilidad, tamaño, carga y capacidad de unión. Una vez que se ha purificado la proteína, se puede determinar su secuencia de aminoácidos. La secuenciación automática de péptidos y la aplicación de la metodología del DNA recombinante han aportado tal riqueza de datos de secuencias de aminoácidos que se han abierto nuevas perspectivas. Muchas secuencias proteicas, deducidas habitualmente de secuencias genómicas, se encuentran disponibles en grandes bases de datos. Si la secuencia de una proteína purificada está ya en una base de datos, se favorece en gran medida el trabajo del investigador. El investigador necesita determinar solamente una pequeña parte de la secuencia de la proteína para localizarla en la base de datos. Alternativamente, la proteína se podría identificar comparando su masa con la obtenida en la base de datos proteica. La espectroscopía de masas es una técnica muy eficaz para obtener la masa

Contenido

- 3.1 La purificación de las proteínas es un primer paso esencial para el conocimiento de su función
- 3.2 Las secuencias de aminoácidos se pueden determinar por la degradación de Edman automatizada
- 3.3 La inmunología proporciona técnicas importantes para la investigación en proteínas
- 3.4 Los péptidos se pueden sintetizar utilizando metodología en fase sólida automatizada
- 3.5 La espectrometría de masas proporciona herramientas poderosas para la caracterización e identificación de proteínas
- 3.6 La estructura tridimensional de las proteínas se puede determinar por cristalografía de rayos X y espectroscopía de NMR

de una proteína. Para entender el contexto fisiológico de una proteína, los anticuerpos son las sondas de elección para localizar las proteínas *in vivo* y medir sus cantidades. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales en grandes cantidades para reconocer proteínas específicas. Se pueden utilizar estos anticuerpos para identificar proteínas aisladas o en células y cuantificarlas. Es posible la síntesis química de péptidos y proteínas, que nos proporciona herramientas para la investigación y en algunos casos, proteínas muy puras que pueden usarse como fármacos. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, “*nuclear magnetic resonance*”) y la cristalografía de rayos X son las técnicas principales para determinar la estructura tridimensional de las proteínas, el determinante clave de su función.

La exploración de las proteínas por esta batería de técnicas físicas y químicas ha enriquecido enormemente nuestro conocimiento de las bases moleculares de la vida. Estas técnicas hacen posible el abordar algunas de las cuestiones más complejas de la biología en términos moleculares.

El proteoma es la representación funcional del genoma

La secuencia de bases completa del DNA del genoma de muchos organismos se está resolviendo. Por ejemplo, la lombriz intestinal *Caenorhabditis elegans* tiene un genoma con 97 millones de bases y aproximadamente 19 000 genes que codifican proteínas, mientras que la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* contiene 180 millones de bases y aproximadamente 14 000 genes. El genoma humano secuenciado completamente contiene 3000 millones de bases con unos 25 000 genes. Pero este conocimiento genómico es análogo a la lista de componentes de un coche: no explica cómo éstos trabajan juntos. Se ha acuñado una nueva palabra, el *proteoma*, para representar un contenido más complejo del nivel de información, el nivel de la información *funcional*, que abarca el tipo, funciones e interacciones de las proteínas que comprenden una unidad funcional.

El término proteoma se deriva de *proteínas expresadas por el genoma*. El genoma nos da una lista de los productos genéticos que *podrían* estar presentes, pero solamente una parte de estos productos genéticos se expresará realmente en un contexto biológico determinado. El proteoma nos dice lo que está presente funcionalmente, por ejemplo, qué proteínas interactúan para formar una vía transductora de señal o un conducto iónico en una membrana. El proteoma no es una característica fija de la célula. Más bien, ya que representa la expresión funcional de la información, varía con el tipo de célula, estado de desarrollo y las condiciones ambientales, como puede ser la presencia de hormonas. El proteoma es mucho mayor que el genoma debido a que casi todos los productos genéticos son proteínas que se pueden modificar de múltiples formas. Además, estas proteínas no existen aisladas; a menudo, interactúan entre ellas para formar complejos con propiedades funcionales específicas. A diferencia del genoma, el proteoma no es estático.

El conocimiento del proteoma se obtiene investigando, caracterizando y catalogando las proteínas. En algunos, pero no en todos los casos, el proceso comienza separando una proteína determinada del resto de las biomoléculas de la célula.

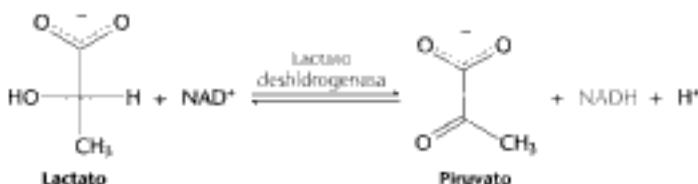
3.1 La purificación de las proteínas es un primer paso esencial para el conocimiento de su función

Un proverbio bioquímico es: “Nunca desperdices pensamientos puros en una proteína impura”. Desde las proteínas purificadas, podemos determinar secuencias de aminoácidos e investigar la función bioquímica de cada proteína. A partir de la secuencia de aminoácidos, se pueden construir mapas de relaciones en la evolución entre proteínas y diversos organismos (Capítulo 6). Mediante cristales obtenidos a partir de la proteína pura, es posible obtener datos de rayos X que nos proporcionarán una descripción de la estructura terciaria de las proteínas: la forma que determina la función.

El experimento: ¿cómo reconocemos a la proteína que estamos buscando?

La purificación debería proporcionarnos una muestra proteica que contuviera sólo un tipo de molécula: la proteína en la que el bioquímico estuviese interesado. Esta muestra proteica puede ser una fracción de sólo el 1% del material de partida, bien sea este material células en cultivo o un órgano propio de una planta o un animal. ¿Cómo puede un bioquímico aislar una proteína específica de una mezcla compleja de proteínas?

El bioquímico necesita una prueba, conocida como *ensayo*, para identificar alguna propiedad específica de la proteína. Un resultado positivo en el ensayo indica que la proteína está presente. Encontrar un ensayo eficaz es a menudo difícil; pero en tanto que el ensayo es más específico, más eficaz es la purificación. En enzimas, que son los catalizadores proteicos (Capítulo 8), el ensayo mide normalmente la *actividad enzimática*, es decir, la capacidad del enzima para inducir una reacción química determinada. A menudo, esta reacción se mide de forma indirecta. Consideremos el enzima lactato deshidrogenasa que cataliza la siguiente reacción en la síntesis de glucosa:



El dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH, p. 420) absorbe la luz a 340 nm, mientras que el dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD^+) no lo hace. Por ello, podemos seguir el progreso de la reacción observando cuánta luz absorbe la mezcla de reacción por unidad de tiempo, por ejemplo, 1 minuto después de añadir el enzima. Nuestro ensayo de actividad enzimática durante la purificación de la lactato deshidrogenasa consiste en medir, por lo tanto, el incremento en la absorbancia observada de la luz a 340 nm al cabo de 1 minuto.

Para tener claro como funciona nuestro esquema de purificación, necesitamos un dato adicional: la cantidad de proteína presente en la mezcla que se ensaya. Existen varios métodos rápidos y precisos para medir la concentración proteica. Con estos dos valores determinados experimentalmente (actividad enzimática y concentración de proteína) podemos calcular la *actividad específica*, la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína en la mezcla. En principio, la actividad específica crecerá conforme se produzca la purificación y la mezcla proteica ensayada esté formada en mayor medida por lactato deshidrogenasa. Sustancialmente, la cuestión asociada con la purificación es maximizar la actividad específica. En un enzima puro, la actividad específica tendrá un valor constante.

Para su purificación, las proteínas deben liberarse de la célula

Elegido el ensayo y escogida una fuente de proteína, debemos fraccionar la célula en sus componentes y precisar qué componente está enriquecido en la proteína que nos interesa. Estos esquemas de fraccionamiento se desarrollan por el método de ensayo-error, basándose en experiencias anteriores. En un primer paso, se forma un *homogenado* por ruptura de la membrana celular, fraccionándose la célula por centrifugación y dando lugar a un precipitado de material pesado en el fondo del tubo de centrifugadora y un sobrenadante más ligero encima (Figura 3.1). El sobrenadante se centrifuga de nuevo con una fuerza centrífuga mayor obteniendo un nuevo precipitado y otro sobrenadante. El procedimiento, llamado *centrifugación diferencial*,

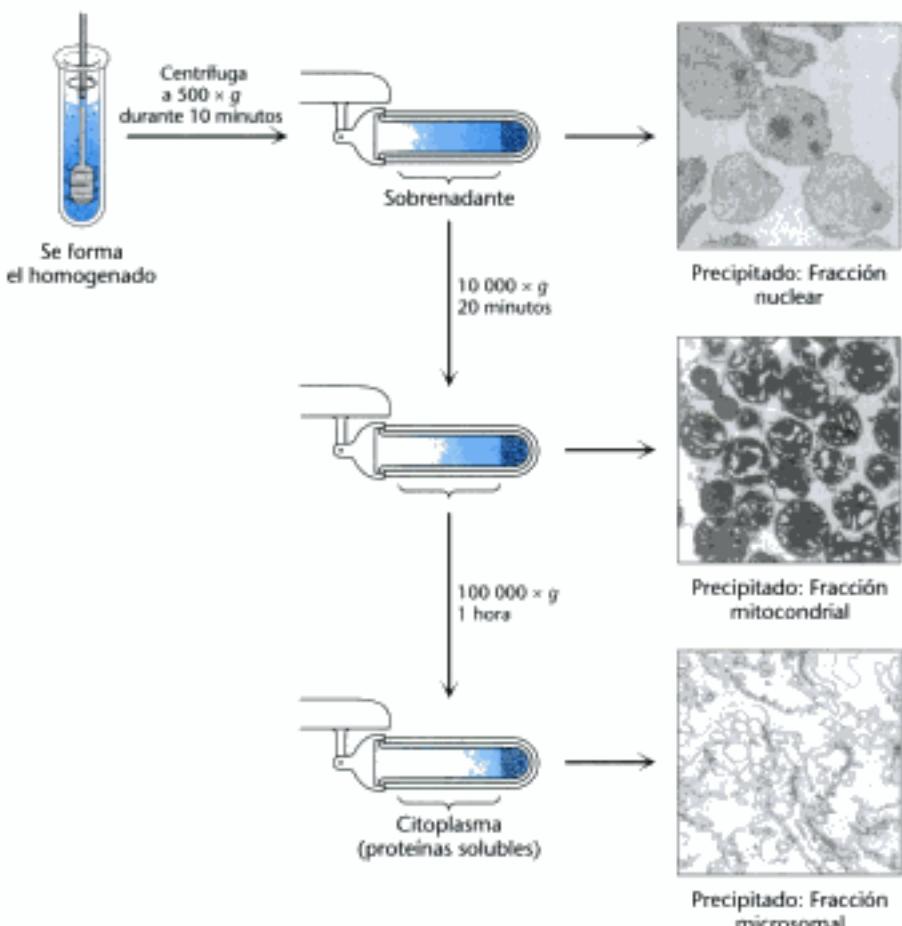


Figura 3.1 Centrifugación diferencial. Las células se rompen en un homogeneizador y la mezcla resultante, llamada homogenado, se centrifuga en varios pasos, incrementando la fuerza centrífuga. El material más denso formará un precipitado a una fuerza centrífuga menor que el material menos denso. Las fracciones aisladas se pueden usar en purificaciones posteriores. [Fotografías cortesía de Dr. S. Fleischer y Dr. B. Fleischer.]

produce varias fracciones de densidad decreciente, cada una de ellas consistente en varios cientos de proteínas distintas, que se ensayan posteriormente para obtener la actividad que se purifica. Normalmente, una fracción estará enriquecida en actividad, que será la fuente de material en la que se aplicarán técnicas de purificación más discriminatorias.

Las proteínas se pueden purificar de acuerdo con su solubilidad, tamaño, carga y afinidad

Se han purificado varios miles de proteínas en forma activa en base a características como *solubilidad, tamaño, carga y afinidad específica de unión*. El mecanismo habitual consiste en que la mezcla de proteínas se somete a diferentes separaciones, basada cada una de ellas en propiedades diferentes, para obtener la proteína pura. En cada paso de purificación, se ensaya la actividad de la proteína deseada y se determina la concentración proteica. Existe una batería importante de técnicas de purificación aplicables.

Precipitación salina. La mayoría de las proteínas son menos solubles a concentraciones elevadas de sal, un efecto llamado *precipitación salina*. Las concentraciones de sal en las que precipita una proteína varían de una proteína a otra. Por ejemplo, el sulfato amónico 0,8 M precipita el fibrinógeno, una proteína de la coagulación sanguínea, mientras que se necesita una concentración 2,4 M para precipitar la albúmina del suero. La precipitación salina además es útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas, incluyendo las fracciones activas obtenidas en otros pasos de la purificación. Para eliminar la sal, cuando sea necesario, se puede utilizar la dialisis.

Diálisis. Las proteínas se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la *diálisis* a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa (Figura 3.2). Las moléculas de dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana y aparecen en el dializado, fuera de la bolsa. Esta técnica es útil para retirar las sales u otras moléculas pequeñas, pero no discriminará de forma efectiva entre las proteínas.

Cromatografía de filtración en gel. Se pueden conseguir separaciones más discriminatorias, basadas en el tamaño, por medio de la técnica de *cromatografía de filtración en gel*, también conocida como chromatografía de exclusión molecular (Figura 3.3). La muestra se coloca en lo alto de una columna rellena de bolitas porosas compuestas por un polímero insoluble, pero altamente hidratado, como son el dextrano o la agarosa (carbohidratos) o la poliacrilamida. Sephadex, Sepharosa y Biogel son preparaciones comerciales de estas bolitas usadas normalmente, que tienen un tamaño de unos 100 µm (0.1 mm) de diámetro. Las moléculas pequeñas pueden entrar en estas bolitas, pero no las grandes. El resultado es que las moléculas pequeñas se distribuyen tanto en el interior de las bolitas como entre ellas, mientras que las moléculas grandes se localizan solamente en la disolución entre las bolitas. Así, las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de esta columna y aparecen antes porque tienen accesible un volumen de líquido más pequeño. Las moléculas que son de un tamaño intermedio y que pueden penetrar en las bolitas parcialmente fluirán de la columna en una posición intermedia, mientras que las moléculas pequeñas, que siguen un camino más largo y tortuoso, serán las últimas en salir.

Cromatografía de intercambio iónico. Las proteínas se pueden separar en base a su carga neta por *cromatografía de intercambio iónico*. Si una proteína tiene una carga neta positiva a pH 7, se unirá normalmente a una columna de bolitas que



Figura 3.2 **Diálisis.** Las moléculas de proteína (en rojo) se quedan dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas pequeñas (en azul) difunden al medio que las rodea.

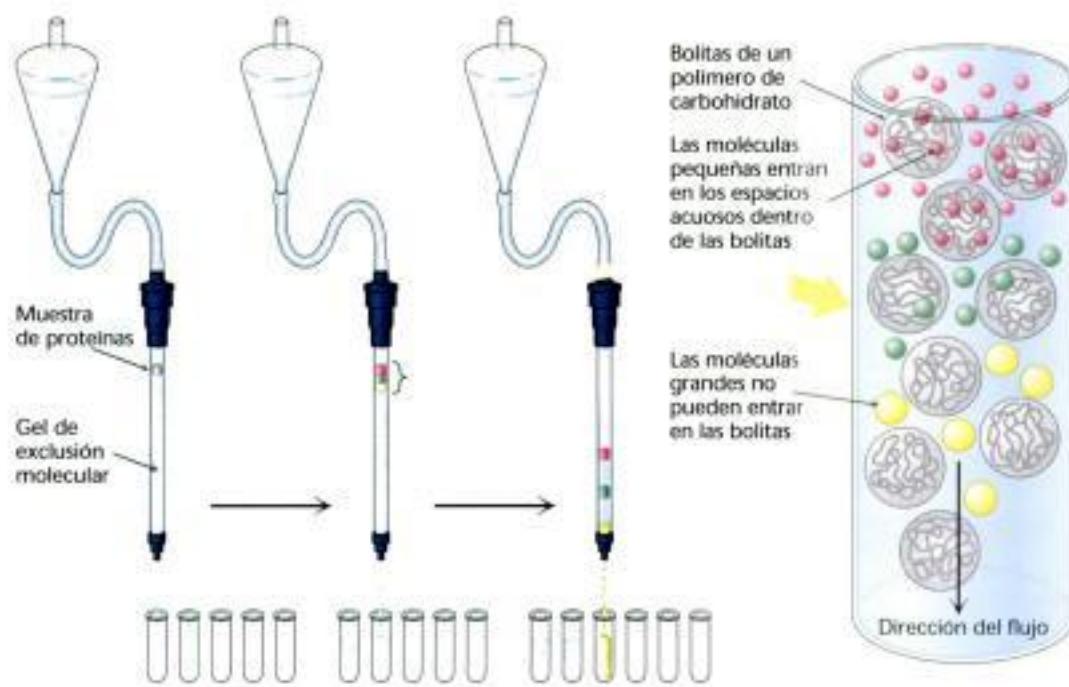


Figura 3.3 **Cromatografía de filtración en gel.** Una mezcla de proteínas en un volumen pequeño se coloca en una columna rellena con bolitas porosas. Como las proteínas grandes no pueden penetrar en el volumen interno de las bolitas, se eluyen antes que las pequeñas.

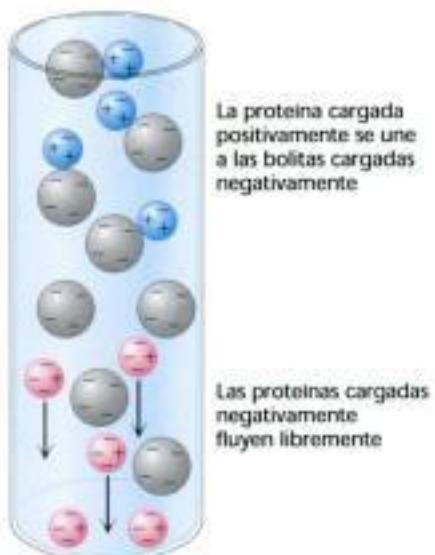


Figura 3.4 Cromatografía de intercambio iónico. Esta técnica separa las proteínas principalmente por sus cargas netas.

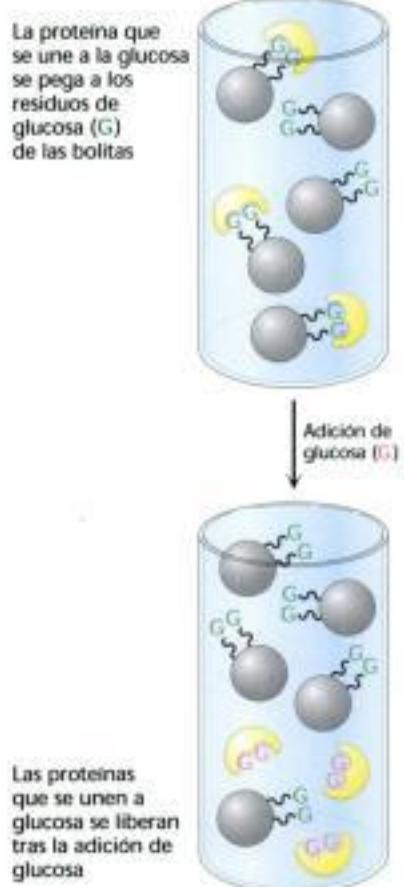


Figura 3.5 Cromatografía de afinidad. Cromatografía de afinidad de concanavalina A (en amarillo) en un soporte sólido que contiene residuos de glucosa (G) unidos de forma covalente.

contengan grupos carboxilato, mientras que una proteína con carga neta negativa no lo hará (Figura 3.4). Una proteína cargada positivamente unida a esta columna puede eluirse (liberarse) incrementando la concentración de cloruro sódico u otra sal en el amortiguador de elución porque los iones de sodio compiten con los grupos de la proteína cargados positivamente para unirse a la columna. Las proteínas con una densidad baja de cargas positivas netas tenderán a aparecer primero, seguidas por las que tienen una densidad de carga mayor. Las proteínas cargadas positivamente (proteínas catiónicas) se pueden separar en columnas de carboximetil-celulosa (CM-celulosa) cargadas negativamente. A su vez, las proteínas cargadas negativamente (proteínas aniónicas) se pueden separar por cromatografía en columnas de dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) cargadas positivamente.



Cromatografía de afinidad. La *cromatografía de afinidad* es otro procedimiento poderoso y normalmente aplicable para purificar proteínas. Esta técnica se aprovecha de la alta afinidad de muchas proteínas por grupos químicos específicos. Por ejemplo, la proteína vegetal concanavalina A se puede purificar pasando un extracto crudo a través de una columna de bolitas que contienen residuos de glucosa unidos covalentemente. La concanavalina A se une a esta columna debido a su afinidad por la glucosa, que no tienen otras proteínas. La concanavalina A unida se libera posteriormente de la columna si se añade una disolución concentrada de glucosa. La glucosa en disolución desplaza a la concanavalina A de los centros de unión de los residuos de glucosa fijados en la columna (Figura 3.5). La cromatografía de afinidad es un potente sistema para aislar factores de transcripción, las proteínas que regulan la expresión genética mediante la unión a secuencias de DNA específicas (Capítulos 29 y 31). Una mezcla proteica se eluye a través de una columna que contiene secuencias específicas de DNA unidas a una matriz; las proteínas con mayor afinidad por la secuencia se unirán y quedarán retenidas. En este momento, el factor de transcripción se libera lavando con una disolución que contiene una alta concentración de sal.

En general, la cromatografía de afinidad se puede utilizar de modo efectivo en el aislamiento de una proteína que reconoce a determinados grupos X por (1) la unión covalente de X o un derivado suyo a una columna, (2) adición de una mezcla de proteínas a esta columna, que luego se lava con amortiguador para eliminar las proteínas no unidas, y (3) elución de la proteína deseada añadiendo una concentración elevada de una forma soluble de X o cambio de las condiciones para alterar la afinidad de la unión. La cromatografía de afinidad es más efectiva cuando la interacción de la proteína y la molécula que se usa como atrayente es muy específica.

El proceso estándar de uso de la cromatografía de afinidad se puede invertir para aislar proteínas expresadas de clones genéticos (Sección 5.2). En este caso, el gen que codifica la proteína se modifica. Se codifican aminoácidos extras en el gen, que cuando se expresa sirven como etiquetas de afinidad que se pueden atrapar fácilmente. Por ejemplo, una serie de residuos de histidina (conocidos como *etiqueta His*) se pueden añadir al extremo amino o carboxilo terminal de una proteína expresada. La proteína etiquetada se pasa a través de una columna de bolitas que contienen unido de forma covalente níquel (II) u otros iones metálicos que se unen a la proteína deseada mientras que las otras proteínas atraviesan la columna. Posteriormente, se pueden eluir las proteínas de la columna añadiendo imidazol u otros compuestos químicos que se unen a los iones metálicos y desplazan a la proteína.

Cromatografía líquida de alta presión. La técnica conocida como *cromatografía líquida de alta presión* (HPLC), es una versión mejorada de las técnicas de columna que hemos expuesto hasta ahora. Los materiales propios de las columnas están mucho más finamente divididos y, como consecuencia, hay más centros de interacción y, por lo tanto, mayor poder de resolución. Dado que la columna se construye de material más fino, se debe aplicar presión para obtener las velocidades de flujo adecuadas. El resultado neto es una elevada resolución y una separación rápida (Figura 3.6).

Las proteínas se pueden separar e identificar por electroforesis en gel

¿Cómo podemos afirmar si un protocolo de purificación es útil? Una forma es asegurar que la actividad específica crece con cada paso de purificación. Otra es visualizar esta eficacia mostrando las proteínas presentes en cada paso. La técnica de electroforesis hace posible este último método.

Electroforesis en gel. Una molécula con una carga eléctrica neta se desplazará en un campo eléctrico. Este fenómeno, conocido como *electroforesis*, ofrece un procedimiento potente para separar proteínas y otras macromoléculas, como DNA y RNA. La velocidad de migración (v) de una proteína (o cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza de ese campo eléctrico (E), la carga neta de la proteína (z), y el coeficiente de fricción (f).

$$v = Ez/f \quad (1)$$

La fuerza eléctrica Ez que arrastra a la molécula cargada hacia el electrodo de carga opuesta, sufre la resistencia fv , debida a la fricción viscosa entre la molécula que se desplaza y el medio en el que lo hace. El coeficiente de fricción f depende tanto de la masa como de la forma de la molécula que migra como de la viscosidad del medio (η). Para una esfera de radio r ,

$$f = 6\pi\eta r \quad (2)$$

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel sirve como un tamiz molecular que potencia la separación (Figura 3.7). Las moléculas más pequeñas que los poros del gel

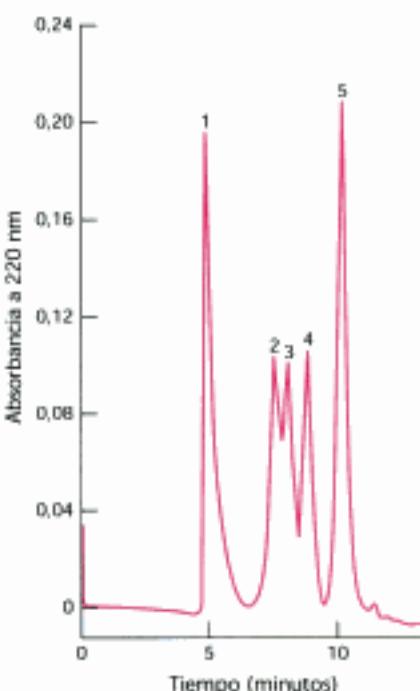


Figura 3.6 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La filtración en gel por HPLC define claramente las proteínas individuales debido a su gran poder de resolución: (1) tiroglobulina (669 kd), (2) catalasa (232 kd), (3) albúmina bovina sérica (67 kd), (4) ovoalbúmina (43 kd) y (5) ribonucleasa (13,4 kd). [Según K. J. Wilson y T. D. Schlabach. En *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, suppl. 41, F. M. Ausbel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl, eds. (Wiley, 1998), p. 10.14.1.]

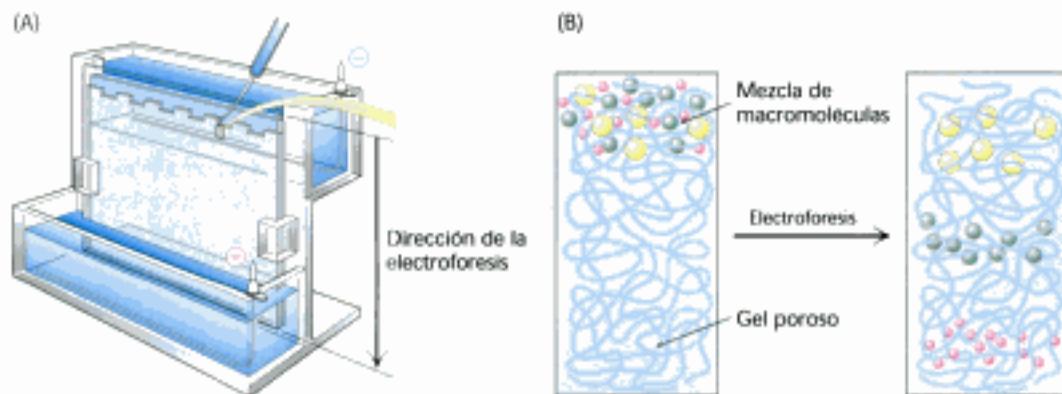


Figura 3.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida. (A) Aparato de electroforesis en gel. Normalmente, se separan varias muestras por electroforesis en un gel plano de poliacrilamida. Se usa una micropipeta para colocar las disoluciones de las proteínas en los pozos del gel. Se coloca una tapa sobre la cámara del gel y se aplica un voltaje. Los complejos proteína-SDS (dodecilsulfato sódico) cargados negativamente emigran en dirección al ánodo, en la parte inferior del gel. (B) La acción de tamizado de un gel poroso de poliacrilamida separa las proteínas de acuerdo con su tamaño, moviéndose más rápido las más pequeñas.

se desplazan fácilmente a su través, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. La dirección del flujo es vertical descendente. La electroforesis se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical, de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida, formados por la polymerización de la acrilamida entrecruzada por metilenbisacrilamida, son el soporte preferido para la electroforesis porque son inertes químicamente y se forman con facilidad (Figura 3.8). La electroforesis es lo opuesto a la filtración en gel en que todas las moléculas, independientemente de su tamaño, están impelidas a moverse a través de la misma matriz.

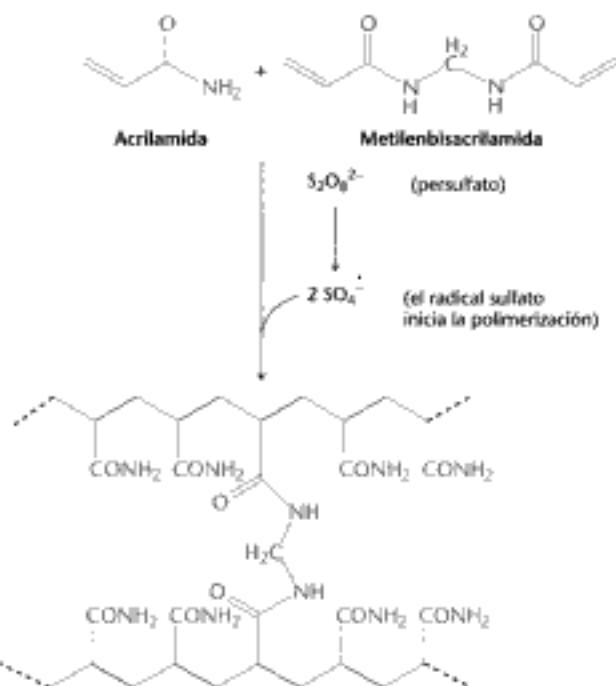
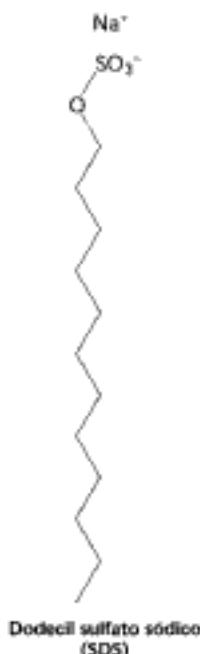


Figura 3.8 Formación de un gel de poliacrilamida. Se forma una malla tridimensional por copolymerización del monómero activado (en azul) y el enlace (en rojo).



Las proteínas se pueden separar de acuerdo con sus masas moleculares, utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato sódico (SDS), un detergente aniónico que rompe casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade mercaptoetanol (2-tioetanol) o ditiotreitol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones del SDS se unen a la cadena principal a razón de un anión SDS por cada dos residuos de aminoácido. Este complejo de SDS con una proteína desnaturalizada tiene una gran carga negativa, que es aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. La carga negativa conseguida por unión de SDS es normalmente mucho mayor que la carga de la proteína nativa, por lo que ésta se considera no significativa. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis. Despues de la electroforesis, las proteínas se pueden visualizar en el gel tñiéndolas con plata o con un colorante como el azul de Coomassie, que revelan una serie de bandas (Figura 3.9). Los marcajes radiactivos, si se han incorporado a la proteína, se pueden detectar mediante una hoja de película de rayos X colocada sobre el gel, un procedimiento conocido como *autorradiografía*.

Las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes se quedan arriba, junto al lugar de aplicación de la mezcla. El desplazamiento en estas condiciones de la mayor parte de los polipéptidos es linealmente



Figura 3.9 Tinción de las proteínas tras la electroforesis. Las proteínas sometidas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida se pueden visualizar tñéndolas con azul de Coomassie. [Cortesía de Kodak Scientific Imaging Systems.]

proporcional al logaritmo de su masa (Figura 3.10). Sin embargo, algunas proteínas ricas en carbohidratos y las proteínas de membrana no cumplen esta relación empírica. La electroforesis sobre gel de poliacrilamida en SDS (conocida generalmente como SDS-PAGE), es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución. Cuando se tñe con azul de Coomassie, basta $0.1\text{ }\mu\text{g}$ de proteína ($\sim 2\text{ pmol}$) de una proteína para dar una banda diferenciada, y con la tinción de plata se puede distinguir incluso una cantidad menor ($\sim 0.02\text{ }\mu\text{g}$). Se puede distinguir normalmente entre proteínas que difieren entre sí aproximadamente en un 2% de sus masa (por ejemplo, entre 50 y 51 kd, lo que corresponde a una diferencia de unos 10 residuos de aminoácidos).

Podemos examinar la eficacia de un protocolo de purificación analizando una parte de cada fracción por electroforesis. Las fracciones iniciales mostrarán desde docenas hasta centenares de proteínas. Conforme progrese la purificación, el número de bandas disminuirá y la importancia de una de las bandas aumentará. Esta banda es la que corresponderá a la proteína de interés.

Isoelectroenfoque. Las proteínas también pueden separarse electroforéticamente en base a sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos. El *punto isoelectrónico* (*pI*) de una proteína es el pH en el que su carga neta es cero. En este pH, su movilidad electroforética es cero porque en la ecuación 1, z es igual a cero. Por ejemplo, el *pI* del citocromo *c*, una proteína de transporte electrónico muy básica, es 10,6, mientras que el de la albúmina de suero, una proteína sanguínea ácida, es 4,8. Supongamos que una mezcla de proteínas se somete a electroforesis en gradiente de pH en un gel y en ausencia de SDS. Cada proteína se desplazará hasta que alcance una posición en el gel en la que el pH es igual al *pI* de la proteína. Este método para separar proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico se conoce como isoelectroenfoque. El gradiente de pH en el gel se consigue sometiendo a electroforesis previa una mezcla de *polianfolitos* (polímeros pequeños con múltiple carga) con diferentes valores de *pI*. El isoelectroenfoque permite distinguir proteínas que difieren en sus *pI* tan poco como 0,01, lo que significa que se pueden separar proteínas que difieran en una sola carga neta (Figura 3.11).

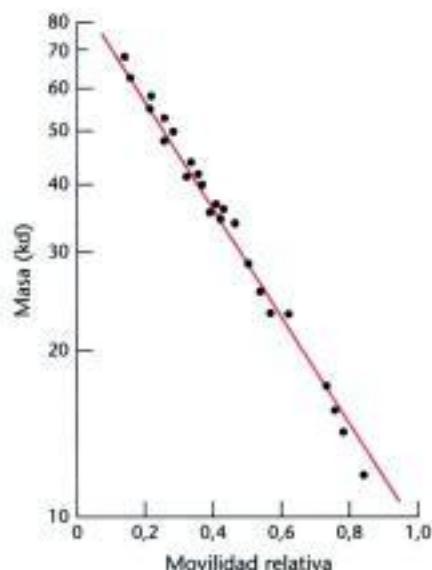


Figura 3.10 La electroforesis puede determinar las masas moleculares. La movilidad electroforética de muchas proteínas en geles de SDS-poliacrilamida es inversamente proporcional al logaritmo de su masa. [Según K. Weber y M. Osborn, *The proteins*, vol.1, 3rd ed. (Academic Press, 1975), p. 179.]

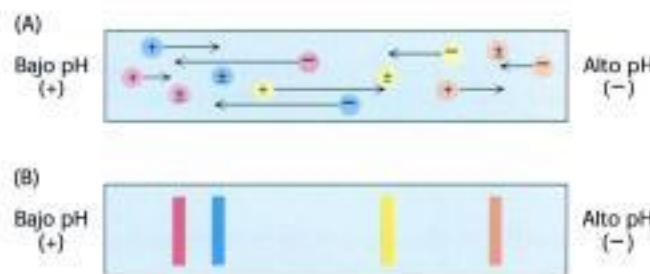


Figura 3.11 El principio del isoelectroenfoque. Antes de cargar la muestra, se establece un gradiente de pH en un gel. (A) Se carga la muestra y se aplica el voltaje. Las proteínas emigrarán hacia su pH isoelectrónico, el lugar en el que no tienen carga neta. (B) Las proteínas forman bandas que se pueden separar y usar en experimentos futuros.

Electroforesis bidimensional. El isoelectroenfoque se puede combinar con SDS-PAGE para obtener separaciones con una resolución muy elevada. Una muestra única se somete primero a isoelectroenfoque. Este gel de calle única se coloca horizontalmente en la parte superior de un gel de SDS-poliacrilamida. Así, las proteínas quedan distribuidas en la parte superior del gel de acuerdo con su movilidad durante el electroenfoque. A continuación se someten de nuevo a electroforesis en dirección perpendicular (verticalmente) para obtener una distribución bidimensional de las manchas. En este gel, las proteínas se han separado en dirección horizontal de acuerdo con su punto isoeléctrico y en dirección vertical según sus masas moleculares. Es sorprendente que si se aplica este sistema bidimensional a la bacteria *Escherichia coli* se pueden resolver por electroforesis bidimensional más de mil proteínas diferentes en un único experimento (Figura 3.12).

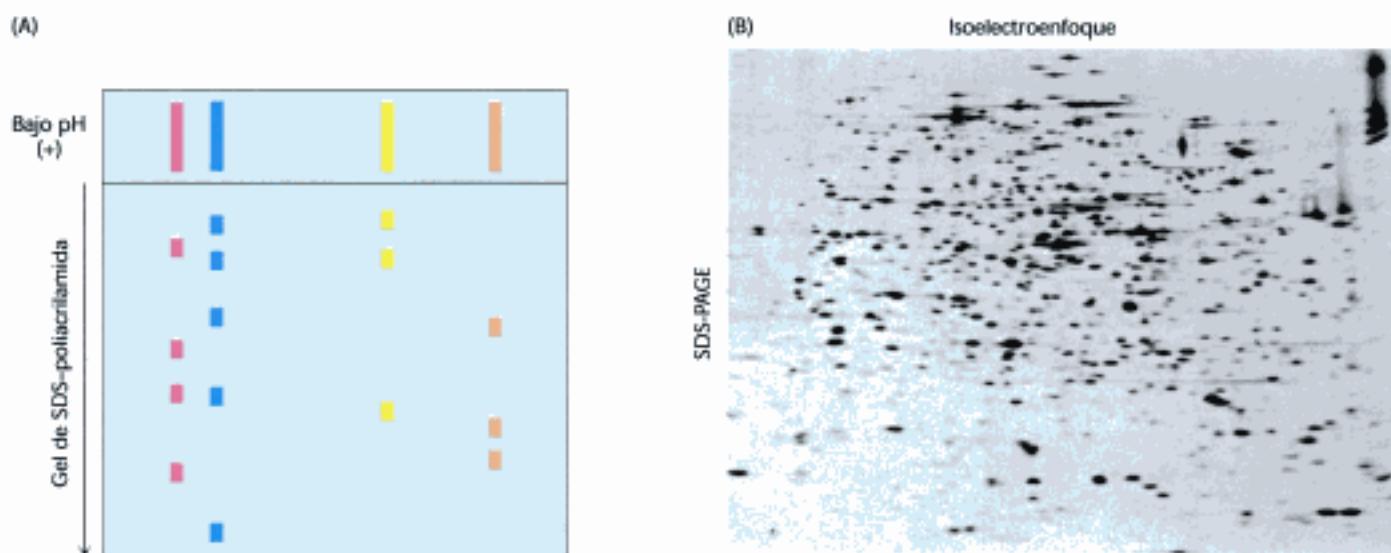


Figura 3.12 Electroforesis bidimensional en gel. (A) Una muestra de proteína se fracciona inicialmente en una dimensión por isoelectroenfoque como se ha descrito en la Figura 3.11. El gel de isoelectroenfoque se une entonces a un gel de SDS-poliacrilamida y la electroforesis se realiza en una segunda dimensión, perpendicular a la separación original. Las proteínas con el mismo pI se separan ahora en base a su masa. (B) Las proteínas de *E. coli* se separaron por electroforesis bidimensional en gel, resolviendo más de mil proteínas diferentes. Las proteínas se separaron según sus puntos isoeléctricos en la dirección horizontal y según sus masas aparentes en la dirección vertical. [(B) Cortesía del Dr. Patrick H. O'Farrell.]

Las proteínas aisladas de células en diferentes condiciones fisiológicas se pueden someter a electroforesis bidimensional. Así, en determinadas proteínas se pueden ver aumentos o descensos en su concentración como respuesta a un estado fisiológico. ¿Cómo podemos afirmar qué proteína muestra estas respuestas? Aunque muchas de las proteínas que se observan en los geles bidimensionales no están identificadas, actualmente es posible identificarlas acoplando la electroforesis en gel bidimensional con técnicas de espectrometría de masas. Estas técnicas tan poderosas se tratarán más adelante (Sección 3.5).

El protocolo de purificación de proteínas se puede evaluar cuantitativamente

Para determinar el éxito de un protocolo de purificación de proteínas, se puede controlar en cada paso el procedimiento midiendo la actividad específica y realizando un análisis de SDS-PAGE. Consideremos los resultados de la purificación de una

TABLA 3.1 Resolución cuantitativa de un protocolo de purificación para una proteína ficticia

Paso	Proteína total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (unidades mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Nivel de purificación
Homogenización	15 000	150 000	10	100	1
Fraccionamiento salino	4600	138 000	30	92	3
Cromatografía de intercambio iónico	1278	115 500	90	77	9
Cromatografía de exclusión molecular	68,8	75 000	1100	50	110
Cromatografía de afinidad	1,75	52 500	30 000	35	3000

proteína imaginaria, resumidos en la Tabla 3.1 y la Figura 3.13. En cada paso, se miden los siguientes parámetros:

Proteína total. La cantidad de proteína presente en una fracción se obtiene determinando la concentración de proteína en una alfaguota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de la fracción.

Actividad total. La actividad enzimática de la fracción se obtiene midiendo la actividad enzimática en una alfaguota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de la fracción.

Actividad específica. Este parámetro se obtiene dividiendo la actividad total por la proteína total.

Rendimiento. Este parámetro es una medida de la actividad existente después de cada paso de purificación expresada como porcentaje de la actividad del extracto crudo. La actividad del extracto inicial se toma como el 100%.

Grado de purificación. Este parámetro mide el incremento en pureza y se obtiene dividiendo la actividad específica, calculada después de cada paso de purificación, por la actividad específica del extracto inicial.

Como se ve en la Tabla 3.1, el primer paso de purificación, el fraccionamiento salino, produce un incremento en pureza de solo tres veces, pero recuperamos casi toda la proteína objeto de purificación en el extracto original, dado que el rendimiento es del 92%. Tras la dialisis para reducir la alta concentración de sal sobrante del fraccionamiento salino, la fracción se pasa a través de una columna de intercambio iónico. La purificación se incrementa ahora 9 veces comparada con el extracto original, mientras que el rendimiento original cae hasta el 77%. La chromatografía de exclusión molecular lleva el nivel de purificación hasta 110 veces, pero el rendimiento es ahora del 50%. El paso final es la chromatografía de afinidad usando un ligando específico para el enzima objetivo. Este paso, el más potente de estos procedimientos de purificación, consigue un nivel de purificación de 3000 veces, mientras que el rendimiento cae al 35%. El SDS-PAGE de la Figura 3.13 demuestra que, si cargamos una cantidad constante de proteína en cada calle, después de cada paso, el número de bandas disminuye en proporción al nivel de purificación, y la cantidad de la proteína de interés incrementa en relación al total de la proteína presente.

Un buen esquema de purificación tiene en cuenta tanto los niveles de purificación como el rendimiento. Un alto grado de purificación y un bajo rendimiento proporcionan poca proteína con la que experimentar. Un alto rendimiento con una baja purificación deja muchos contaminantes (proteínas diferentes de la de interés) en la fracción y complica la interpretación de los experimentos.

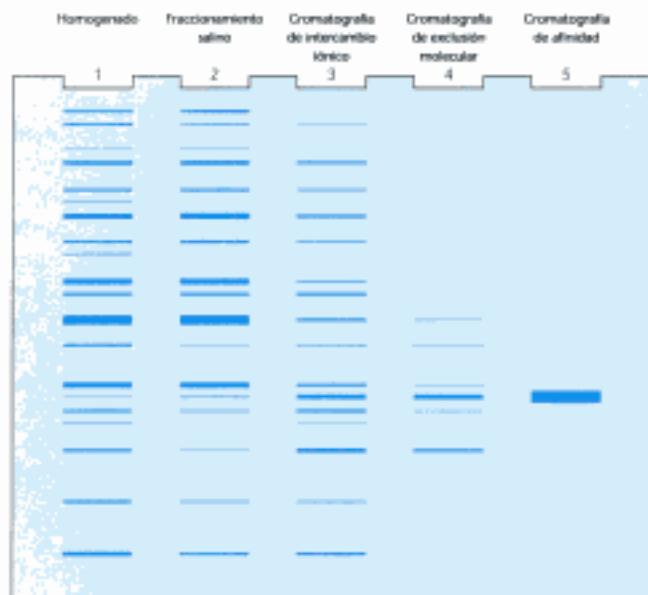


Figura 3.13 Análisis electroforético de una purificación proteica. El protocolo de purificación de la Tabla 4.1 se analizó por SDS-PAGE. Cada calle contenía 50 µg de muestra. La eficacia de la purificación se puede visualizar conforme la banda de la proteína de interés se hace más prominente en comparación con las otras bandas.

La ultracentrifugación es valiosa para separar las biomoléculas y determinar sus masas moleculares

Hemos visto ya que la centrifugación es un método poderoso y en general eficaz para separar una mezcla compleja de componentes celulares, pero también es útil para separar y analizar las propias biomoléculas. Con esta técnica, podemos determinar parámetros tales como la masa y la densidad, conocer algo sobre la forma de la molécula e investigar las interacciones entre moléculas. Para deducir estas propiedades a partir de los datos de centrifugación, necesitamos una descripción matemática de cómo se comporta una partícula en una fuerza centrífuga.

Una partícula se desplazará en un medio líquido cuando se someta a una fuerza centrífuga. Un medio conveniente para valorar numéricamente la velocidad de movimiento es calcular el coeficiente de sedimentación, s , de una partícula utilizando la siguiente ecuación:

$$s = m(1 - \bar{v}p)/f$$

donde m es la masa de la partícula, \bar{v} es el volumen específico parcial (el recíproco de la densidad de la partícula), p es la densidad del medio y f es el coeficiente de fricción (una medida de la forma de la partícula). El término $(1 - \bar{v}p)$ es la fuerza de flotación ejercida por el medio líquido.

Los coeficientes de sedimentación se expresan normalmente en *unidades Svedberg* (S), equivalentes a 10^{-13} s. Cuanto menor sea el valor de S , la molécula se moverá más lentamente por la fuerza centrífuga. En la Tabla 3.2 y en la Figura 3.14 se mencionan los valores de S para una serie de biomoléculas y componentes celulares.

TABLA 3.2 Valores de S y pesos moleculares de proteínas tipo

Proteína	Valor de S (unidades Svedberg)	Peso molecular
Inhibidor de la tripsina pancreática	1	6520
Citocromo c	1,83	12 310
Ribonucleasa A	1,78	13 690
Mioglobina	1,97	17 800
Tripsina	2,5	23 200
Anhidrasa carbónica	3,23	28 800
Concanavalina A	3,8	51 260
Malato deshidrogenasa	5,76	74 900
Lactato deshidrogenasa	7,54	146 200

Tomado de T. Creighton, Proteins, 2^a edición (W. H. Freeman and Company, 1993), Tabla 7.1

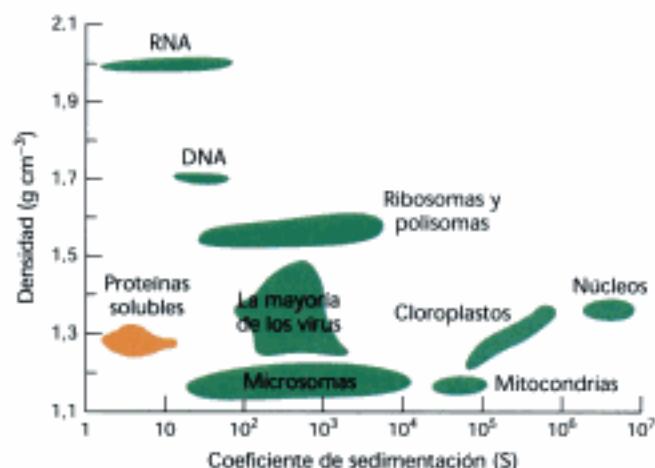


Figura 3.14 Densidad y coeficiente de sedimentación de los componentes celulares. [Tomado de L. J. Kleinsmith y V. M. Kish, Principles of Cell and Molecular Biology, 2^a ed (Harper Collins, 1995), p. 138.]

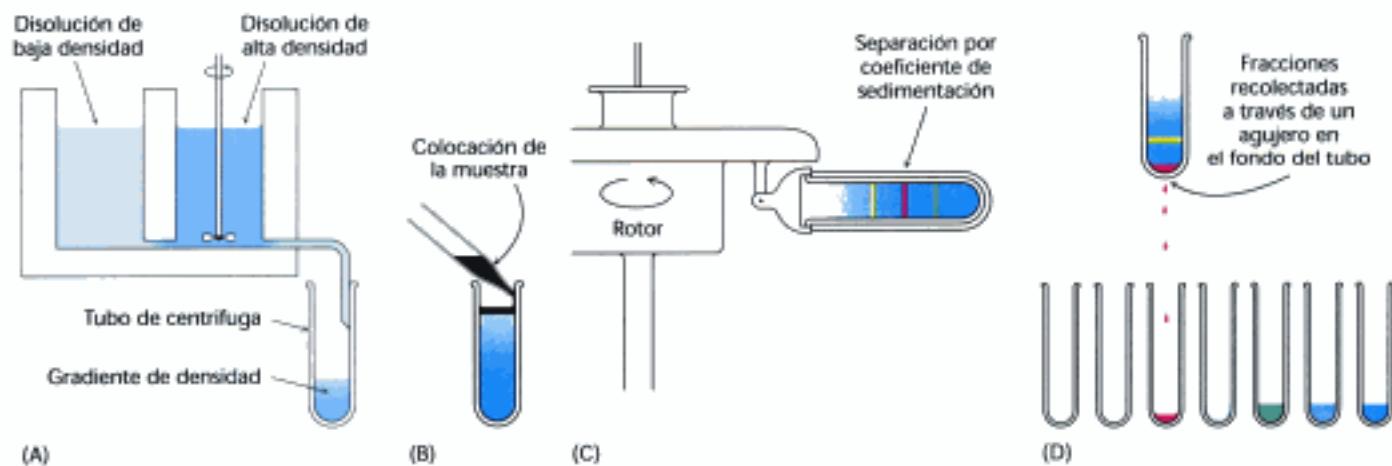
De la ecuación precedente se pueden extraer una serie de conclusiones importantes:

1. La velocidad de sedimentación de una partícula depende en parte de su masa. Una partícula de mayor masa sedimenta más rápidamente que otra de masa menor que tenga la misma forma y densidad.
2. La forma, influye también en la velocidad de sedimentación porque afecta a la resistencia debida a la viscosidad. El coeficiente de fricción f de una partícula compacta es menor que el de una partícula extendida de la misma masa. Por lo tanto, las partículas alargadas sedimentan más lentamente que las esféricas de la misma masa.
3. Una partícula densa se mueve más rápidamente que una de menor densidad porque la fuerza de flotación contraria ($1 - \bar{\nu}_p$) es menor para la partícula menos densa.
4. La velocidad de sedimentación también depende de la densidad de la disolución (p). Las partículas se hunden cuando $\bar{\nu}_p < 1$, flotan cuando $\bar{\nu}_p > 1$, y no se desplazan cuando $\bar{\nu}_p = 1$.

Se puede usar una técnica que se conoce como *zonal, en bandas*, o más comúnmente centrifugación en *gradiente* para separar proteínas con diferentes coeficientes de sedimentación. El primer paso es formar un gradiente de densidad en un tubo de centrífuga. Proporciones diferentes de una disolución de baja densidad (tal como sacarosa al 5%) y otra de alta densidad (tal como sacarosa al 20%) se mezclan para crear un gradiente lineal de concentraciones de sacarosa que van desde el 20% en el fondo del tubo hasta el 5% en la parte superior (Figura 3.15). El papel del gradiente es evitar un flujo de convección. La mezcla con la proteína a separar se coloca en un pequeño volumen en la parte superior del gradiente de densidad. Cuando el rotor gira, las proteínas se mueven a través del gradiente y se separan de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación. El tiempo y la velocidad de la centrifugación se determinan empíricamente. Las bandas separadas, o zonas, de la proteína se pueden recolectar perforando el fondo del tubo y recogiendo las gotas. Las gotas se pueden ensayar para ver el contenido en proteínas y la actividad catalítica u otras propiedades funcionales. Esta técnica de velocidad de sedimentación separa fácilmente proteínas que difieren en coeficientes de sedimentación por un factor de dos o bien mayor.

La masa de una proteína (peso molecular) se puede determinar directamente por *equilibrio de sedimentación*, donde una muestra se centrifuga a velocidades relativamente bajas en las que la sedimentación está equilibrada por la difusión. La técnica de equilibrio de sedimentación para determinar la masa molecular es muy precisa y se puede aplicar en condiciones no-desnaturalizantes en las que la estructura cuaternaria de las proteínas multiméricas se mantiene. Por el contrario, la electroforesis

Figura 3.15 Centrifugación zonal. Las etapas son (A) formación de un gradiente de densidad, (B) colocación de la muestra encima del gradiente, (C) colocación del tubo en un rotor oscilante y su centrifugación y (D) recolección de las muestras. [Tomado de D. Freifelder, *Physical Biochemistry*, 2^a ed. (W. H. Freeman and Company, 1982), p. 397.]



con SDS-gel de poliacrilamida (Sección 4.1.4) nos da una estimación del peso molecular de las cadenas polipeptídicas en condiciones desnaturalizantes. Nótese que si conocemos la masa de los componentes disociados de una proteína multimérica, determinados por análisis de SDS-poliacrilamida y la masa de la proteína multimérica intacta, determinada por análisis de equilibrio de sedimentación, se puede determinar cuántas copias de cada cadena polipeptídica están presentes en la proteína multimérica.

3.2 Las secuencias de aminoácidos se pueden determinar por la degradación de Edman automatizada

Habiendo purificado la proteína de interés y determinado su masa, el siguiente análisis a realizar suele ser normalmente el establecer su secuencia de aminoácidos, o estructura primaria. Examinemos primero cómo se puede secuenciar un péptido simple, tal como

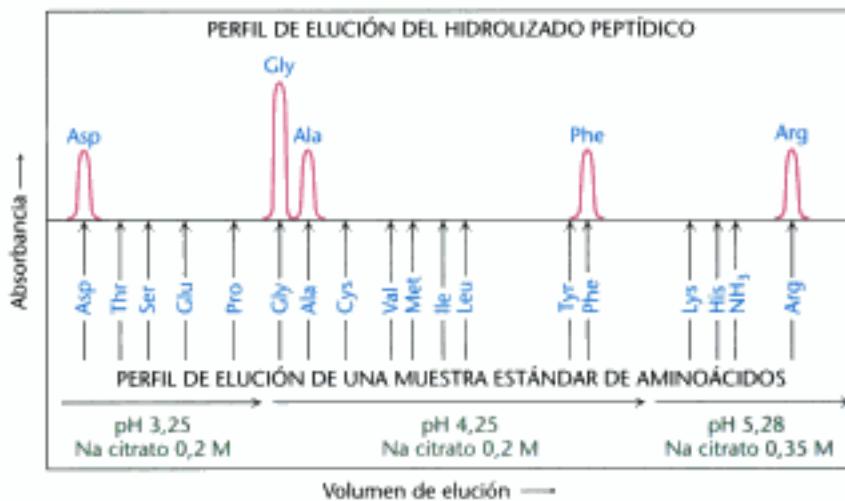


El primer paso sería determinar la *composición de aminoácidos* del péptido. El péptido se debe hidrolizar en sus aminoácidos constituyentes calentándolo en HCl 6 M a 110 °C, durante 24 horas. Los aminoácidos del hidrolizado se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico. La identidad de los aminoácidos se manifiesta por su volumen de elución, que es el volumen de amortiguador utilizado para eluir el aminoácido de la columna (Figura 3.16), y se cuantifica por su reacción con *ninhidrina*. Los aminoácidos tratados con ninhidrina dan un color azul intenso, excepto la prolina, que da un color amarillo porque contiene un grupo amino secundario. La concentración de un aminoácido en disolución, tras su calentamiento con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia óptica de la disolución. Esta técnica puede detectar un microgramo (10 nmol) de un aminoácido, que es aproximadamente la cantidad presente en una huella dactilar. Se puede detectar tan poco como un nanogramo (10 pmol) de un aminoácido sustituyendo la ninhidrina con *fluororescamina*, que reacciona con el grupo α -amino para formar un producto altamente fluorescente (Figura 3.17). Una comparación de los modelos chromatográficos de hidrolizado de nuestra muestra con una mezcla estándar de aminoácidos nos demostraría que la composición en aminoácidos del péptido es



El paréntesis y las comas indican que es la composición en aminoácidos del péptido, no su secuencia.

Figura 3.16 Determinación de la composición de aminoácidos. Los diferentes aminoácidos de un hidrolizado peptídico se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico sobre una resina de poliestireno sulfonado (como la Dowex-50). Los amortiguadores (en este caso citrato sódico) con pH incrementado se usan para eluir los aminoácidos de la columna. La cantidad de cada aminoácido presente se determina de su absorbancia. El aspartato, que tiene una cadena lateral ácida, es el primero en aparecer, mientras que la arginina, que tiene una cadena lateral básica, es el último. Se obtiene que el péptido original está compuesto de un aspartato, una alanina, una fenilalanina, una arginina y dos residuos de glicina.



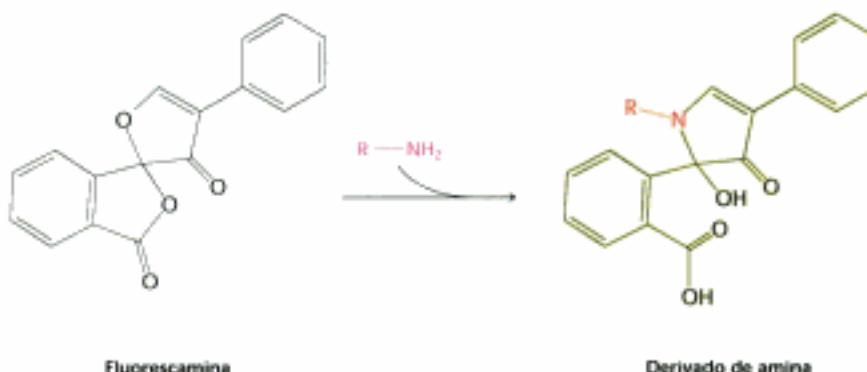
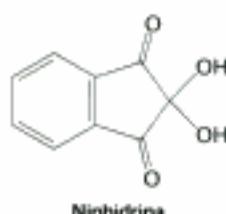


Figura 3.17 Derivados fluorescentes de los aminoácidos. La fluorescamina reacciona con el grupo α -amino de un aminoácido para dar un derivado fluorescente.

El siguiente paso es identificar el aminoácido N-terminal. Pehr Edman diseñó un método para marcar y separar el amino terminal del péptido sin perturbar los enlaces peptídicos entre los otros residuos de aminoácidos. La *degradación de Edman* separa secuencialmente del extremo amino terminal un residuo tras otro (Figura 3.18). El *fenilisotiocianato* reacciona con el grupo amino terminal no cargado del péptido para formar un derivado de feniltiocarbamato. Posteriormente, bajo condiciones ácidas suaves, se libera un derivado cíclico del aminoácido terminal, lo que deja un péptido intacto acortado en un aminoácido. El compuesto cíclico es un aminoácido feniltiohidantoína (PTH-aminoácido), que se puede identificar por procedimientos chromatográficos. La técnica de Edman se puede repetir en el péptido acortado, dando otro PTH-aminoácido, que de nuevo se puede identificar por cromatografía. Tres



DEGRADACIÓN DE EDMAN

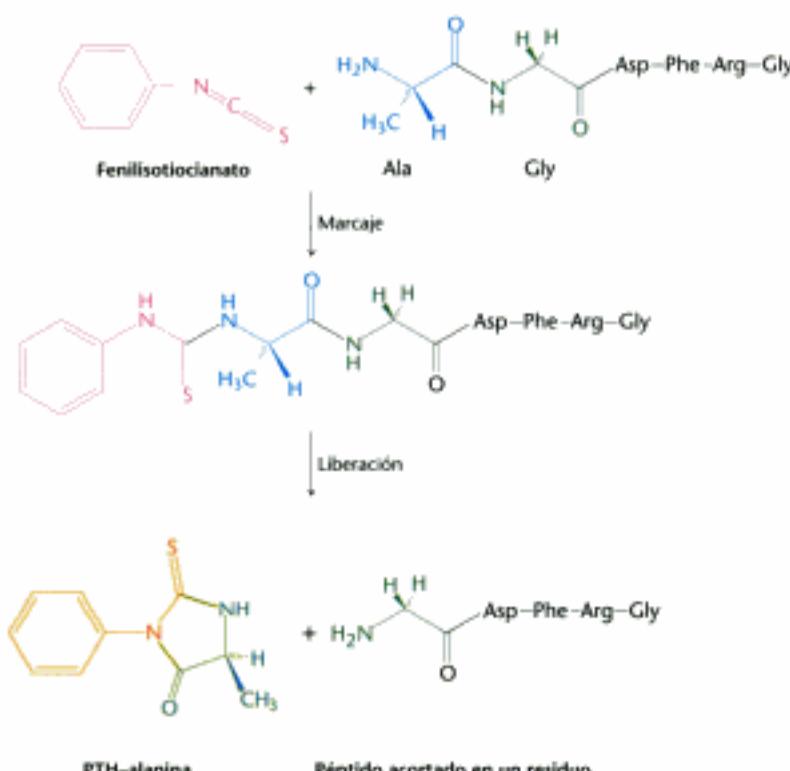
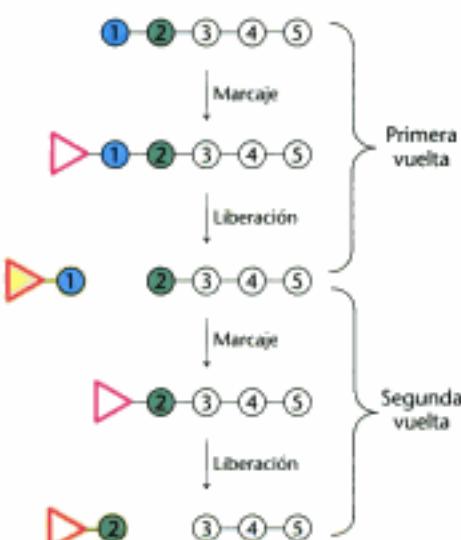


Figura 3.18 La degradación de Edman. El residuo amino terminal marcado (PTH-alanina en la primera vuelta) se puede liberar sin hidrolizar el resto del péptido. Con ello, el residuo amino terminal del péptido acortado (Gly-Asp-Phe-Arg-Gly) se puede determinar en la segunda ronda. Tres rondas más de la degradación de Edman revelan la secuencia completa del péptido original.

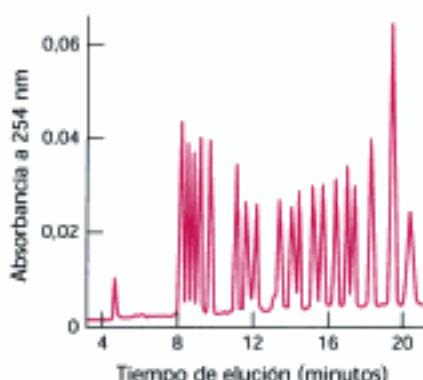


Figura 3.19 Separación de PTH-aminoácidos. Los PTH-aminoácidos se pueden separar rápidamente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En este perfil de HPLC, una mezcla de PTH-aminoácidos se resuelve perfectamente en sus componentes. Un aminoácido desconocido se puede identificar por su posición relativa de elución respecto a los conocidos.

vueltas más de la degradación de Edman revelarán la secuencia completa del pentapéptido original.

El desarrollo de secuenciadores automáticos ha disminuido de modo importante el tiempo necesario para determinar secuencias proteicas. Un ciclo de la degradación de Edman (la ruptura de un aminoácido de un péptido y su identificación) se realiza en menos de 1 hora. Por degradaciones repetidas, se puede determinar la secuencia aminoacídica de unos 50 aminoácidos de una proteína. Los secuenciadores en fase gaseosa pueden analizar cantidades de picomoles de péptidos y proteínas utilizando cromatografía líquida de alta presión para identificar cada aminoácido cuando se libera (Figura 3.19). La alta sensibilidad hace factible analizar la secuencia de una muestra de proteína obtenida de una banda única en un gel de SDS-poliacrilamida.

Las proteínas se pueden fragmentar de modo específico en péptidos pequeños para facilitar su análisis

En principio, debería ser posible secuenciar una proteína entera usando el método de Edman. En la práctica, los péptidos no pueden ser mucho más largos que unos 50 residuos, porque no todos los péptidos de la mezcla de reacción liberan el derivado de aminoácido a cada paso. Por ejemplo, si la eficiencia de la liberación fuera del 98% en cada paso, la proporción de aminoácido “correcto” liberado tras 60 rondas sería $(0,98)^{60}$, es decir, 0,3: una decepcionante mezcla impura. Este obstáculo se puede sortear si se corta, de modo específico, la proteína original en péptidos más pequeños que se pueden secuenciar individualmente. En suma, la estrategia es “divide y vencerás”.

La clave es el cortar la proteína en un número pequeño de fragmentos puros. La ruptura específica se puede conseguir por medios químicos o enzimáticos. Por ejemplo, el *bromuro de cianógeno* (CNBr) corta la cadena polipeptídica solamente en el lado carboxílico de los residuos de metionina (Figura 3.20). Una proteína que contiene 10 residuos de metionina, al cortarla con CNBr, dará habitualmente 11 péptidos. También se consigue una ruptura altamente específica con *tripsina*, un enzima proteolítico del jugo pancreático. La tripsina corta las cadenas polipeptídicas en el lado carboxílico de los residuos de arginina y lisina (Figura 3.21 y p. 246). Una proteína que contiene 9 residuos de lisina y 7 de arginina dará normalmente 17 péptidos tras la digestión con tripsina. Cada uno de estos péptidos trípticos, excepto el péptido carboxilo terminal de la proteína, acabará con arginina o lisina. La Tabla 3.3 indica otras formas diferentes de romper específicamente las cadenas polipeptídicas.

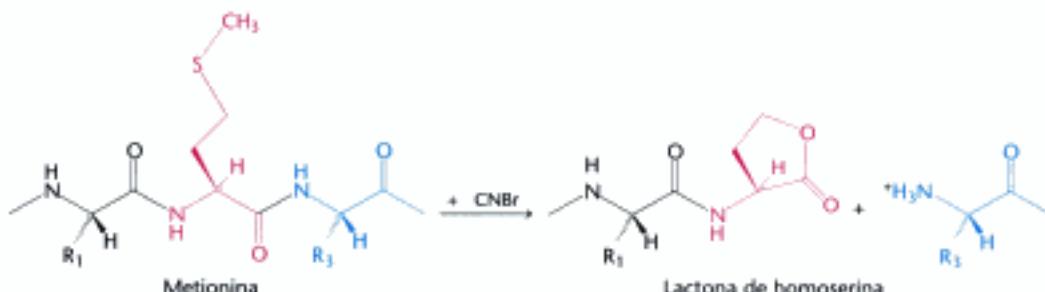


Figura 3.20 Ruptura por bromuro de cianógeno. El bromuro de cianógeno corta los polipéptidos por el lado carboxílico de los residuos de metionina.

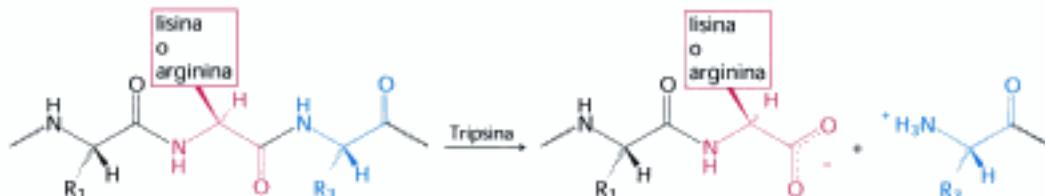


Figura 3.21 Ruptura por tripsina. La tripsina hidroliza los polipéptidos por el lado carboxílico de los residuos de arginina y lisina.

TABLA 3.3 Ruptura específica de los polipéptidos

Reactivos	Lugar de ruptura
Ruptura química	
Bromuro de cianógeno	Lado carboxilo de los residuos de metionina
O-Yodosobenzoato	Lado carboxilo de los residuos de triptófano
Hidroxilamina	Enlaces asparragina-glicina
2-Nitro-5-tiocianobenzoato	Lado amino de los residuos de cisteína
Ruptura enzimática	
Tripsina	Lado carboxilo de residuos de lisina y arginina
Clostripain	Lado carboxilo de los residuos de arginina
Proteasa de <i>Staphylococcus</i>	Lado carboxilo de los residuos de aspartato y glutamato (el glutamato sólo en ciertas condiciones)
Trombina	Lado carboxilo de la arginina
Quimotripsina	Lado carboxilo de la tirosina, triptófano, fenilalanina, leucina y metionina
Carboxipeptidasa A	Lado amino del aminoácido C-terminal (salvo arginina, lisina, o prolina)

Los péptidos obtenidos por ruptura específica química o enzimática se separan por alguna forma de cromatografía. La secuencia de cada péptido purificado se determina entonces por el método de Edman. En este punto, se conocen las secuencias de aminoácidos de la proteína, pero no está definido todavía el orden de estos segmentos. ¿Cómo podemos ordenar los péptidos para obtener la estructura primaria de la proteína original? La información complementaria que se requiere se obtendrá por *solapamiento de los péptidos* (Figura 3.22). Se utiliza un segundo enzima para fraccionar la cadena polipeptídica en enlaces diferentes. Por ejemplo, la quimotripsina corta preferentemente en el lado carboxílico de los residuos aromáticos y otros residuos no polares voluminosos (p. 247). Debido a que estos péptidos quimotriptípicos se superponen a dos o más péptidos trípticos, se pueden usar para establecer el orden de los péptidos. Así se llega a conocer la secuencia completa de la cadena polipeptídica.

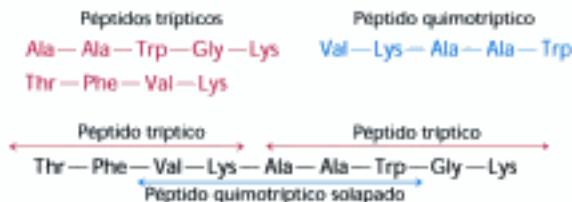


Figura 3.22. Péptidos solapados. El péptido obtenido por digestión quimotriptíptica se solapa con dos péptidos trípticos, estableciendo su orden.

Se necesitan pasos adicionales si la muestra inicial de proteína consta de varias cadenas polipeptídicas. La electroforesis en SDS-gel en condiciones reductoras debería mostrar el número de cadenas. Por otra parte, se puede determinar el número de aminoácidos N-terminales diferentes. Para una proteína consistente en dos o más cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes, se utilizan agentes desnaturalizantes para disociar las cadenas, como son la urea o el hidrocloruro de guanidina. Las cadenas disociadas deben separarse entre ellas antes de comenzar la determinación de las secuencias. Las cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro se separan con tioles como el β -mercaptoetanol o el ditiotreitol. Para evitar que los residuos de cisteína se recombinen, se alquilan posteriormente con yodoacetato para formar derivados estables S-carboximetilo (Figura 3.23). La secuenciación se puede llevar a cabo entonces como se ha descrito hasta ahora.

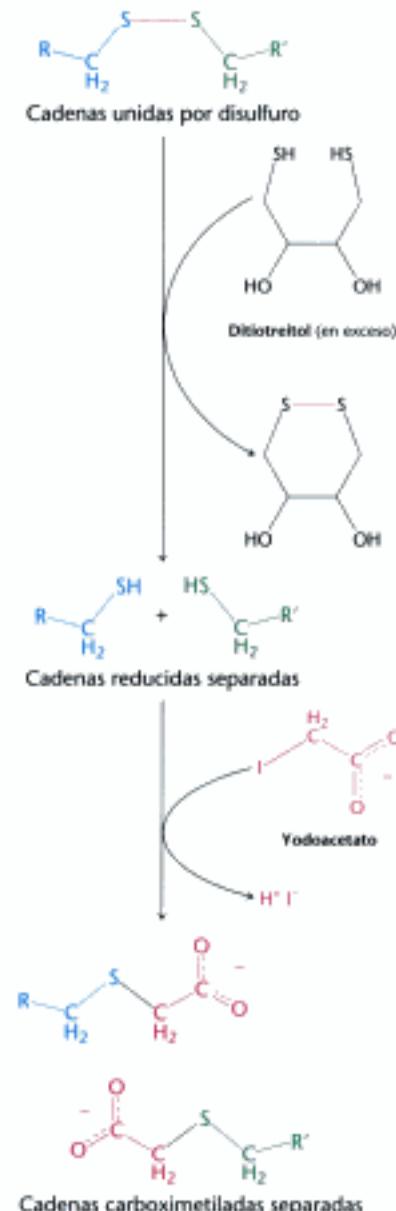


Figura 3.23. Reducción de los puentes disulfuro. Los polipéptidos unidos por puentes disulfuro se pueden separar por reducción con ditiotreitol seguido de alquilación para prevenir que se vuelvan a formar.

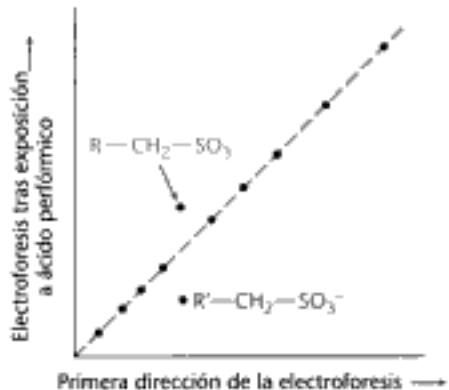
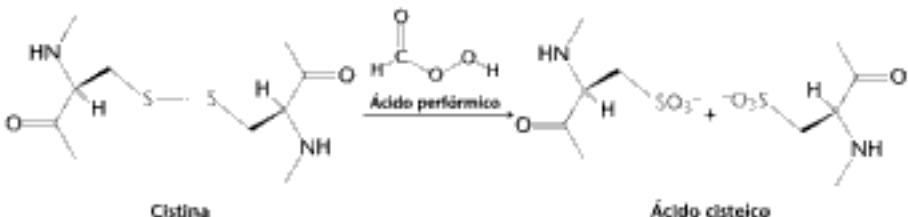


Figura 3.24 Electroforesis en diagonal. Los péptidos unidos por medio de puentes disulfuro se pueden detectar por electroforesis en diagonal. La mezcla de péptidos se somete a electroforesis en una calle en una dirección (horizontal) y se trata después con ácido perfórmico, que rompe y oxida los puentes disulfuro. La muestra se somete entonces a electroforesis en dirección perpendicular (vertical).

Para completar nuestro conocimiento de la estructura de la proteína, necesitamos determinar las posiciones de los puentes disulfuro originales. Esta información se puede obtener usando la técnica de *electroforesis en diagonal* para aislar las secuencias peptídicas que contienen estos enlaces (Figura 3.24). En primer lugar, la proteína se fragmenta específicamente en péptidos bajo condiciones en las que los puentes disulfuro permanecen intactos. La mezcla de péptidos se coloca en la esquina de una hoja de papel y se somete a electroforesis en una sola calle en una dirección. La hoja resultante se expone a vapores de ácido perfórmico, que rompen los puentes disulfuro y los convierte en residuos de ácido cisteíco. Los péptidos unidos originalmente por puentes disulfuro se vuelven independientes y más ácidos debido a la formación de un grupo SO_3^- .



Esta mezcla se somete a electroforesis en dirección perpendicular a la anterior en las mismas condiciones que la primera electroforesis. Los péptidos que estaban desprovistos de disulfuros tendrán la misma movilidad que anteriormente y, por ello, estarán situados en una diagonal única. Por el contrario, los péptidos recién formados que contienen ácido cisteíco migrarán normalmente de forma diferente a los péptidos originales, de forma que se situarán fuera de la diagonal. Estos péptidos se pueden aislar y secuenciar y se puede establecer la localización del puente disulfuro.

Las secuencias de aminoácidos son buenas fuentes de conocimiento

Una vez determinada la secuencia de aminoácidos de una proteína, esta es una fuente valiosa de información sobre su función, su estructura y su historia.

1. *La secuencia de una proteína de interés puede compararse con todas las otras secuencias conocidas para averiguar si existen similitudes significativas. ¿Pertenece esta proteína a una de las familias conocidas?* Una búsqueda de similitud entre una proteína recientemente sintetizada y los millones de secuencias previas tarda solamente unos segundos en un ordenador personal (Capítulo 6). Si la nueva proteína aislada es miembro de uno de los tipos establecidos de proteínas, podemos empezar a deducir información sobre la función de la proteína. Por ejemplo, la tripsina y la quimotripsina son miembros de la familia de las serinproteasas, un clan de enzimas proteolíticos que tienen un mecanismo catalítico común basado en un residuo activo de serina (p. 245). Si la secuencia de la proteína recién aislada muestra semejanza con la tripsina o la quimotripsina, el resultado sugiere que podría ser una serinproteasa.

2. *La comparación de secuencias de la misma proteína en diferentes especies proporciona abundante información sobre las vías evolutivas.* La relación genealógica entre especies se puede deducir a partir de diferencias en la secuencia de sus proteínas. Podemos incluso estimar el tiempo en el que dos líneas evolutivas divergieron, gracias a la naturaleza cronológica de las mutaciones aleatorias. Por ejemplo, una comparación de albúminas séricas de primates indica que los seres humanos y los simios africanos divergieron hace 5 millones de años, y no 30 millones de años como se pensaba anteriormente. Los análisis de secuencias han abierto nuevas perspectivas sobre el registro fósil y la vía de la evolución del hombre.

3. *Las secuencias de aminoácidos se pueden analizar para encontrar repeticiones internas.* Estas repeticiones internas nos pueden dar información sobre la historia de una proteína específica. Aparentemente, muchas proteínas se han generado por du-

plicación de un gen primordial seguido por su diversificación. Por ejemplo, la calmodulina, un sensor de calcio ubicuo en eucariotas, contiene cuatro módulos de unión a calcio que se originaron por duplicaciones génicas (Figura 3.25).

4. Muchas proteínas contienen secuencias de aminoácidos que sirven como señales para indicar su destino o controlar su maduración. Una proteína destinada, por ejemplo, a la exportación desde una célula o para su emplazamiento en una membrana, contiene una secuencia señal, una serie de aproximadamente 20 residuos hidrofóbicos cerca del extremo amino terminal que dirigen la proteína hacia la membrana apropiada. Otra proteína puede incluir una serie de aminoácidos que funcionan como una señal de localización nuclear, dirigiendo la proteína al núcleo.

5. Los datos de secuencia proporcionan una base para la preparación de anticuerpos específicos contra una proteína de interés. Un examen cuidadoso de la secuencia de aminoácidos de una proteína puede señalar qué secuencias serán las más probables para producir un anticuerpo cuando se inyecten a un ratón o un conejo. Se pueden sintetizar péptidos con estas secuencias y usarlos para generar anticuerpos contra la proteína. Estos anticuerpos específicos pueden ser muy útiles para determinar la cantidad de la proteína en una disolución o en sangre, localizar su distribución en el interior de la célula, o bien clonar su gen (p. 85).

6. Las secuencias de aminoácidos son útiles para fabricar sondas de DNA específicas para los genes que codifican a las correspondientes proteínas (p. 139). El conocimiento de la estructura primaria de una proteína permite el uso de la genética de forma inversa. Las sondas de DNA que corresponden a una parte de la secuencia de aminoácidos se pueden construir en base al código genético. Estas sondas se pueden utilizar para aislar el gen de la proteína, de modo que se puede determinar la secuencia entera de la proteína. A su vez, el gen puede proporcionar información valiosa sobre la regulación fisiológica de la proteína. La secuenciación de proteínas es parte integral de la genética molecular, al igual que el clonado de DNA es fundamental para el análisis de la estructura y función de las proteínas. En el Capítulo 5 se retomarán algunos de estos temas.

La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la secuenciación de las proteínas

Cientos de proteínas se han secuenciado por medio de la degradación de Edman de péptidos obtenidos mediante cortes específicos. No obstante, se requiere un esfuerzo hercúleo para averiguar la secuencia de proteínas grandes, aquellas que tienen más de 1.000 residuos. Para secuenciar estas proteínas, una aproximación experimental complementaria basada en la tecnología del DNA recombinante es normalmente más eficaz. Como se verá en el Capítulo 6, se pueden clonar y secuenciar hebras largas de DNA y la secuencia de nucleótidos revela directamente la secuencia de aminoácidos codificada por el gen (Figura 3.26). La tecnología del DNA recombinante está produciendo una abundante información sobre secuencia de aminoácidos a una velocidad considerable.

Incluso utilizando la secuencia de bases del DNA para determinar la estructura primaria, todavía se necesita trabajar con proteínas aisladas. La secuencia de aminoácidos deducida de la lectura del DNA es la de la proteína naciente, el producto directo de la maquinaria de traducción. Muchas proteínas se modifican tras la síntesis. Algu-



Figura 3.25 Motivos repetitivos en una cadena proteica. La calmodulina, un sensor de calcio, contiene cuatro unidades similares en una sola cadena polipeptídica (en rojo, amarillo, azul y naranja). Cada unidad une un ion calcio (en verde). [Tomado de 1CLL.pdb.]

Secuencia de DNA: GGG | TTC | TTG | GGA | GCA | GCA | GGA | AGC | ACT | ATG | GGC | GCA|

Secuencia de aminoácidos	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala
--------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 3.26 La secuencia del DNA nos da la secuencia de aminoácidos. La secuencia completa de nucleótidos del HIV-1 (virus de la inmunodeficiencia humana), el causante del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), se determinó en menos de un año tras el aislamiento del virus. Una parte de la secuencia de DNA especificada por el genoma de RNA del virus se muestra con la correspondiente secuencia de aminoácidos (deducida del conocimiento del código genético).

nas tienen sus extremos modificados, y otras se producen por corte de una cadena polipeptídica inicial más larga. Los residuos de cisteína en algunas proteínas se modifican oxidándose para formar puentes disulfuro, que conectan partes de la misma cadena polipeptídica o cadenas separadas. En algunas proteínas se alteran cadenas laterales específicas. Las secuencias de aminoácidos derivadas de secuencias de DNA son ricas en información, pero no revelan estas modificaciones posttraduccionales. Se necesita el análisis químico de las proteínas en su forma final para descubrir la naturaleza de estos cambios, que suelen ser críticos para las actividades biológicas de la mayor parte de las proteínas. Así, los análisis genómicos y proteómicos son abordajes complementarios para averiguar las bases estructurales de la función proteica.

3.3 La inmunología proporciona técnicas importantes para la investigación en proteínas

Los métodos inmunológicos para el estudio de las proteínas aprovechan la exquisita especificidad de los anticuerpos por sus proteínas-diana. Los anticuerpos marcados proporcionan medios para etiquetar una proteína específica, lo que permite aislarla, cuantificarla o visualizarla.

Se pueden generar anticuerpos contra proteínas específicas

Las técnicas inmunológicas comienzan con la generación de anticuerpos contra una proteína determinada. Un *anticuerpo* (también conocido como *immunoglobulina*, Ig) es de hecho una proteína sintetizada por un animal en respuesta a la presencia de una sustancia extraña, llamada *antígeno*. Los anticuerpos tienen especificidad y alta afinidad por los antígenos que provocan su síntesis. La unión antígeno-anticuerpo es un paso de la respuesta inmune que protege al animal de la infección (Capítulo 33). Las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos pueden ser antígenos eficaces. Moléculas pequeñas extrañas, como los péptidos sintéticos, también pueden producir anticuerpos, siempre que esta molécula pequeña esté asociada a un transportador macromolecular. Un anticuerpo reconoce un grupo específico o agrupación de aminoácidos en la molécula diana que se denomina *determinante antigenético* o *epítopo* (Figuras 3.27 y 3.28). Los animales tienen un amplio repertorio de células pro-

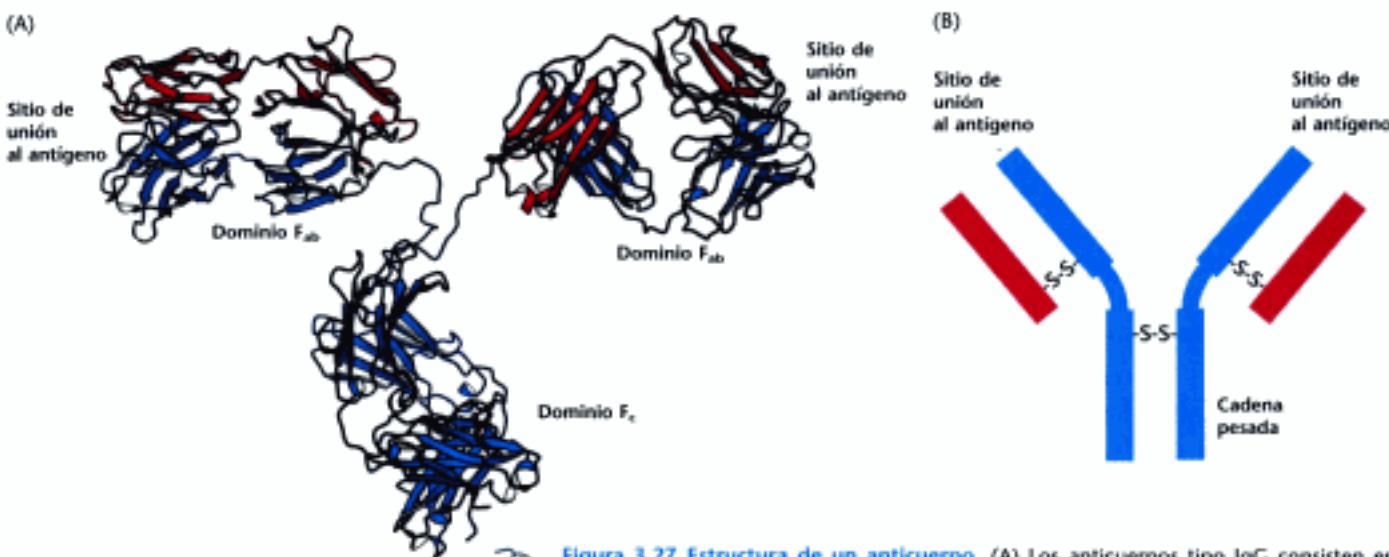
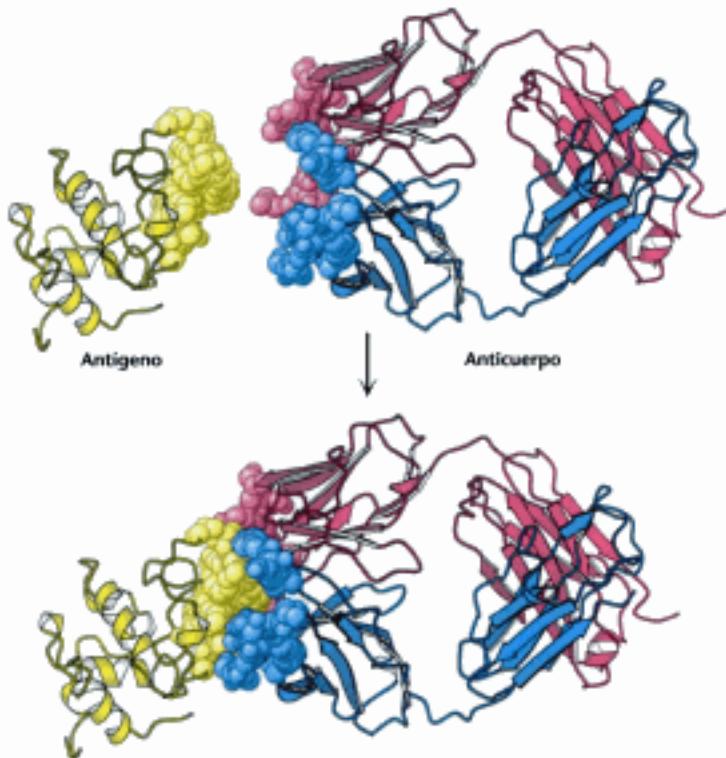


Figura 3.27 Estructura de un anticuerpo. (A) Los anticuerpos tipo IgG consisten en cuatro cadenas, dos cadenas pesadas (en azul) y dos ligeras (en rojo), unidas por puentes disulfuro. Las cadenas ligera y pesada se unen para formar los dominios F_{ab} , que tienen los centros de unión al antígeno en sus extremos. Las dos cadenas pesadas forman el dominio F_c . Los dominios F_{ab} se unen al dominio F_c mediante conexiones flexibles. (B) Una representación más esquemática de una molécula de IgG. [Tomado de 1IGT.pdb.]



ductoras de anticuerpos; cada una de ellas puede producir un único anticuerpo específico. Un antígeno actúa estimulando la proliferación de un número pequeño de células que ya eran capaces de formar un anticuerpo capaz de reconocer el antígeno.

Las técnicas inmunológicas dependen de nuestra capacidad de generar anticuerpos contra un antígeno específico. Para obtener anticuerpos que reconozcan a una proteína determinada, un bioquímico inyecta dos veces la proteína a un conejo, con un intervalo de tres semanas. La proteína inyectada estimula la reproducción de las células que producen anticuerpos que reconocen a la sustancia extraña. Varias semanas más tarde, se le extrae sangre al conejo inmunizado y se centrifuga para separar las células sanguíneas del sobrenadante, o suero. El suero, conocido como *antisuero*, contiene anticuerpos contra todos los antígenos a los que ha estado expuesto el conejo. De ellos, solamente algunos serán anticuerpos contra la proteína inyectada. Además, los anticuerpos de una especificidad determinada no son una única especie molecular. Por ejemplo, el 2,4-dinitrofenol (DNP) se ha utilizado como hapteno para generar anticuerpos contra el DNP. Los análisis de los anticuerpos anti-DNP revelaron una amplia gama de afinidades de unión –las constantes de afinidad estaban en el intervalo de 0,1 nM a 1 μ M. Asimismo, cuando el anticuerpo anti-DNP se sometía a isoelectroforesis, se veía un gran número de bandas. Estos resultados indican que las células están produciendo muchos anticuerpos diferentes, cada uno de ellos reconociendo un rasgo diferente de la superficie del mismo antígeno. Los anticuerpos son heterogéneos, o *policlonales* (Figura 3.29). Esta heterogeneidad es una barrera, que puede complicar el uso de estos anticuerpos.

Se pueden preparar fácilmente anticuerpos monoclonales de prácticamente cualquier especificidad deseada

El descubrimiento de un modo de producir *anticuerpos monoclonales* de prácticamente cualquier especificidad deseada fue un avance importante que intensificó la capacidad de los abordajes inmunológicos. Al igual que el trabajar con proteínas impuras hace difícil interpretar los datos y entender la función, lo mismo sucede cuando se trabaja con una mezcla heterogénea de anticuerpos. El ideal sería aislar un clon de células que produjeran sólo un anticuerpo único. El problema es que las células productoras de anticuerpo aisladas de un organismo mueren rápidamente.

Figura 3.28 Interacciones antígeno-anticuerpo. Una proteína antigénica, en este caso lisozima, se une al extremo del dominio F_{ab} de un anticuerpo. El extremo del anticuerpo y el antígeno tienen formas complementarias, permitiendo que tras la unión se oculte una gran cantidad de superficie. [Tomado de 3HFL.pdb.]

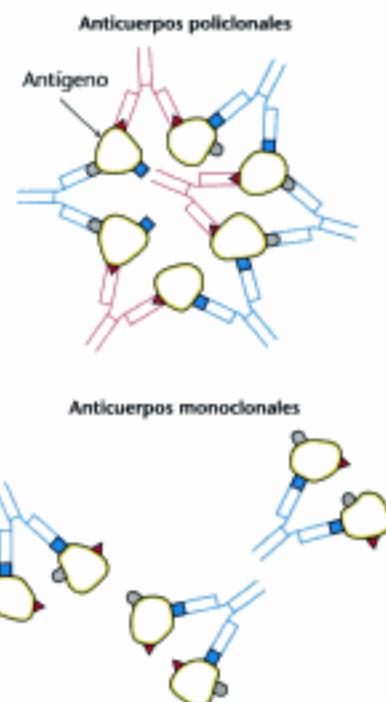


Figura 3.29 Anticuerpos policlonales y monoclonales. La mayor parte de los antígenos tienen varios epitopos. Los anticuerpos policlonales son mezclas heterogéneas de anticuerpos, cada uno específico para uno de los diversos epitopos de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son todos idénticos, producidos por clones de una única célula productora de anticuerpos. Reconocen un epitopo específico. [Tomado de R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 154.]

Existen líneas celulares inmortales que producen anticuerpos monoclonales. Estas líneas celulares se derivan de un tipo de cáncer, el *mieloma múltiple*, una alteración maligna de las células productoras de anticuerpos. En este cáncer, una única célula plasmática transformada se divide descontroladamente, generando un gran número de *células de una clase única*. Son un *clon* porque descienden de la misma célula y tienen las mismas propiedades. Las células idénticas del mieloma segregan grandes cantidades de *inmunoglobulina normal de una clase única*, generación tras generación. Estos anticuerpos fueron útiles para averiguar la estructura del anticuerpo, pero no se conoce nada sobre su especificidad por lo que son inútiles para los métodos inmunológicos que se describen en las páginas siguientes.

César Milstein y Georges Köhler descubrieron que *podían obtenerse grandes cantidades de anticuerpo homogéneo de casi cualquier especificidad deseada por medio de la fusión de una célula productora de anticuerpo de corta vida con una célula inmortal de mieloma*. Se inyecta un antígeno en un ratón, y unas semanas más tarde se le extrae el bazo (Figura 3.30). Una mezcla de células plasmáticas del bazo se fusionan *in vitro* con células de mieloma. Cada una de las células hibridas resultantes, llamadas *células hibridomas*, produce indefinidamente un anticuerpo homogéneo especificado por la célula parental del bazo. Las células hibridoma se pueden entonces tamizar, usando algún tipo de ensayo para la interacción antígeno-anticuerpo, para determinar cuáles producen el anticuerpo que tiene la especificidad deseada. Las células recolectadas que producen el anticuerpo deseado se subdividen y reensayan. Este proceso se repite hasta que se aísla un línea celular pura, un clon produciendo un anticuerpo único. Estas células positivas pueden hacerse crecer en un medio de cultivo o inyectarse a ratones para inducir mielomas. Alternativamente, las células pueden congelarse y almacenarse durante largos períodos.

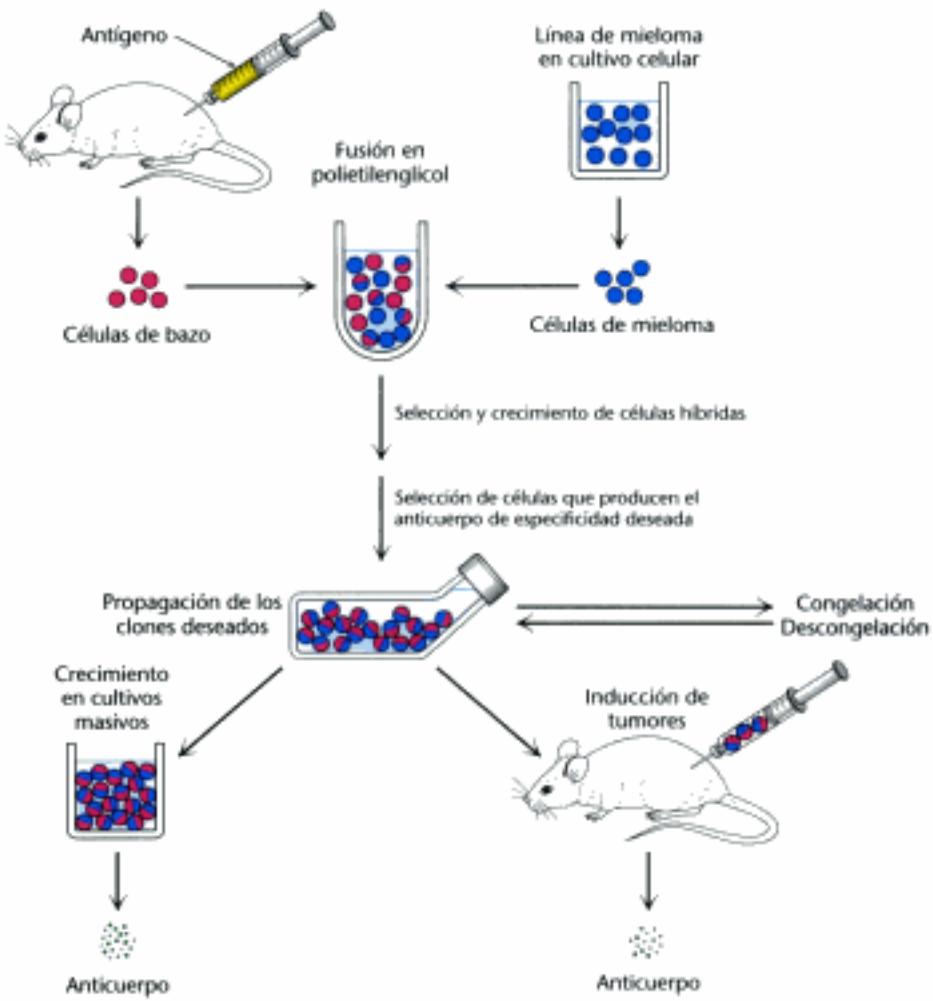


Figura 3.30 Preparación de anticuerpos monoclonales. Las células hibridoma se forman por fusión de células productoras de anticuerpos y células de mieloma. Las células hibridas se dejan proliferar haciéndolas crecer en un medio selectivo. Luego se tamizan para determinar cuáles producen el anticuerpo de la especificidad deseada. [Tomado de C. Milstein. Monoclonal antibodies. Copyright © 1980 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

El método del hibridoma para producir anticuerpos monoclonales ha abierto nuevos horizontes en biología y en medicina. Se pueden preparar fácilmente grandes cantidades de anticuerpos homogéneos con especificidades hechas a medida. Son fuente de conocimiento en las relaciones entre la estructura del anticuerpo y su especificidad. Además, los anticuerpos monoclonales sirven como reactivos analíticos y preparativos muy precisos. Por ejemplo, se puede obtener un anticuerpo puro contra un antígeno que no se ha aislado todavía (Sección 3.4). Se han identificado proteínas que dirigen el desarrollo, utilizando anticuerpos monoclonales como etiquetas (Figura 3.31). Los anticuerpos monoclonales unidos a soportes sólidos se pueden usar como columnas de afinidad para purificar proteínas escasas. Este método ha servido para purificar 5000 veces el interferón (una proteína antivírica) a partir de una mezcla cruda. Los laboratorios clínicos utilizan anticuerpos monoclonales en muchos ensayos. Por ejemplo, la detección en sangre de isozimas que normalmente se encuentran en el corazón apunta a un infarto de miocardio (ataque cardíaco). Las transfusiones sanguíneas son hoy más seguras por tamizado del anticuerpo de la sangre del donante para los virus que causan SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), hepatitis, y otras enfermedades infecciosas. Los anticuerpos monoclonales se están evaluando también para su uso como agentes terapéuticos, como ocurre en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el trastuzumab (Herceptina[®]) es un anticuerpo monoclonal utilizado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de mama.

Las proteínas se pueden detectar y cuantificar mediante un ensayo de inmunoabsorción asociada a enzima

Los anticuerpos se pueden usar como reactivos analíticos exquisitamente específicos para la determinación de la cantidad de una proteína u otro antígeno. La técnica es el *ensayo de inmunoabsorción asociada a enzima* (*ELISA*, “enzyme-linked immunoabsorbent assay”). En este método, se utiliza un enzima que reacciona con un sustrato incoloro de forma que produce un producto coloreado. El enzima se une covalentemente a un anticuerpo específico que reconoce a un antígeno diana. Si el antígeno está presente, el complejo enzima-anticuerpo se unirá a él, y el componente enzimático del complejo enzima-anticuerpo catalizará la reacción que generará el producto coloreado. Así, la presencia del producto coloreado indica la presencia del antígeno. Este ensayo de inmunoabsorción asociada a enzima, que es rápido e idóneo, puede detectar menos de un nanogramo (10^{-9} g) de una proteína. El ELISA se puede efectuar con anticuerpos policlonales o monoclonales, pero el uso de anticuerpos monoclonales da resultados más fiables.

Vamos a considerar dos entre los diferentes tipos de ELISA. El *ELISA indirecto* se utiliza para detectar la presencia de anticuerpo y es la base de la prueba para la infección de HIV. La prueba del HIV detecta la presencia de anticuerpos que reconocen las proteínas del núcleo vírico, el antígeno. Las proteínas del núcleo del virus se adsorben en el fondo de un pocillo. Los anticuerpos del paciente se añaden a este pocillo revestido. Solamente los pacientes infectados por el HIV tendrán anticuerpos que se puedan unir al antígeno. Finalmente, anticuerpos unidos a enzima contra anticuerpos humanos (por ejemplo, anticuerpos de cabra que reconocen anticuerpos humanos) pueden reaccionar en el pocillo de forma que los anticuerpos no unidos se liberan por lavado. Se añade entonces el sustrato. Una reacción enzimática sugiere que los anticuerpos asociados a enzima estaban unidos a los anticuerpos humanos, lo que a su vez implica que el paciente tenía anticuerpos contra el antígeno vírico (Figura 3.32).

El *ELISA sandwich* permite la detección del antígeno y no del anticuerpo. El anticuerpo contra un enzima particular se adsorbe primero en el fondo de un pocillo. A continuación se añade sangre u orina que contenga el antígeno al pocillo y se une al anticuerpo. Finalmente, se añade un segundo anticuerpo, diferente, al antígeno. Este anticuerpo está asociado a enzima y se procesa como se ha indicado para el ELISA indirecto. En este caso, la cuantía de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente. Por ello, permite la medida de pequeñas cantidades de antígeno (Figura 3.32).



Figura 3.31 Micrografía de fluorescencia de un embrión de *Drosophila* en desarrollo. El embrión se tñó con un anticuerpo monoclonal, marcado fluorescente, contra la proteína que se une al DNA, codificada por engrailed, un gen esencial para especificar el desarrollo del cuerpo. [Cortesía del Dr. Nipam Patel y el Dr. Corey Goodman.]

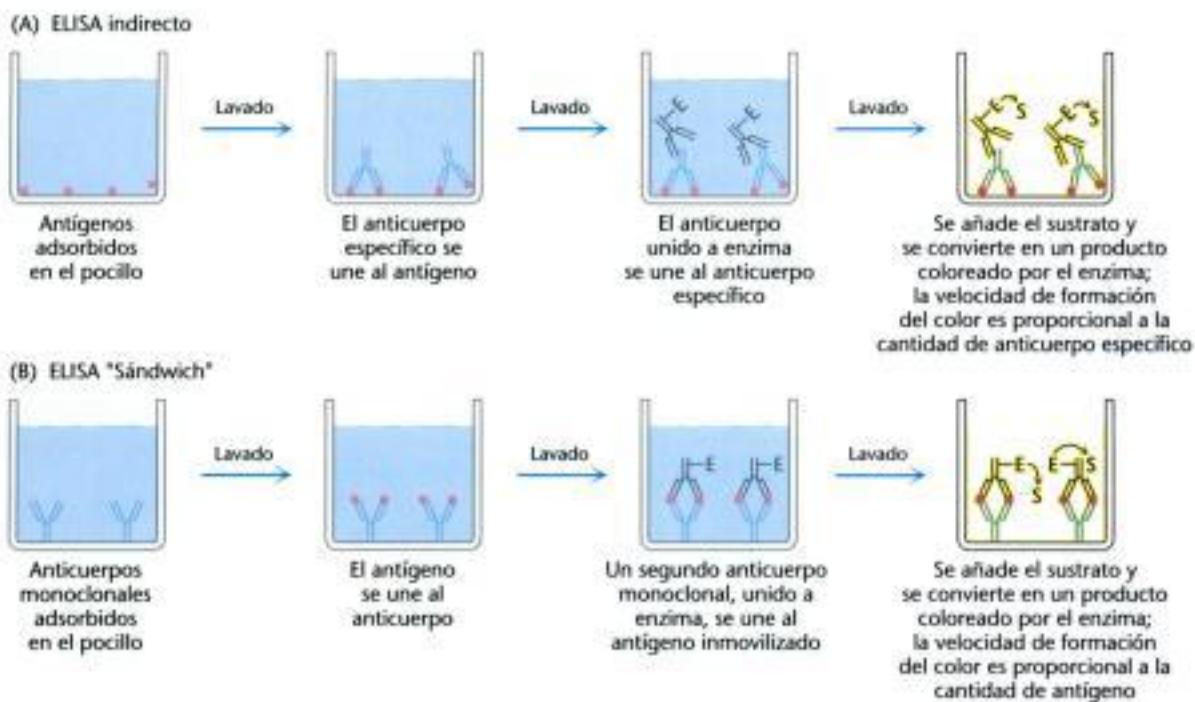


Figura 3.32 ELISA indirecto y ELISA sándwich. (A) En el método ELISA indirecto, la producción de color indica la cantidad de anticuerpo contra un antígeno específico. (B) En el ELISA sándwich, la producción de color indica la cantidad de antígeno. [Tomado de R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 162.]

La transferencia Western permite la detección de proteínas separadas por electroforesis en gel

Pequeñas cantidades de una proteína particular en una célula o un líquido corporal se pueden detectar por una técnica de inmunoensayo conocida como transferencia Western (del inglés, *Western blotting*) (Figura 3.33). Se somete la muestra a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas separadas en el gel se transfieren a la superficie de una lámina de polímero para hacerlas más accesibles a la reacción. Se añade a la lámina un anticuerpo que sea específico para la proteína de interés y éste reacciona



Figura 3.33 Transferencia Western. Las proteínas en un gel de SDS-poliacrilamida se transfieren a una hoja de polímero y se tifan con un anticuerpo radiactivo. Aparece en la autorradiografía una banda correspondiente a la proteína a la que se une el anticuerpo.

con su antígeno. El complejo antígeno–anticuerpo en la lámina se puede detectar con un segundo anticuerpo específico para el primero (por ejemplo, un anticuerpo de cabra que reconozca a un anticuerpo de ratón). Una marca radiactiva en el segundo anticuerpo produce una banda oscura en una película de rayos X (una *autorradiografía*). Como alternativa, se podría utilizar un enzima sobre el segundo anticuerpo que generase un producto coloreado, como en el método ELISA. La transferencia Western hace posible encontrar una proteína en una mezcla compleja, la proverbial “aguja en un pajar”. Es la base para la prueba de infección por hepatitis C, donde se usa para detectar una proteína del núcleo del virus. Esta técnica es muy útil también en la clonación de genes.

Los marcadores fluorescentes hacen posible la visualización de proteínas en la célula

Los trabajos bioquímicos se efectúan a menudo en tubos de ensayo o en geles de poliacrilamida. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas funcionan en el contexto de una célula. Los marcadores fluorescentes proporcionan unos recursos poderosos para examinar las proteínas en su entorno biológico. Así, por ejemplo, las células se pueden teñir con anticuerpos marcados con fluorescencia u otras proteínas fluorescentes, y examinarlas por *microscopía de fluorescencia* para localizar a una proteína de interés. Así, se hacen evidentes una serie de haces paralelos en las células teñidas con un anticuerpo específico para la actina, una proteína que polimeriza en filamentos (Figura 3.34). Los filamentos de actina son constituyentes del citoesqueleto, el andamiaje interno de las células que controla su forma y movimiento. Rastreando la localización de las proteínas, los marcadores fluorescentes también aportan claves para conocer la función proteica. Por ejemplo, la proteína receptora de glucocorticoides es un factor de transcripción que controla la expresión genética en respuesta a la hormona esteroide cortisol. El receptor se unió a la *proteína fluorescente verde* (GFP, green fluorescent protein), una proteína fluorescente natural aislada de la medusa *Aequorea victoria* (p. 58). La microscopía de fluorescencia reveló que, en ausencia de la hormona, el receptor se localiza en el citoplasma (Figura 3.35A). Tras añadir el esteroide, el receptor se transloca al núcleo, donde se une al DNA (Figura 3.35B). Estos resultados sugieren que la proteína receptora del glucocorticoide es un factor de transcripción que controla la expresión génica.

El poder de resolución máximo de la microscopía de fluorescencia es de unos 0,2 µm (200 nm, o 2000 Å), la longitud de onda de la luz visible. Se puede obtener una resolución espacial más afinada mediante microscopía electrónica si se utilizan anticuerpos etiquetados con marcadores densos en electrones. Por ejemplo, los anticuerpos conjugados con partículas de oro o con ferritina (que contiene un núcleo rico en hierro, denso en electrones) se pueden visualizar fácilmente por microscopía elec-

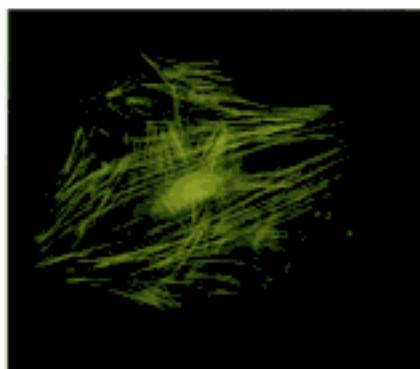


Figura 3.34 Filamentos de actina. Micrografía de fluorescencia de filamentos de actina en una célula teñida con un anticuerpo específico contra la actina [Cortesía del Dr. Elias Lazarides.]

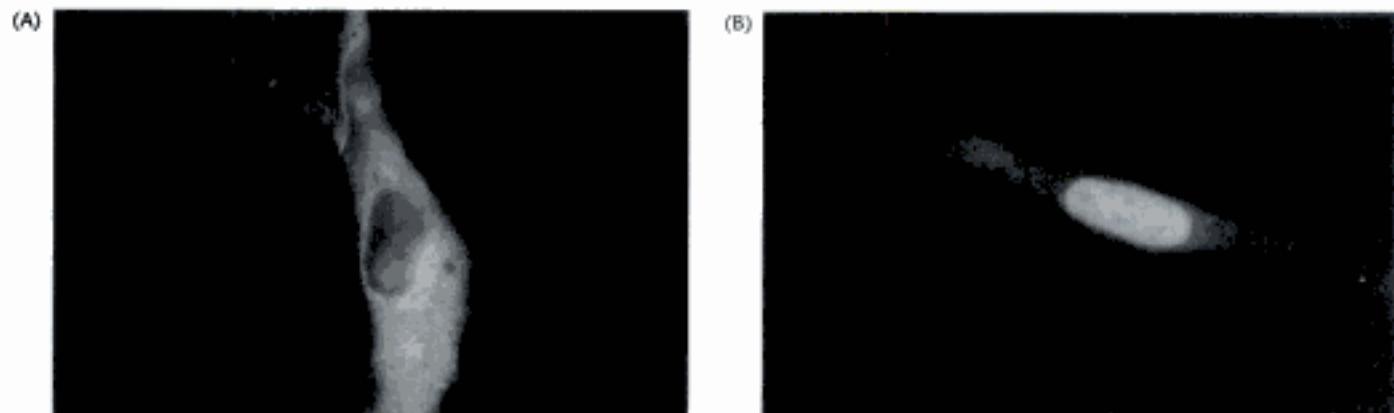


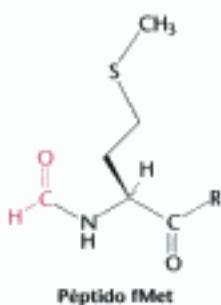
Figura 3.35 Localización nuclear de un receptor de esteroides. (A) El receptor, visualizado por unión de la proteína fluorescente verde, se localiza principalmente en el citoplasma de la célula en cultivo. (B) Tras la adición de corticoesterona (un esteroide glucocorticoide), el receptor se desplaza al núcleo. [Cortesía del Profesor William B. Pratt.]



Figura 3.36 Inmunomicroscopía electrónica. Las partículas opacas (150-Å, o 15 nm de diámetro) en esta micrografía electrónica son grupos de átomos de oro unidos a moléculas de anticuerpo. Estas vesículas de membrana que provienen de sinapsis neuronales contienen una proteína de un conducto que es reconocida por el anticuerpo específico. [Cortesía del Dr. Peter Sargent.]

trónica. La *microscopía inmunoelectrónica* puede definir la posición de los antígenos hasta una resolución de 10 nm (100 Å) o aún mayor (Figura 3.36).

3.4 Los péptidos se pueden sintetizar utilizando metodología en fase sólida automatizada



Se pueden sintetizar péptidos de secuencia definida para ayudar a los análisis bioquímicos. Estos péptidos son herramientas útiles por varias razones.

1. *Los péptidos sintéticos pueden servir como antígenos para estimular la formación de anticuerpos específicos.* Supongamos que queremos aislar la proteína expresada por un gen específico. Se pueden sintetizar péptidos que correspondan a la traducción de parte de la secuencia de nucleótidos del gen y generar anticuerpos dirigidos contra esos péptidos. Estos anticuerpos se pueden utilizar para aislar la proteína intacta, o localizarla en la célula.

2. *Los péptidos sintéticos se pueden usar para aislar receptores de muchas hormonas y otras moléculas señal.* Por ejemplo, las bacterias atraen a los leucocitos a través de péptidos con formilmetionilo (fMet) que se liberan en la ruptura de las proteínas bacterianas. Los péptidos con formilmetionilo sintéticos han sido útiles en la identificación del receptor de la superficie celular de este tipo de péptidos. Además, los péptidos sintéticos se pueden unir a bolitas de agarosa para preparar columnas de cromatografía de afinidad para la purificación de proteínas receptoras que reconocen específicamente a estos péptidos.

3. *Los péptidos sintéticos pueden utilizarse como fármacos.* La vasopresina es una hormona peptídica que estimula la reabsorción de agua en los túbulos distales del riñón, formando una orina más concentrada. Los pacientes con diabetes insípida son deficientes en vasopresina (también llamada *hormona antidiurética*), por lo que excretan grandes volúmenes de orina (más de 5 litros por día) y están continuamente sedientos. Este defecto se puede tratar administrando 1-desamino-8-D-arginina vasopresina, un análogo sintético de la hormona que falta (Figura 3.37). Este péptido sintético se degrada *in vivo* mucho más lentamente que la vasopresina y no incrementa la presión sanguínea.

4. Finalmente, *el estudio de péptidos sintéticos puede ayudar a definir las reglas que gobiernan la estructura tridimensional de las proteínas.* Podemos preguntarnos si una secuencia particular por sí misma se pliega en hélice α, hebra β, giro en horquilla, o se comporta como un ovillo estadístico. Los péptidos creados para estos estudios pueden incorporar aminoácidos que no se encuentran normalmente en las proteínas, permitiendo una variación mayor en estructura química que la posible usando solamente los 20 aminoácidos habituales.

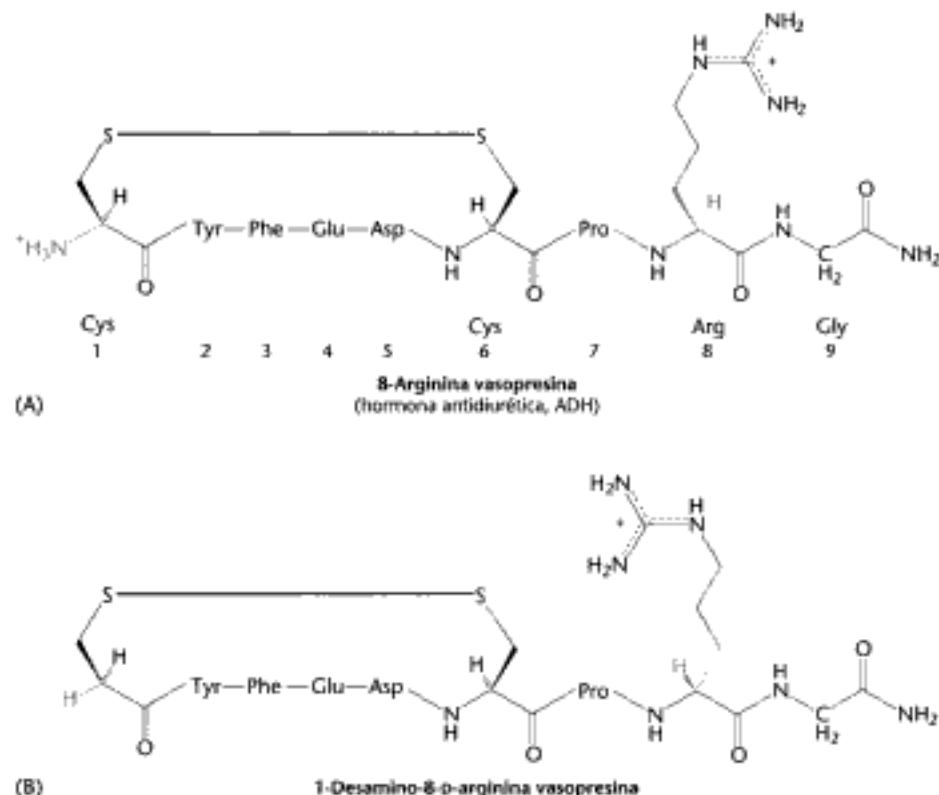
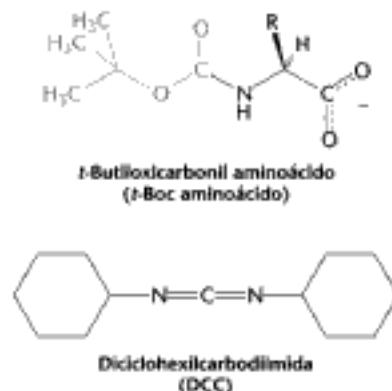


Figura 3.37 Vasopresina y un análogo sintético de vasopresina. Fórmulas estructurales de (A) vasopresina, una hormona peptídica que estimula la reabsorción de agua, y (B) 1-desamino-8-D-arginina vasopresina, un análogo sintético más estable de esta hormona antidiurética.

¿Cómo se construyen estos péptidos? El grupo amino de un aminoácido se une al grupo carboxilo de otro. Sin embargo, sólo se forma un producto único cuando un único grupo amino y un único grupo carboxilo están accesibles para reaccionar. Por ello, es necesario bloquear algunos grupos y activar otros para prevenir reacciones no deseadas. El grupo α -amino del primer aminoácido del péptido deseado se bloquea con un grupo *tert*-butiloxicarbonilo (*t*-Boc), dando un *t*-Boc-aminoácido. El grupo carboxilo de este mismo aminoácido se activa haciéndolo reaccionar con un reactivo como la *diciclohexilcarbodiímidia* (DCC), como se ilustra en la Figura 3.38. El grupo amino libre del siguiente aminoácido a unirse ataca el carboxilo activado, originando un enlace peptídico y liberando diciclohexilurea. El grupo carboxilo del dipéptido resultante se activa con DCC y reacciona con el grupo amino libre del aminoácido que va a ser el tercer residuo del péptido. Este proceso se repite hasta que se sintetiza todo el péptido deseado. La exposición del péptido a ácido diluido libera el grupo *t*-Boc protector del primer aminoácido dejando el resto de los enlaces peptídicos intactos.

Se pueden sintetizar péptidos que contienen más de 50 aminoácidos por repetición secuencial de las reacciones precedentes. La unión de la cadena peptídica creciente a una matriz insoluble, tal como bolitas de poliestireno, incrementa aún más la eficiencia. Una ventaja importante de este *método en fase sólida*, desarrollado primero por R. Bruce Merrifield, es que el producto esperado en cada fase queda unido a las bolitas que se pueden filtrar y lavar rápidamente, por lo que no es necesario purificar intermediarios. Todas las reacciones se llevan a cabo en el mismo recipiente, por lo que se evitan las pérdidas causadas por la transferencia repetida de los productos. El aminoácido carboxilo terminal de la secuencia peptídica deseada se ancla primero a las bolitas de poliestireno (Figura 3.39). Se separa entonces el grupo *t*-Boc protector de este aminoácido. El siguiente aminoácido (en la forma *t*-Boc protegida) y la DCC, el agente acoplante, se añaden juntos. Tras formarse el enlace peptídico, el exceso de reactivos y la diciclohexilurea se lavan, dejando unido a las bolitas el producto dipéptido deseado. Se van uniendo más aminoácidos por la misma secuencia de reacciones. Al final de la síntesis, el péptido se libera de las bolitas por adi-



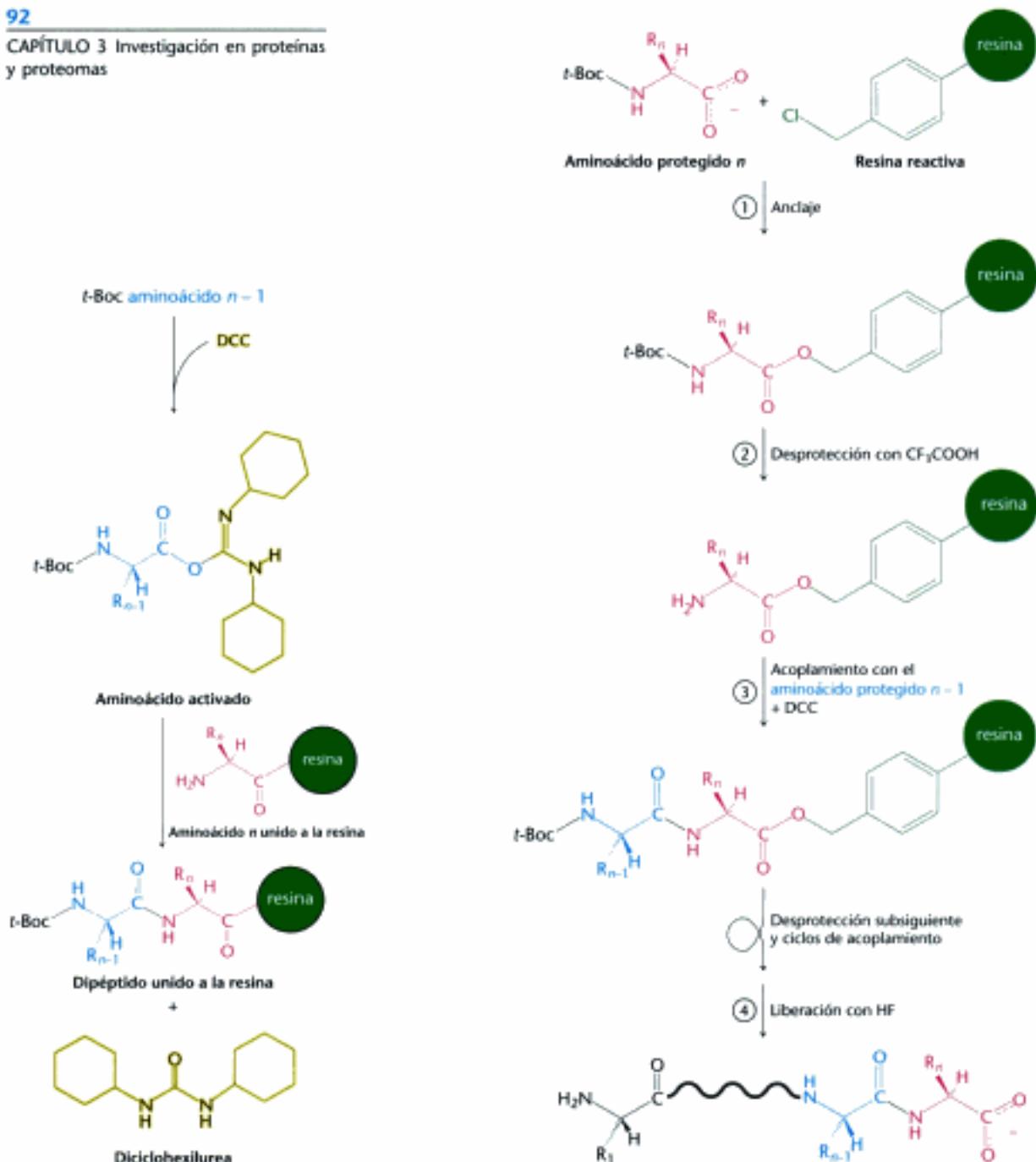


Figura 3.38 Activación de aminoácidos. La diciclohexilcarbodiimida se usa para activar grupos carboxilo para la formación de enlaces peptídicos.

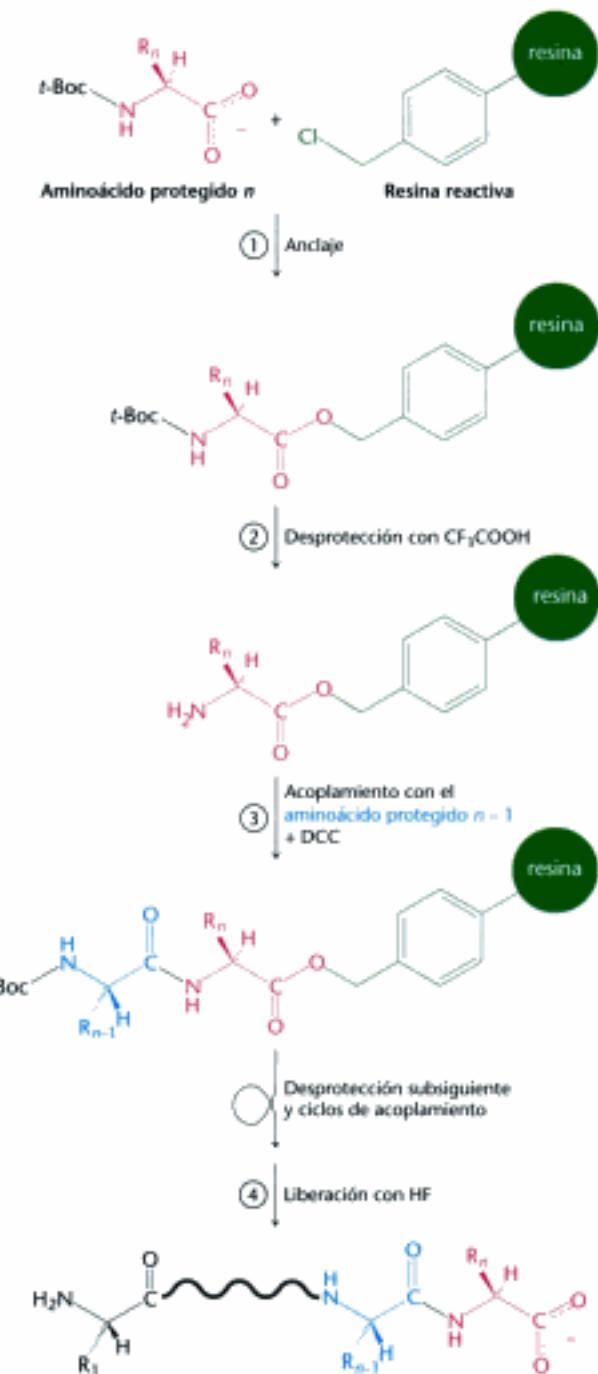


Figura 3.39 Síntesis de péptidos en fase sólida. Las etapas son: (1) anclaje del aminoácido C-terminal, (2) desprotección del amino terminal, y (3) acoplamiento del siguiente residuo. Los pasos 2 y 3 se repiten por cada aminoácido que se añade. Por último, en el paso 4, el péptido terminado se libera de la resina.

ción de ácido fluorhídrico (HF), que rompe el anclaje de éster carboxílico sin alterar los enlaces peptídicos. Los grupos protectores de las cadenas laterales potencialmente reactivas, como las de la lisina, también se quitan en este momento. Este ciclo de reacciones se puede automatizar fácilmente, lo que lo hace capaz para la síntesis rutinaria de péptidos de unos 50 residuos con un buen rendimiento y pureza. De hecho, el método de fase sólida se ha usado para sintetizar interferones (155 residuos) que tienen actividad antivírica y también ribonucleasa (124 residuos) catalíticamente.

activa. Los grupos protectores y los agentes de ruptura se pueden variar para mayor flexibilidad o conveniencia.

Los péptidos sintéticos se pueden enlazar para crear moléculas todavía mayores. Utilizando métodos de *ligación de péptidos* desarrollados especialmente, se pueden sintetizar proteínas de 100 o más aminoácidos de modo muy puro. Estos métodos permiten la construcción de herramientas todavía más fuertes para examinar la estructura y función de las proteínas.

3.5 La espectrometría de masas proporciona herramientas poderosas para la caracterización e identificación de proteínas

Modificaciones en la bien conocida técnica de espectrometría de masas hacen posible el determinar masas proteicas con una precisión de una unidad de masa más o menos en los casos más favorables. Esta capacidad ha abierto muchos horizontes nuevos en el estudio de proteínas. Del modo más poderoso, la masa de un péptido o una proteína se puede usar como etiqueta nominal para escoger una molécula específica en una amplia base de datos de secuencias de aminoácidos.

La masa de una proteína se puede determinar de modo preciso por espectroscopia de masas

La espectrometría de masas es una técnica para analizar formas ionizadas de moléculas en fase gaseosa. Es más fácilmente aplicable a gases o líquidos volátiles que liberan iones en fase gaseosa fácilmente. Las medidas de masa se realizan determinando con qué facilidad se acelera un ion al aplicarle un campo eléctrico. Consideremos dos iones con la misma carga global pero con diferentes masas. En un campo eléctrico determinado, la misma fuerza se aplicará a cada ion. Sin embargo, la aceleración debida a esta fuerza del ion de mayor masa será menor debido a la tercera ley de Newton, $F = ma$, donde F es la fuerza, m es la masa y a la aceleración. Por lo tanto, la medida de la aceleración producida por una fuerza conocida, nos proporciona la masa.

Dado que los péptidos y las proteínas no son volátiles, el gran reto es generar una concentración lo suficientemente alta en la fase gaseosa de proteína ionizada, pero intacta. Para resolver este problema se han desarrollado de forma extensiva dos métodos, *espectrometría de desorción-ionización en matriz inducida por láser (MALDI, "matrix-assisted laser desorption-ionization")* e *ionización por electrospray (ESI "electrospray ionization")*. En MALDI, la proteína o el péptido que se quiere estudiar se coprecipita con un compuesto orgánico que absorbe la luz láser de una longitud de onda apropiada (la "matriz"). El destello de un láser sobre la preparación expulsa moléculas de la superficie. Estas moléculas capturan electrones cuando salen de la matriz y por lo tanto la dejan como iones cargados negativamente. En ESI, las soluciones que contienen la proteína o el péptido fluyen a través de una fina punta metálica mantenida a un potencial eléctrico distinto de cero. Se liberan pequeñas gotículas cargadas eléctricamente que contienen tanto la proteína como el disolvente. El disolvente se evapora de la gotícula, lo que concentra la carga. La repulsión mutua de las moléculas cargadas de forma semejante se incrementa, e iones moleculares individuales vuelan libres. Normalmente, estos iones tienen múltiples cargas.

Después de haber generado los iones en fase gaseosa, se pueden utilizar varias aproximaciones para determinar su masa. En el análisis del *tiempo de vuelo (time of flight, TOF)*, los iones se aceleran en un campo eléctrico hacia un detector (Figura 3.40). Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, viajan más rápido y llegan primeros al detector. De este modo, se pueden analizar pequeñas cantidades de biomoléculas, desde unos pocos picomoles (pmol) hasta femtomoles (fmol). En la Figura 3.41 se enseña un espectro de masas MALDI-TOF para una mezcla de las proteínas insulina y β -lactoglobulina. Las masas determinadas por MALDI-TOF son 5733,9 y 18364

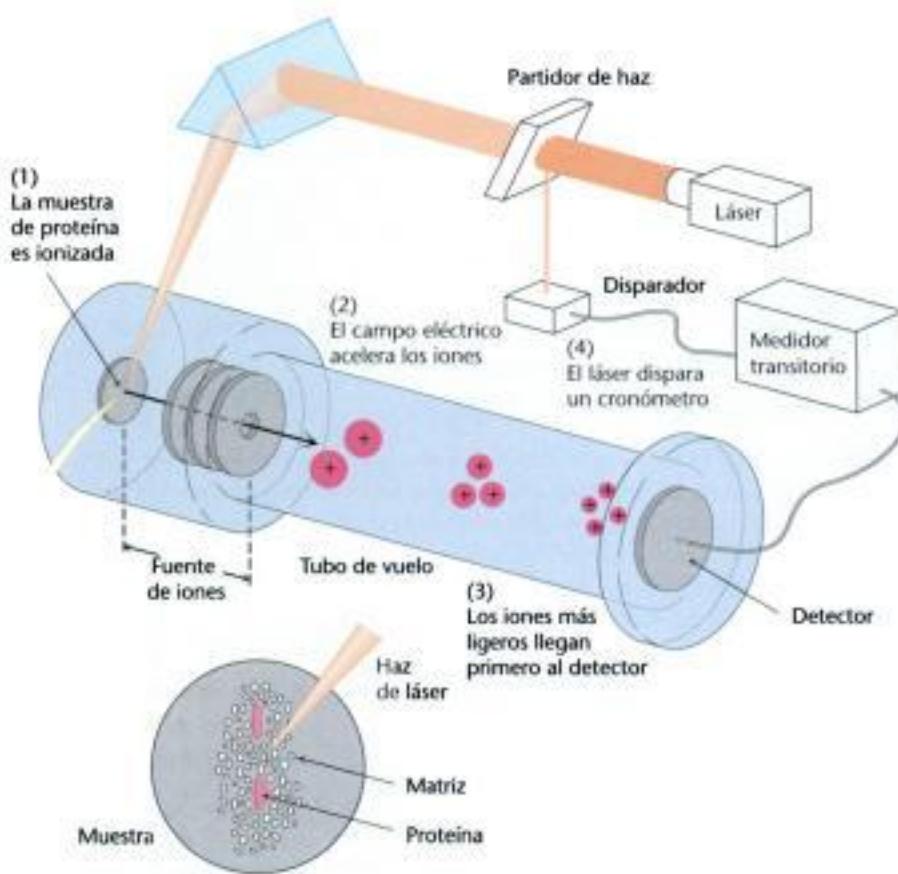


Figura 3.40 Espectrometría de masas MALDI-TOF. (1) La muestra de proteína embebida en una matriz apropiada se ioniza por aplicación de un haz de láser. (2) Un campo eléctrico acelera los iones formados a través del tubo de vuelo hacia el detector. (3) Los iones más ligeros llegan primero. (4) El pulso de láser ionizante también activa un reloj que mide el tiempo de vuelo (TOF, "time of flight") de los iones. [Tomado de J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 279.]

respectivamente, comparados con los valores calculados de 5733,5 y 18 388. MALDI-TOF es ciertamente un método preciso para determinar la masa proteica.

Los componentes individuales de grandes complejos proteicos se pueden identificar por espectrometría de masas MALDI-TOF

Aunque las masas proteicas sirven como etiquetas nominales idóneas para distinguir proteínas, la masa de una proteína determinada no es normalmente suficiente para identificarla exclusivamente entre todas las proteínas posibles dentro de una célula.

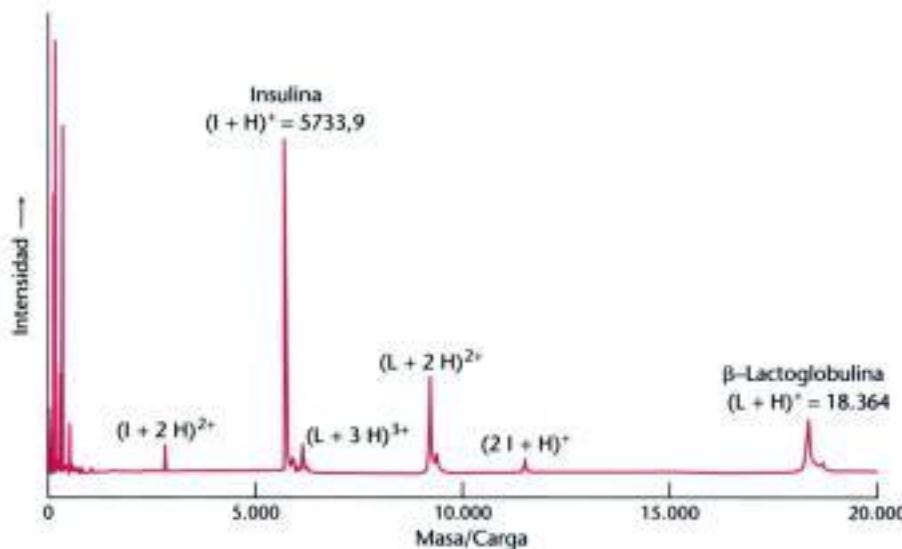


Figura 3.41 Espectro de masas MALDI-TOF de la insulina y la β -lactoglobulina. Una mezcla de 5 pmol de insulina (I) y 5 pmol de β -lactoglobulina se ionizó por MALDI, lo que produce de modo predominante iones moleculares de carga única de los péptidos y las proteínas $(I + H)^{2+}$ para la insulina y $(L + H)^{2+}$ para la lactoglobulina. Sin embargo, también se producen moléculas con múltiples cargas así como cantidades de un dímero de insulina con carga única, $(2I + H)^{2+}$. [Tomado de J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 282.]

Sin embargo, la masa de la proteína original junto con las masas de varios fragmentos proteicos producidos por un método de ruptura específico puede proporcionar una identificación única. Supongamos que queremos identificar las proteínas de un gel bidimensional tal como el descrito en la página 74. Tras la electroforesis en gel, las moléculas en las manchas individuales se pueden romper, a menudo en el propio gel matriz, usando una proteasa como la tripsina. La mezcla de fragmentos que se producen se analiza entonces por espectrometría de masas MALDI-TOF. Estas masas peptídicas se comparan con proteínas en una base de datos que se ha "escindido electrónicamente" en una simulación por ordenador igual que la técnica de fragmentación usada para la técnica experimental. De este modo, el proteoma en un tipo de célula determinada u otra muestra, se puede analizar con considerable detalle.

Como ejemplo del poder de esta aproximación proteómica, consideremos el análisis del complejo del poro nuclear de la levadura, que facilita el transporte de moléculas grandes dentro y fuera del núcleo. Este enorme complejo macromolecular se purificó intacto de células de levadura, mediante procedimientos cuidadosos. El complejo purificado se fraccionó por HPLC seguido de electroforesis en gel. Las bandas individuales del gel se aislaron, escindieron con tripsina, y analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los fragmentos producidos se compararon con las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de DNA del genoma de levadura como se muestra en la Figura 3.42. Así, se identificaron un total de 174 proteínas. De estas proteínas, se confirmó por otros métodos que 40 eran componentes del poro nuclear. Muchas de estas proteínas no se habían identificado previamente como asociadas con el poro nuclear a pesar de años de estudio. Además, los métodos de espectrometría de masas son suficientemente sensibles para detectar esencialmente todos los componentes del poro si están presentes en las muestras usadas. Así, de una forma sencilla se pudo obtener una lista completa de los componentes que constituyen este complejo macromolecular. Este tipo de análisis proteómico está creciendo en potencia conforme los métodos de espectrometría de masas y fraccionamiento bioquímico se refinan.

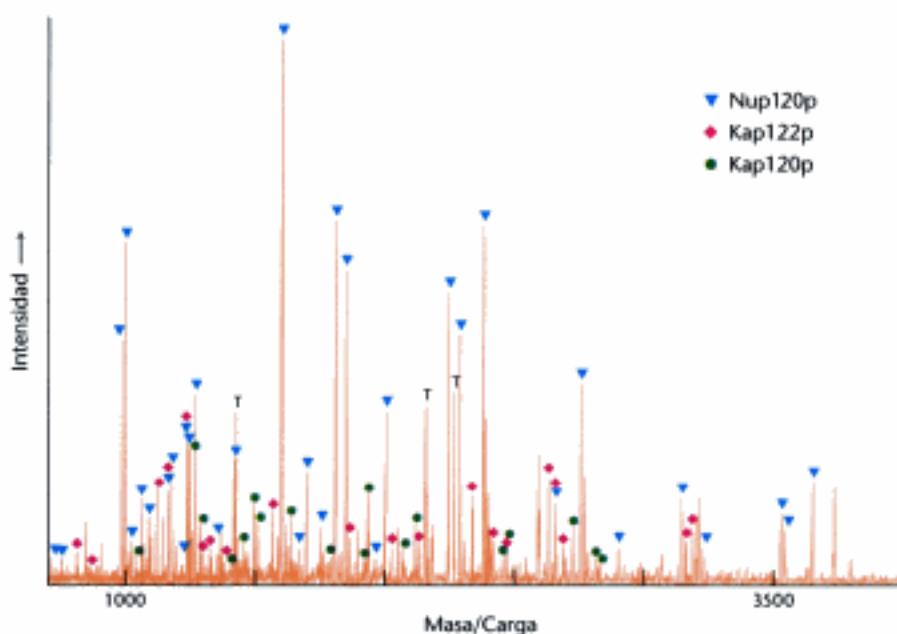


Figura 3.42 Análisis proteómico por espectrometría de masas. Este espectro de masas se obtuvo analizando una banda tratada con tripsina en un gel obtenido de una muestra de poro nuclear de levadura. Muchos de los picos coincidían con las masas predichas para los fragmentos peptídicos de tres proteínas (Nup120p, Kap122p, y Kap120p) incluidas en el genoma de la levadura. La banda corresponde a un peso molecular aparente de 100 kd. [Tomado de M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao y B.T. Chait. *J. Cell Biol.* 148(2000):635–651.]

3.6 La estructura tridimensional de las proteínas se puede determinar por cristalografía de rayos X y espectroscopía de NMR

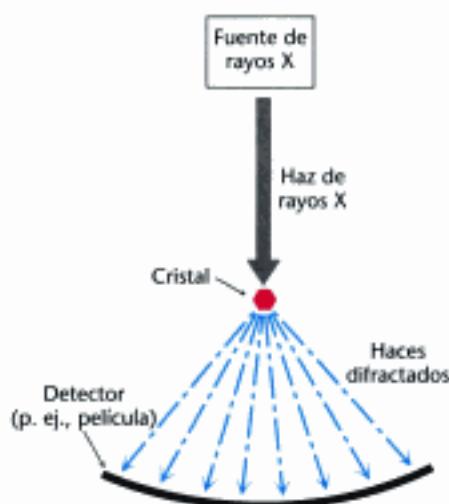


Figura 3.43 Un experimento de cristalografía de rayos X. Una fuente de rayos X genera un haz, que es difractado por un cristal. El patrón de difracción resultante se recoge en un detector.

Una cuestión crucial es: ¿cuál es la estructura tridimensional de una proteína determinada? La estructura de una proteína es crítica para determinar su función, habida cuenta que la especificidad de los centros activos y los centros de unión dependen de forma precisa de la conformación tridimensional. La cristalografía de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear son las dos técnicas más importantes para averiguar la conformación de las proteínas.

La cristalografía de rayos X proporciona la estructura tridimensional con detalle atómico

La cristalografía de rayos X fue la primera técnica que se desarrolló para determinar la estructura proteica a detalle atómico y todavía aporta la visualización más precisa de la estructura proteica que se puede conseguir hoy en día. Esta técnica puede revelar las posiciones tridimensionales exactas de la mayor parte de los átomos de una molécula de proteína. De todas las formas de radiación, los rayos X proporcionan la mejor resolución porque la longitud de onda de los rayos X es aproximadamente de la misma longitud que el enlace covalente. Los tres componentes necesarios en un análisis cristalográfico por rayos X son un *cristal de proteína*, una *fuente de rayos X* y un *detector* (Figura 3.43).

La técnica necesita una muestra con todas las moléculas de proteína orientadas de forma fija entre ellas; propiedad que tienen los cristales. Así, el primer paso es obtener cristales de la proteína de interés. La adición lenta de sulfato amónico u otra sal a una disolución concentrada de proteína, para reducir su solubilidad, favorece la formación de cristales muy ordenados: el proceso de precipitación salina comentado en la página 68. Por ejemplo, la mioglobina cristaliza en sulfato amónico 3 M. Algunas proteínas cristalizan fácilmente, mientras que otras lo hacen solo tras emplear un gran esfuerzo en obtener las condiciones propicias. Se han desarrollado métodos para el ensayo de muchas condiciones de cristalización diferentes usando cantidades relativamente pequeñas de muestra proteica. Normalmente, se deben ensayar cientos de condiciones para obtener cristales totalmente idóneos para los estudios cristalográficos. Se están cristalizando proteínas cada vez más grandes y complejas. Por ejemplo, se ha cristalizado y resuelto su estructura por rayos X del poliovirus, un conjunto de 8500 kd compuesto por 240 subunidades de proteína que rodean un núcleo de RNA. Es relevante que las proteínas cristalizan frecuentemente en su configuración biológica activa. De hecho, los cristales de enzima pueden manifestar actividad catalítica si estos cristales se bañan con sustrato.

Seguidamente, se necesita una fuente de rayos X. Un haz de rayos X de longitud de onda de 1,54 Å se produce acelerando electrones contra una pieza de cobre. El equipo capaz de generar rayos X de esta forma se encuentra en muchos laboratorios. Alternativamente, se pueden producir rayos X acelerando electrones en órbitas circulares a velocidades cercanas a la de la luz. Varias instalaciones generando esta *radiación sincrotrón* se encuentran disponibles en el mundo, como la Advanced Light Source en el laboratorio nacional de Argonne en las afueras de Chicago y la Photon Factory en la ciudad de Tsukuba, Japón. Los haces de rayos X generados por el sincrotrón son mucho más intensos que los generados por los aparatos de laboratorio y tienen otras ventajas. Cualquiera que sea la fuente de rayos X, un haz estrecho de rayos X incide en el cristal de proteína. Parte del haz atraviesa el cristal sin cambios; el resto se *dispersa* en varias direcciones. Finalmente, estos rayos X dispersados o *difractados* se detectan mediante película fotográfica, siendo el ennegrecimiento de la emulsión proporcional a la intensidad del haz de rayos X dispersado, o bien por medio de un detector electrónico de estado sólido. El patrón de dispersión proporciona una información abundante sobre

la estructura de la proteína. Los principios físicos básicos en los que se apoya esta técnica son:

1. *Los electrones dispersan los rayos X.* La amplitud de la onda dispersada por un átomo es proporcional a su número de electrones. Así, un átomo de carbono dispersa seis veces más intensamente que un átomo de hidrógeno.
2. *Las ondas dispersadas se recombinan.* Cada átomo contribuye a cada haz dispersado. Las ondas dispersadas se refuerzan una a otra en la película o en el detector si están en fase (al paso), o se anulan si están fuera de fase.
3. *La forma en que las ondas dispersadas se recombinan depende únicamente del ordenamiento atómico.*

El cristal de proteína se monta y se sitúa con una orientación precisa con respecto al haz de rayos X y a la película. Se hace girar el cristal de forma que el haz pueda incidir en él desde muchas direcciones. Este movimiento rotacional produce una fotografía de rayos X que consiste en una serie de manchas llamadas *reflexiones*. La fotografía de rayos X mostrada en la Figura 3.44 es una sección bidimensional obtenida de una serie tridimensional de 25 000 manchas. Se mide la intensidad de cada mancha. Estas *intensidades y sus posiciones* son los datos experimentales básicos para el análisis cristalográfico de rayos X. El siguiente paso es reconstruir una imagen de la proteína a partir de las intensidades observadas. En microscopía óptica o microscopía electrónica, los haces difractados se enfocan por medio de lentes para formar directamente la imagen. Sin embargo, no existen lentes apropiadas para enfocar los rayos X. En cambio, la imagen se forma aplicando una relación matemática que se conoce como transformada de Fourier. Esta operación asigna para cada mancha una onda de densidad electrónica cuya amplitud es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad observada en la mancha. Cada onda tiene también una *fase*, es decir, un ritmo de crestas y valles en relación a las otras ondas. La fase de cada onda determina si refuerza o anula las ondas provenientes de las otras manchas. Para determinar las fases correspondientes a cada mancha de difracción se deben realizar experimentos adicionales o cálculos.

El escenario está ya preparado para el cálculo del mapa de densidad electrónica, que proporciona la densidad de los electrones en un gran número de puntos espaciados regularmente en el cristal. Esta distribución tridimensional de la densidad electrónica se representa por una serie de secciones paralelas dispuestas una sobre otra. Cada sección es una hoja de plástico transparente (o, más recientemente, una capa en una imagen de ordenador) en la que la distribución de la densidad electrónica se representa por contornos (Figura 3.45) como los contornos usados en mapas geológicos para representar la altitud (Figura 3.46). El siguiente paso es interpretar el mapa de densidad electrónica. Un factor crítico es la *resolución* de los análisis de rayos X, que viene determinada por el número de intensidades dispersas usadas en la síntesis de Fourier. La fidelidad de la imagen depende de la resolución de la síntesis de Fourier, como se muestra en la analogía óptica de la Figura 3.47. Una resolución de 6 Å revela la dirección

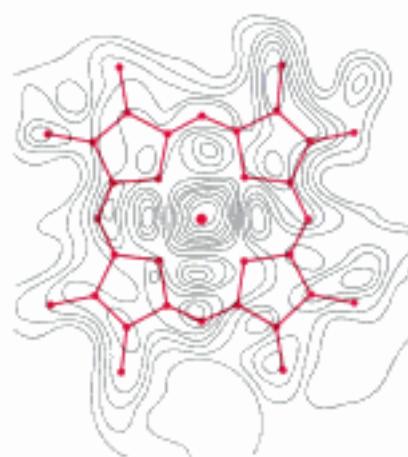


Figura 3.45 Sección del mapa de densidad electrónica de la mioglobina. Esta sección del mapa de densidad electrónica muestra el grupo hemo. El pico del centro de esta sección corresponde al átomo de hierro. [Tomado de J. C. Kendrew. The three dimensional structure of a protein molecule. Copyright © 1961 by Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

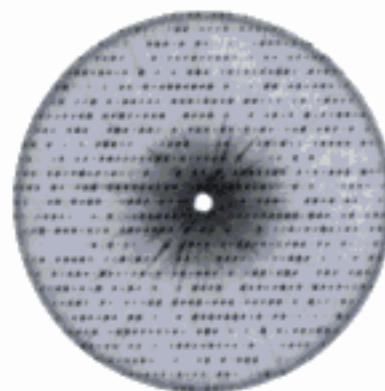


Figura 3.44 Un patrón de difracción de rayos X. Una fotografía de precesión de rayos X de un cristal de mioglobina.



Figura 3.46 Sección de un mapa del Servicio Geológico de Estados Unidos. Rectángulo correspondiente al Monte Capitolio en Colorado.

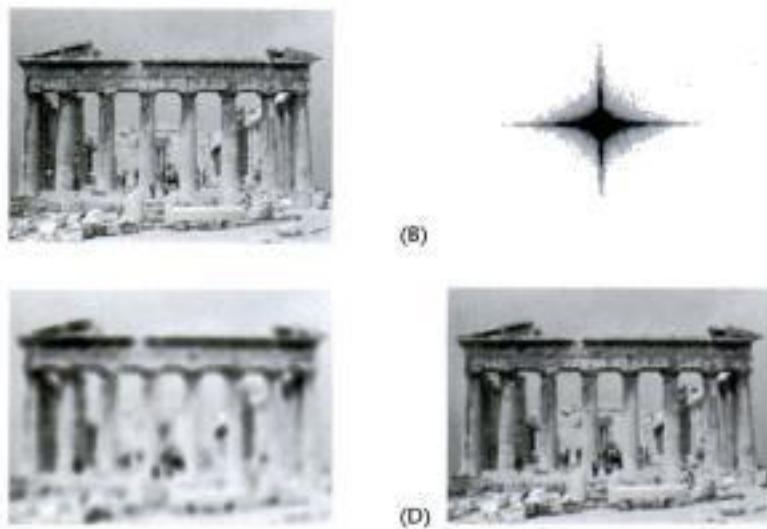


Figura 3.47 La resolución afecta a la calidad de la imagen. El efecto de la resolución sobre la calidad de una imagen reconstruida se evidencia por una analogía óptica: la difracción de rayos X: (A) Una fotografía del Partenón; (B) Un esquema de difracción óptica del Partenón; (C y D) imágenes reconstruidas del esquema de la parte B. Se usaron más datos para obtener la imagen D que la imagen C, lo que produce una mayor calidad en la imagen D. [(A) Cortesía del Dr. Thomas Steitz. (B) Cortesía del Dr. David DeRosier.]

TABLA 3.4 Núcleos de importancia biológica que dan señales de NMR

Núcleo	Abundancia natural (% en peso del elemento)
¹ H	99,984
² H	0,016
¹³ C	1,108
¹⁴ N	99,635
¹⁵ N	0,365
¹⁷ O	0,037
²³ Na	100,0
²⁵ Mg	10,05
³¹ P	100,0
³⁵ Cl	75,4
³⁹ K	93,1

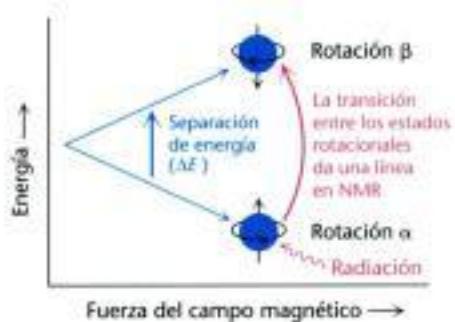


Figura 3.48 Base de la espectroscopía de NMR. Las energías de las dos orientaciones de un núcleo de rotación 1/2 (como el ³¹P y el ¹H) dependen de la fuerza del campo magnético aplicado. La absorción de radiación electromagnética de frecuencia apropiada induce una transición del nivel inferior al superior.

de la cadena polipeptídica, pero pocos detalles estructurales. La razón es que las cadenas de polipéptido se empaquetan juntas y sus centros están separados entre 5 y 10 Å. Se necesitan mapas a mayor resolución para delinear los grupos de átomos que están separados entre 2,8 y 4 Å, y los átomos individuales, que están separados entre 1,0 y 1,5 Å. La resolución máxima de un análisis de rayos X viene determinada por el grado de perfección del cristal. Para proteínas, esta resolución limitante está a menudo alrededor de 2 Å.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear puede revelar las estructuras de las proteínas en disolución

La cristalografía de rayos X es el método más poderoso para obtener la estructura de las proteínas. Sin embargo, algunas proteínas no cristalizan fácilmente. Además, aunque las estructuras presentes en las proteínas cristalizadas se ha demostrado ampliamente que representan muy cercanamente aquellas proteínas libres de las restricciones impuestas por el entorno cristalino, las estructuras en disolución pueden ser fuente de conocimientos adicionales. La *espectroscopía de resonancia magnética nuclear* (NMR) es una técnica singular porque es capaz de revelar la estructura atómica de las macromoléculas *en disolución*, suponiendo que se puedan obtener disoluciones altamente concentradas (~1 mM, o 15 mg ml⁻¹ para una proteína de 15 kd). Esta técnica se basa en el hecho de que algunos núcleos atómicos son intrínsecamente magnéticos. Sólo un número limitado de isótopos poseen esta propiedad, conocida como *spin (rotación)*. En la Tabla 3.4 se citan los isótopos más importantes en bioquímica. El ejemplo más sencillo es el núcleo de hidrógeno (¹H) que es un protón. La rotación de un protón genera un momento magnético. Cuando se aplica un campo magnético externo, este momento puede adoptar una de dos orientaciones, o estados de *spin* (llamados α y β) (Figura 3.48). La diferencia de energía entre estos estados es proporcional a la fuerza del campo magnético aplicado. El estado α tiene una energía ligeramente más baja y por ello está ligeramente más poblado (por un factor de 1,00001 en un experimento típico) porque está aliñado con el campo. Un protón en rotación en estado α puede elevarse al estado excitado (estado β) aplicando un pulso de radiación electromagnética (un pulso de radiofrecuencia, o RF), siempre y cuando la frecuencia corresponda a la diferencia de energía entre los estados α y β . En estas circunstancias, el *spin* cambiará de α a β ; en otras palabras, se obtendrá una *resonancia*. Un espectro de resonancia para una molécula se obtiene manteniendo el campo magnético constante y variando la frecuencia de la radiación electromagnética.

Estas propiedades se pueden utilizar para estudiar los entornos químicos del núcleo de hidrógeno. El flujo de electrones alrededor de un núcleo magnético genera un pequeño campo magnético local que se opone al campo aplicado. El grado de protección depende de la densidad electrónica que rodea al núcleo. Por consiguiente, núcleos en diferentes ambientes cambiarán de estado, o resonarán, a fuerzas de campo o frecuencias de radiación ligeramente distintas. Los núcleos de la muestra perturbada absorben radiación electromagnética a una frecuencia que se puede medir. Las diferentes frecuencias, conocidas como *desplazamiento químico* ("chemical shifts"), se expresan como unidades fraccionales δ (partes por millón, o ppm) relativas a los desplazamientos de un compuesto estándar, como el derivado hidrosoluble del tetrametilsilano, que se añade con la muestra. Por ejemplo, un protón de un $-\text{CH}_3$ presenta normalmente un desplazamiento químico (δ) de 1 ppm, mientras que un protón aromático tiene 7 ppm. El desplazamiento químico de la mayor parte de los protones de las proteínas está entre 0 y 9 ppm (Figura 3.49). Es posible resolver la mayor parte de los protones en muchas proteínas usando esta técnica de *NMR unidimensional*. Con esta información, se pueden deducir los cambios de un grupo químico determinado en diferentes condiciones, tales como el cambio conformacional de una proteína de una estructura desordenada a una hélice α en respuesta a un cambio de pH.

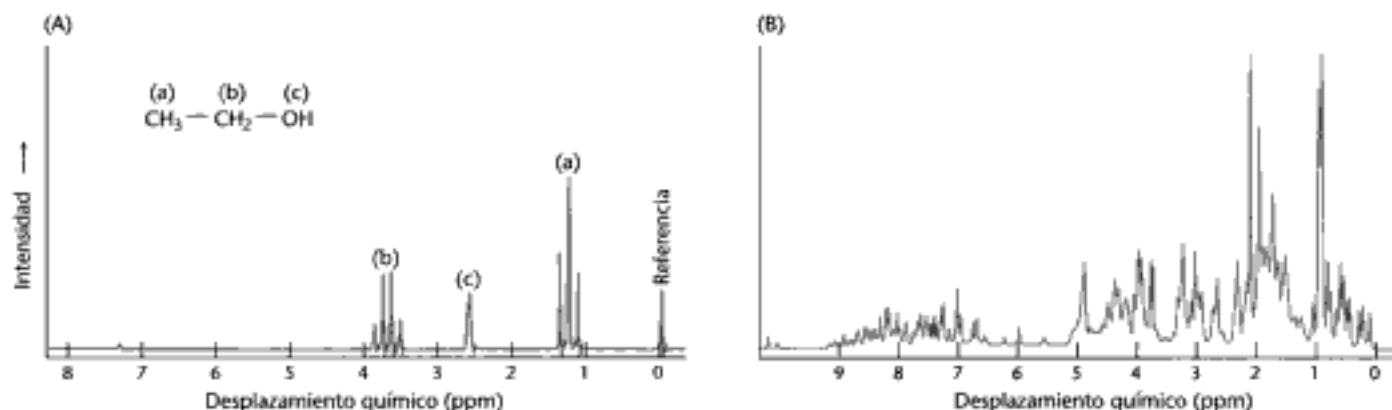


Figura 3.49 Espectro de NMR unidimensional. (A) El espectro $^1\text{H-NMR}$ del etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) muestra que los desplazamientos químicos del hidrógeno están resueltos claramente. (B) El espectro $^1\text{H-NMR}$ de un fragmento de 55 aminoácidos de una proteína que actúa en el corte del RNA muestra un mayor grado de complejidad. Hay un gran número de picos y muchos se superponen. [(A) Tomado de C. Branden y J. Tooze, *Introduction to Protein Structure* (Garland 1991), p. 280; (B) Cortesía de Barbara Amann y Wesley McDermott.]

Podemos acumular incluso más información examinando cómo las rotaciones de los diferentes protones afectan a sus vecinos. Induciendo una magnetización transitoria en una muestra por aplicación de un pulso de radiofrecuencia, es posible alterar la rotación de un núcleo y examinar el efecto producido en la rotación de otro núcleo vecino. Especialmente revelador es un *espectro bidimensional obtenido por espectroscopía de intensificación nuclear Overhauser (NOESY, "nuclear Overhauser enhancement spectroscopy")*, que muestra gráficamente pares de protones que están muy cercanos, incluso aunque no estén juntos en la estructura primaria. La base de esta técnica es el *efecto nuclear Overhauser (NOE, "nuclear Overhauser effect")*, una interacción entre núcleos que es proporcional al inverso de la sexta potencia de su distancia. La magnetización se transfiere desde un núcleo excitado a otro que no lo está si ambos están a una distancia menor de 5 Å (Figura 3.50A). En otras palabras, el efecto proporciona un medio para detectar la localización relativa de un átomo respecto a otro en la estructura tridimensional de la proteína. La diagonal de un espectro NOESY corresponde al espectro unidimensional. Los picos fuera de la diagonal proporcionan una información nueva crucial: *identifican pares de protones que*

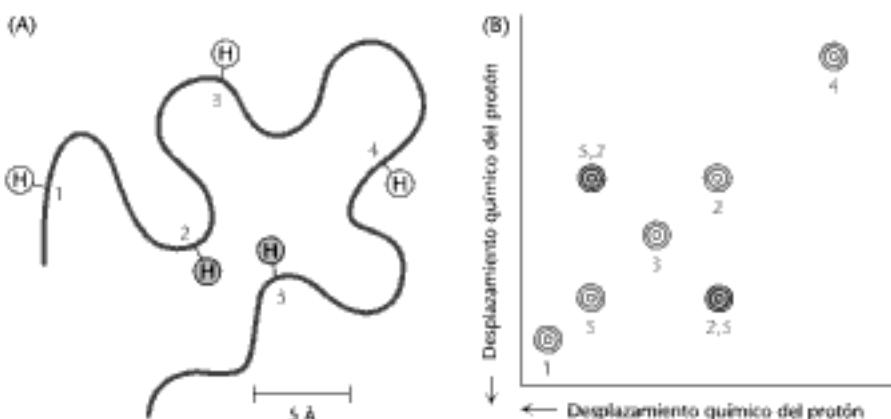


Figura 3.50 El efecto nuclear Overhauser. El efecto nuclear Overhauser (NOE) identifica pares de protones que se encuentran muy cercanos. (A) Representación esquemática de una cadena polipeptídica destacando cinco protones específicos. Los protones 2 y 5 están muy cercanos ($\sim 4 \text{ \AA}$ de distancia) mientras que otros pares están más alejados. (B) Espectro NOESY muy simplificado. La diagonal muestra cinco picos correspondientes a los cinco protones de la parte A. Los picos por encima de la diagonal y el relacionado simétricamente debajo de ella nos revelan que el protón 2 está próximo al protón 5.

están separados menos de 5 \AA (Figura 3.50B). En la Figura 3.51 se muestra un espectro bidimensional NOESY correspondiente a una proteína de 55 aminoácidos. El gran número de picos fuera de la diagonal revela distancias cortas protón–protón. La estructura tridimensional de una proteína se puede reconstruir usando estas relaciones de proximidad. Las estructuras se calculan en base a que los protones que deben estar separados por menos de 5 \AA empleando los espectros NOESY están cercanos en la estructura tridimensional (Figura 3.52). Si se aplica un número suficiente de restricciones en las distancias, la estructura tridimensional se puede determinar de forma prácticamente única. Hay tres razones por las que se generan una familia de

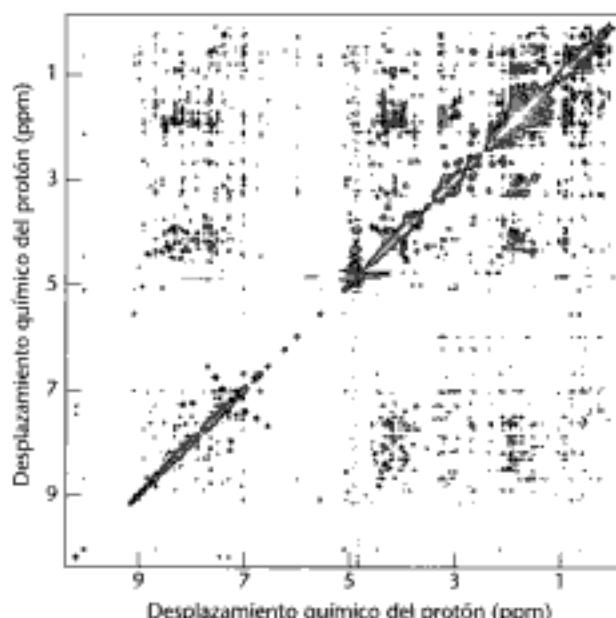


Figura 3.51 Detección de distancias cortas protón–protón. Espectro NOESY para un dominio de 55 aminoácidos de una proteína que juega un papel en el corte del RNA. Cada pico fuera de la diagonal corresponde a una separación corta protón–protón. Este espectro manifiesta cientos de estas distancias cortas protón–protón, lo que se puede utilizar para la determinación de la estructura tridimensional de este dominio. [Cortesía de Barbara Arman y Wesley McDermott.]

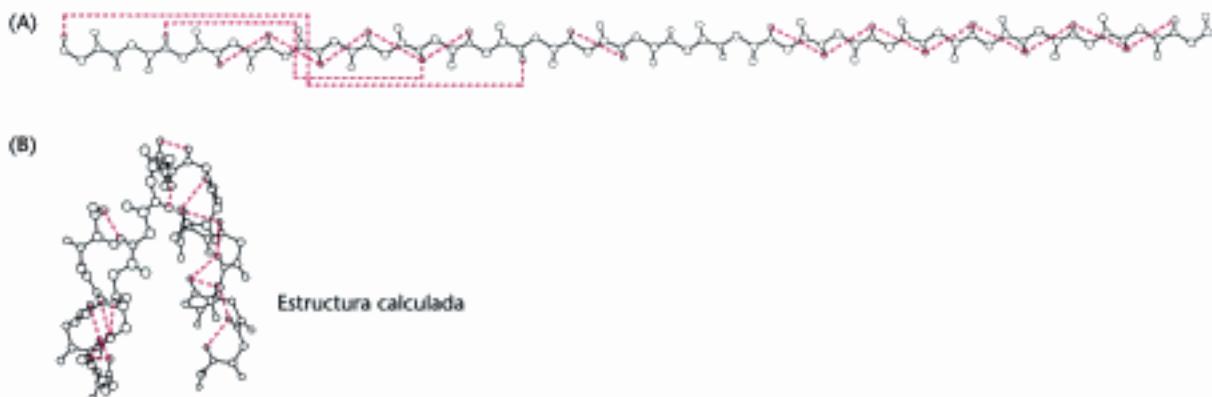


Figura 3.52 Estructuras calculadas en base a restricciones de la NMR. (A) Las observaciones NOESY muestran que los protones (conectados por líneas rojas discontinuas) están cercanos en el espacio. (B) Una estructura tridimensional calculada con la restricción de que esos pares de protones tienen que estar próximos.

estructuras relacionadas (Figura 3.53). Primero, no se pueden obtener experimentalmente suficientes restricciones para precisar completamente la estructura. Segundo, las distancias obtenidas por análisis del espectro NOESY son sólo aproximadas. Por último, las observaciones experimentales no se hacen en moléculas sencillas, sino en un gran número de moléculas en disolución que pueden tener estructuras ligeramente diferentes en un momento dado. Por ello, la familia de estructuras generadas en un análisis de estructura por NMR indica la gama de conformaciones de la proteína en disolución. Actualmente, la espectroscopía NMR puede determinar solamente las estructuras de proteínas relativamente pequeñas (<40 kd), pero es seguro que su poder de resolución va a aumentar. El poder del NMR se ha potenciado notablemente por la posibilidad de producir, usando la tecnología del DNA recombinante (Capítulo 5), proteínas marcadas uniformemente con ^{13}C , ^{15}N y ^2H en sitios específicos.

A mediados de 2005 ya se habían resuelto más de 30 000 estructuras proteicas por cristalografía de rayos X y espectroscopía NMR, y cada día se determinan varias estructuras nuevas. Las coordenadas se recogen en el banco de datos de proteínas (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) donde las estructuras están accesibles para su visualización y análisis. El conocimiento de la arquitectura molecular detallada de las proteínas ha permitido ver cómo las proteínas reconocen y se unen a otras moléculas, cómo funcionan como enzimas, cómo se pliegan y cómo evolucionan. Esta cosecha extraordinariamente rica está prosiguiendo a pasos agigantados y está influyendo sobremanera en el mundo entero de la bioquímica así como otras ciencias biológicas y físicas.



Figura 3.53 Una familia de estructuras. Una serie de 25 estructuras para un dominio de dedo de zinc de 28 aminoácidos de una proteína que se une a DNA. La línea roja traza el camino medio del esqueleto de la proteína. Cada una de estas estructuras es consecuente con cientos de restricciones derivadas de los experimentos de NMR. Las diferencias entre las estructuras individuales se deben a la combinación de imperfecciones en los datos experimentales y la naturaleza dinámica de las proteínas en disolución. [Cortesía de Barbara Ammann.]

Resumen

El progreso rápido en la secuenciación génica ha propiciado otro de los éxitos de la bioquímica: el conocimiento del proteoma. El proteoma es el conjunto completo de proteínas expresadas e incluye información sobre cómo se modifican, cómo funcionan y cómo interactúan con otras moléculas.

3.1 La purificación de proteínas es un primer paso esencial para el conocimiento de su función

Se pueden separar las proteínas entre ellas y de otras moléculas en base a características como solubilidad, tamaño, carga y afinidad de unión. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida separa las cadenas de polipéptido de las proteínas en condiciones desnaturalizantes principalmente de acuerdo con su masa. Las proteínas también se pueden separar electroforéticamente en base a su carga neta por isoelectrofoque en gradiente de pH. La ultracentrifugación y

la cromatografía de filtración en gel separan las proteínas de acuerdo con su tamaño, mientras que la cromatografía de intercambio iónico las separa principalmente en base a su carga neta. La alta afinidad de muchas proteínas por grupos químicos específicos se utiliza en la cromatografía de afinidad, en la que las proteínas se unen a columnas que contienen bolitas que llevan unidos covalentemente, sustratos, inhibidores u otros grupos reconocidos específicamente. La masa de una proteína se puede determinar de forma precisa por medidas de sedimentación en el equilibrio.

3.2 Las secuencias de aminoácidos se pueden determinar por degradación de Edman automatizada

La composición en aminoácidos de una proteína se puede averiguar hidrolizando la proteína hasta sus aminoácidos constitutivos en HCl 6 M a 110 °C. Los aminoácidos se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico y se determinan con ninhidrina o fluoroescamina. Las secuencias de aminoácidos se pueden averiguar mediante la degradación de Edman, que libera uno a uno los aminoácidos, secuencialmente desde el extremo amino terminal del péptido. El fenilisotiocianato reacciona con los grupos amino terminales formando un derivado de feniltiocarbamilo, que se cicla en condiciones ligeramente ácidas para dar un fenilhidantoino-aminoácido y un péptido acortado en un residuo. La repetición de degradaciones de Edman en un secuenciador puede analizar secuencias de aproximadamente 50 residuos. Las cadenas polipeptídicas más largas se fraccionan en más cortas para su análisis rompiéndolas específicamente con reactivos como el bromuro de cianógeno, que escinde enlaces peptídicos en el lado carboxílico de residuos de metionina. Los enzimas, como la tripsina, que corta en el lado carboxílico de los residuos de lisina y arginina, también son muy útiles para cortar las proteínas. Las secuencias de aminoácidos contienen una información rica con respecto al parentesco de las proteínas, sus relaciones evolutivas, y las enfermedades producidas por las mutaciones. El conocimiento de la secuencia aporta claves valiosas sobre la estructura y función de la proteína.

3.3 La inmunología proporciona técnicas importantes para la investigación en proteínas

Se pueden detectar y cuantificar proteínas mediante anticuerpos altamente específicos; los anticuerpos monoclonales son especialmente útiles porque son homogéneos. Los ensayos de inmunoabsorción unida a enzimas y la transferencia Western de geles de SDS-poliacrilamida se usan con regularidad. También se pueden localizar las proteínas dentro de las células mediante la microscopía de immunofluorescencia y microscopía inmunoelectrónica.

3.4 Los péptidos se pueden sintetizar por métodos automatizados en fase sólida

Las cadenas de polipéptidos se pueden sintetizar por métodos en fase sólida automatizados en los que el extremo carboxílico de la cadena creciente se une a un soporte insoluble. El grupo carboxilo del aminoácido entrante se activa con díci-clohexilcarbodiimida y se une al grupo amino de la cadena creciente. Los péptidos sintéticos pueden servir como fármacos y como antígenos para estimular la formación de anticuerpos específicos. También pueden ser fuente de conocimiento de las relaciones entre la secuencia de aminoácidos y su conformación.

3.5 La espectrometría de masas proporciona herramientas poderosas para la caracterización e identificación de proteínas

Técnicas como la espectrometría de desorción-ionización en matriz inducida por láser (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI) permiten la generación de iones de proteínas y péptidos en fase gaseosa. La masa de estos iones de proteína se puede determinar con gran exactitud y precisión. Las masas determinadas por estas técnicas actúan como etiquetas nominales de las proteínas debido a que

la masa de la proteína está determinada de modo preciso por su composición en aminoácidos y, por lo tanto, por su secuencia. Las técnicas de espectrometría de masas son fundamentales en la proteómica porque hacen posible analizar los constituyentes de los grandes complejos macromoleculares u otras muchas proteínas.

3.6 La estructura tridimensional de las proteínas se puede determinar por cristalografía de rayos X y espectroscopia de NMR

La cristalografía de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear han enriquecido sobremanera nuestro conocimiento de cómo las proteínas se pliegan, reconocen a otras moléculas y catalizan reacciones químicas. La cristalografía de rayos X es posible porque los electrones dispersan los rayos X. El patrón de difracción que se produce se puede analizar para revelar el orden de los átomos en una proteína. Actualmente se conoce la estructura tridimensional de decenas de miles de proteínas a detalle atómico. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear revela la estructura y dinámica de las proteínas en disolución. El desplazamiento químico de los núcleos depende de su entorno local. Además, las rotaciones de los núcleos vecinos interactúan entre sí de modo que proporcionan información estructural concluyente. Esta información puede utilizarse para la determinación completa de las estructuras tridimensionales de las proteínas.

Términos clave

proteoma (p. 66)	coeficiente de sedimentación (unidades Svedberg, S) (p. 76)	transferencia Western (p. 88)
ensayo (p. 67)	degradación de Edman (p. 79)	microscopía de fluorescencia (p. 89)
homogenado (p. 67)	fenilisotiocianato (p. 79)	proteína verde fluorescente (GFP) (p. 89)
precipitación salina (p. 68)	bromuro de cianógeno (CNBr) (p. 80)	método en fase sólida (p. 90)
dialisis (p. 69)	péptidos solapados (p. 81)	espectrometría de desorción-ionización en matriz inducida por láser-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (p. 93)
cromatografía de filtración en gel (p. 69)	electroforesis en diagonal (p. 82)	ionización por electrospray (ESI) (p. 93)
cromatografía de intercambio iónico (p. 70)	anticuerpo (p. 84)	tiempo de vuelo (TOF) (p. 93)
cromatografía de afinidad (p. 70)	antígeno (p. 84)	cristalografía de rayos X (p. 96)
cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (p. 71)	determinante antigénico (epítopo) (p. 84)	transformada de Fourier (p. 97)
electroforesis en gel (p. 71)	anticuerpos monoclonales (p. 85)	espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (p. 98)
punto isoeléctrico (p. 73)	ensayo de inmunoabsorción unido a enzima (ELISA) (p. 87)	
isoelectrofoque (p. 73)		
electroforesis bidimensional (p. 74)		

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Hunkapiller, M. W. y Hood, L. E., 1983. Protein sequence analysis: Automated microsequencing. *Science* 219:650-659.
 Merrifield, B., 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232:341-347.
 Sanger, F., 1988. Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1-28.
 Milstein, C., 1980. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4):66-74.
 Moore, S. y Stein, W. H., 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease. *Science* 180:458-464.

Libros

- Creighton, T. E., 1993. *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.
 Kyse, J., 1994. *Structure in Protein Chemistry*. Garland.
 Van Holde, K. E., Johnson, W. C. y Ho, P.-S., 1998. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall.
Methods in Enzymology. Academic Press.

- Wilson, K. y Walker, J. (Eds.), 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry* (5th ed.). Cambridge University Press.
 Cantor, C. R. y Schimmel, P. R., 1980. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company.
 Johnstone, R. A. W., 1996. *Mass Spectroscopy for Chemists and Biochemists* (2d ed.). Cambridge University Press.
 Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D. y Hochstrasser, D. F., 1997. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (Principles and Practice)*. Springer Verlag

Purificación y análisis de proteínas

- Deutscher, M. (Ed.), 1997. *Guide to Protein Purification*. Academic Press.
 Scopes, R. K. y Cantor, C., 1994. *Protein Purification: Principles and Practice* (3d ed.). Springer Verlag.
 Dunn, M. J., 1997. Quantitative two-dimensional gel electrophoresis: From proteins to proteomes. *Biochem. Soc. Trans.* 25:248-254.

- Aebersold, R., Pipes, G. D., Wettenhall, R. E., Nika, H. y Hood, L. E., 1990. Covalent attachment of peptides for high sensitivity solid-phase sequence analysis. *Anal. Biochem.* 187:56–65.
- Blackstock, W. P. y Weir, M. P., 1999. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17:121–127.
- Dutt, M. J. y Lee, K. H., 2000. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:176–179.
- Pandey, A. y Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837–846.

Ultracentrifugación y espectrometría de masas

- Schuster, T. M. y Laue, T. M., 1994. *Modern Analytical Ultracentrifugation*. Springer Verlag.
- Amott, D., Shabanowitz, J. y Hunt, D. F., 1993. Mass spectrometry of proteins and peptides: Sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. *Clin. Chem.* 39:2005–2010.
- Chait, B. T. y Kent, S. B. H., 1992. Weighing naked proteins: Practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257:1885–1894.
- Jardine, I., 1990. Molecular weight analysis of proteins. *Methods Enzymol.* 193:441–455.
- Edmonds, C. G., Loo, J. A., Loo, R. R., Udseth, H. R., Barinaga, C. J. y Smith, R. D., 1991. Application of electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry in combination with capillary electrophoresis for biochemical investigations. *Biochem. Soc. Trans.* 19:943–947.
- Li, L., Garden, R. W. y Sweedler, J. V., 2000. Single-cell MALDI: A new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 18:5–160.
- Pappin, D. J., 1997. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 64:165–173.
- Yates, J. R., 3rd, 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* 33:1–19.

Proteómica

- Yates, J. R., 3rd, 2004. Mass spectral analysis in proteomics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 297–316.
- Weston, A. D. y Hood, L., 2004. Systems biology, proteomics, and the future of health care: Toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J. Proteome Res.* 3: 179–196.
- Pandey, A. y Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837–846.
- Dutt, M. J. y Lee, K. H., 2000. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 176–179.

Problemas

- 1. Reactivos valiosos.** Los siguientes reactivos se utilizan habitualmente en química de proteínas:

CNBr	Tripsina	Ninhidrina
Urea	Ácido perfórmico	Fenilisotiocianato
Mercaptoetanol	HCl 6 N	Quimotripsina

¿Cuál es el más adecuado para cumplir con cada una de las siguientes funciones?

- Determinación de la secuencia de aminoácidos de un péptido pequeño.
- Desnaturalización reversible de una proteína desprovista de puentes disulfuro. ¿Qué reactivo adicional se necesitaría si hubiese puentes disulfuro?
- Hidrólisis de enlaces peptídicos en el extremo carboxílico de residuos aromáticos.
- Ruptura de enlaces peptídicos en el extremo carboxílico de la metionina.

- Routh, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertnes, K., Zhan, Y. y Chait, B. T., 2000. The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148:635–651.

Cristalografía de rayos X y espectroscopia

- Glusker, J. P., 1994. X-ray crystallography of proteins. *Methods Biochem. Anal.* 37:1–72.
- Moffat, K., 2003. The frontiers of time-resolved macromolecular crystallography: Movies and chirped X-ray pulses. *Faraday Discuss.* 122: 65–88.
- Bax, A., 2003. Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics. *Protein Sci.* 12: 1–16.
- Wery, J. P. y Scheitz, R. W., 1997. New trends in macromolecular x-ray crystallography. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:365–369.
- Wüthrich, K., 1989. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45–50.
- Clore, G. M. y Gronenborn, A. M., 1991. Structures of larger proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252:1390–1399.
- Wüthrich, K., 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley-Interscience.

Anticuerpos monoclonales y moléculas fluorescentes

- Köhler, G. y Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497.
- Goding, J. W., 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press.
- Immunology Today, 2000. Volume 21, issue 8.
- Tsien, R. Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–544.
- Kendall, J. M. y Badminton, M. N., 1998. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting era. *Trends Biotechnol.* 16:216–234.

Síntesis química de proteínas

- Bang, D., Chopra, N. y Kent, S. B., 2004. Total chemical synthesis of crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1377–1383.
- Dawson, P. E. y Kent, S. B., 2000. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 923–960.
- Mayo, K. H., 2000. Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: For the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* 18:212–217.

(c) Hidrólisis de enlaces peptídicos en el extremo carboxílico de residuos de arginina y lisina.

2. *En busca de un extremo.* La hidrazina anhidra ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$) se ha utilizado para romper los enlaces peptídicos en las proteínas. ¿Cuáles son los productos de la reacción? ¿Cómo podría utilizarse esta técnica para identificar el aminoácido carboxilo terminal?

3. *Un nuevo sitio de ruptura.* La etilenimina reacciona con las cadenas laterales de cisteína en las proteínas para formar 5-aminoetildervados. Los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de estas cisteínas modificadas son susceptibles de hidrólisis por tripsina. ¿Por qué?

4. *Espectrometría.* La absorbancia A de una disolución se define como

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I de la transmitida. La absorbancia está relacionada con el coeficiente de absorción molar

(coeficiente de extinción) e (en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), la concentración c (en M) y el paso óptico l (en cm) por la expresión

$$A = e l c$$

El coeficiente de absorción de la mioglobina a 580 nm es 15 000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. ¿Cuál es la absorbancia de una disolución de 1 mg mL^{-1} con un paso de 1 cm? ¿Qué porcentaje de la luz incidente se transmitirá en esta disolución?

5. *Movimiento lento.* La tropomiosina, una proteína muscular de 70 kd, sedimenta más lentamente que la hemoglobina (65 kd). Sus coeficientes de sedimentación respectivos son 2,6S y 4,31S. ¿Cuál es la característica estructural responsable de la lentitud de la tropomiosina en la sedimentación?

6. *Esfinges que sedimentan.* ¿Cuál es la dependencia entre el coeficiente de sedimentación S de una proteína esférica y su masa? ¿Cuánto más rápidamente sedimentará una proteína de 80 kd que una de 40 kd?

7. *Determinación del tamaño.* Las movilidades electroforéticas relativas de una proteína de 30 kd y una de 92 kd utilizadas como estándar en un gel de SDS-poliacrilamida son respectivamente 0,80 y 0,41. ¿Cuál es la masa aparente de una proteína que tiene una movilidad de 0,62 en este gel?

8. *¿Una asociación nueva?* El gen que codifica una proteína que tiene un único puente disulfuro experimenta una mutación que sustituye un residuo de serina por uno de cistéfina. Se quiere comprobar si el apareamiento de sulfhidrilos en este mutante es el mismo que en la proteína original. Proponer un experimento que resuelva esta cuestión.

9. *Clasificación de células.* La clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) es una técnica eficaz para separar células de acuerdo con su contenido en moléculas determinadas. Por ejemplo, un anticuerpo específico marcado fluorescentemente para una proteína de la superficie celular se puede utilizar para detectar células que contengan dicha molécula. Supongamos que se quiere aislar células que poseen un receptor que les permite detectar productos de degradación bacteriana. Sin embargo, no se dispone todavía de un anticuerpo contra este receptor. ¿Qué molécula marcada fluorescente prepararíamos para identificar estas células?

10. *Escoger la columna.* (a) El octapéptido AVGWRVKS se digirió con tripsina. ¿Sería el intercambio iónico o la exclusión molecular la técnica más apropiada para separar estos productos? Explicarlo. (b) Supongamos que el péptido se digiere con quimotripsina. ¿Cuál sería la técnica de separación óptima? Explicarlo.

11. *¿Sintetizar más enzima?* Durante la purificación de un enzima, un investigador realiza un paso de purificación que produce un *incremento* en la actividad total dando un valor mayor que el que está presente en el extracto crudo. Explicar cómo se puede incrementar la cantidad de actividad total.

12. *Divide y vencerás.* La determinación de la masa de una proteína por espectrometría de masas no permite a menudo su identificación completa entre todas las proteínas posibles de un proteoma completo, pero la determinación de las masas de todos los fragmentos que se producen tras digestión con tripsina casi siempre nos conduce a una identificación única. Explicarlo.

13. *Problema de purificación de proteínas.* Completar la tabla:

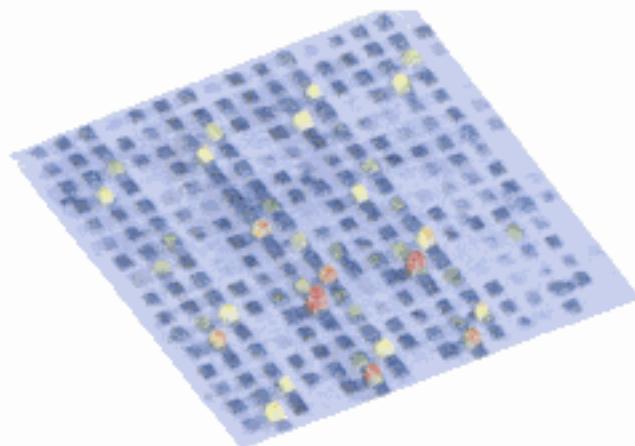
Procedimiento de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (unidades mg^{-1})	Nivel de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	20 000	4 000 000		1	100
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5000	3 000 000			
Cromatografía DEAE-cellulosa	1500	1 000 000			
Cromatografía de exclusión molecular	500	750 000			
Cromatografía de afinidad	45	675 000			

Problemas de integración del capítulo

14. *Estructura cuaternaria.* Una proteína se purificó hasta homogeneidad. La determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular dio 60 kd. La cromatografía en presencia de urea 6 M da un valor de 30 kd. Cuando se repite la cromatografía en presencia de urea 6 M y β -mercaptoetanol 10 mM, aparece una especie molecular única de 15 kd. Describir la estructura de la molécula.

15. *Transiciones hélice-ovillo.* (a) Las medidas de NMR han mostrado que la poli-L-lisina es un ovillo estadístico a pH 7, pero se transforma en hélice o cuando el pH se eleva por encima de 10. Explicar esta transición conformacional dependiente del pH. (b) Predecir la dependencia del pH en la transición hélice-ovillo del poli-L-glutamato.

16. *Péptidos en un chip.* Se pueden sintetizar un gran número de péptidos diferentes en una pequeña área sobre un soporte sólido. Este ordenamiento de alta densidad se puede ensayar con una proteína marcada fluorescente para averiguar qué péptidos se reconocen. En la figura de la página 105 se muestra la unión de un anticuerpo a un



Barido fluorescente de una serie de 1024 péptidos en un área de $1,6 \text{ cm}^2$. Cada lugar de síntesis es un cuadrado de $400 \mu\text{m}$. Se añade un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia a la serie para identificar los péptidos que son reconocidos. La altura y el color de cada cuadrado indican la intensidad de la fluorescencia. [Tomado de S. P. A. Fodor, J. O. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu y D. Solas. *Science* 251 (1991):767.]

ordenamiento de 1.024 péptidos diferentes que ocupan una superficie similar a la de una uña. ¿Cómo sintetizariamos tal ordenamiento peptídico? [Sugerencia: Utilizar luz en vez de ácido para desproteger el grupo amino terminal en cada ciclo de síntesis.]

Problemas de interpretación de datos

17. *Secuenciación de proteínas I.* Determinar la secuencia de un hexapéptido en base a los siguientes datos. Nota: Cuando no se conoce la secuencia, los aminoácidos se separan con una coma (Tabla 3.3).

Composición de aminoácidos: (2R, A, S, V, Y)

Análisis N-terminal del hexapéptido: A

Digestión por tripsina: (R, A, V) y (R, S, Y)

Digestión por carboxipeptidasa: No hay digestión.

Digestión por quimotripsina: (A, R, V, Y) y (R, S)

18. *Secuenciación de proteínas II.* Determinar la secuencia de un péptido de 14 aminoácidos en base a los siguientes datos.

Composición de aminoácidos (4S, 2L, F, G, I, K, M, T, W, Y)

Ánálisis N-terminal: S

Digestión por carboxipeptidasa: L

Digestión por tripsina: (3S, 2L, F, I, M, T, W) (G, K, S, Y)

Digestión por quimotripsina: (F, I, S) (G, K, L) (L, S) (M, T) (S, W) (S, Y)

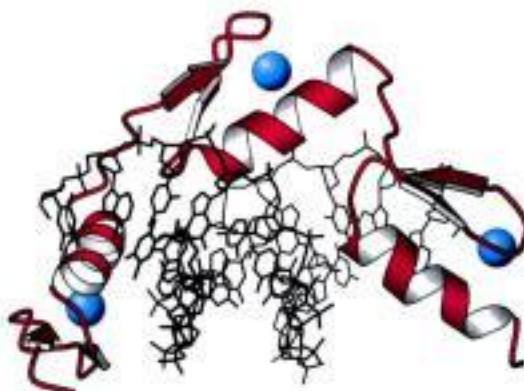
Ánálisis N-terminal del péptido (F, I, S): S

Tratamiento con bromuro de cianógeno: (2S, F, G, I, K, L, M*, T, Y) (2S, L, W)

M*, metionina detectada como homoserina

19. *Degradoación de Edman.* La amida de alanina se trató con fenilisotiocianato para formar PTH-alanina. Escribir un mecanismo para esta reacción.

DNA, RNA y el flujo de la información genética



La posesión de genes en común justifica el parecido de una madre con sus hijas. Los genes deben expresarse para ejercer un efecto y las proteínas regulan esa expresión. Una de tales proteínas reguladoras, una proteína de dedo de zinc (el ion zinc se muestra en azul, la proteína en rojo), se muestra unida a una región control o promotora del DNA (en negro). [[(Izquierda) Barnaby Hall/Photonica. (Derecha) Tomado de 1AAY.pdb.]

El DNA y el RNA son polímeros lineales largos, llamados ácidos nucleicos, que contienen información de tal forma que puede ser transmitida de una generación a la siguiente. Estas macromoléculas están formadas por un gran número de nucleótidos unidos, cada uno de ellos compuesto por un azúcar, un grupo fosfato y una base. Los azúcares se unen a través de los grupos fosfato y forman un eje (o esqueleto) común, mientras que la *información genética* está almacenada en la secuencia de las bases dispuestas a lo largo de una cadena de ácido nucleico. La molécula de DNA adopta la forma de *doble hélice*, una estructura helicoidal constituida por dos hebras complementarias de ácidos nucleicos. *En la replicación del DNA cada una de las hebras sirve de molde para la otra.* Los genes de todas las células y de muchos virus están hechos de DNA. Sin embargo, algunos virus utilizan el RNA como material genético.

Los genes especifican los tipos de proteínas que fabrican las células, pero el DNA no es el molde directo para la síntesis de proteínas. Lo que sucede es que una hebra del DNA se copia en una clase de moléculas de RNA llamadas *RNA mensajero* (mRNA) que son las intermediarias portadoras de información en la síntesis de proteínas. Este proceso de *transcripción* se continúa con la *traducción*, es decir, la síntesis de proteínas de acuerdo con las instrucciones transmitidas por el mRNA molde. Así pues, el flujo de la información genética, o *expresión génica*, en células normales es:



Contenido

- 4.1 Un ácido nucleico está formado por cuatro tipos de bases unidas a un eje de azúcar-fosfato
- 4.2 Una pareja de cadenas de ácido nucleico con secuencias complementarias puede formar una estructura de doble hélice
- 4.3 Las polimerasas replican el DNA a partir de las instrucciones de moldes
- 4.4 La expresión génica es la transformación de la información del DNA en moléculas funcionales
- 4.5 Los aminoácidos se codifican por grupos de tres bases comenzando desde un punto fijo
- 4.6 La mayoría de los genes de eucariotas son mosaicos de intrones y exones

Este flujo de información depende del código genético, que define la relación entre la secuencia de bases del DNA (o de su transcripto, el mRNA) y la secuencia de aminoácidos de una proteína. El código es prácticamente el mismo para todos los organismos: una secuencia de tres bases, llamada *codón*, especifica a un aminoácido. Existe otra etapa entre la transcripción y la traducción en la expresión de la mayoría de los genes de los eucariotas que son mosaicos de secuencias de ácidos nucleicos denominados *intrones* y *exones*. Ambos se transcriben, pero los intrones se cortan y eliminan de las moléculas de RNA recién sintetizadas, dejando a las moléculas de RNA maduro formadas por exones contiguos. La existencia de intrones y exones tiene implicaciones cruciales en la evolución de las proteínas.

4.1 Un ácido nucleico está formado por cuatro tipos de bases unidas a un eje de azúcar-fosfato

Los ácidos nucleicos DNA y RNA son muy apropiados para funcionar como portadores de información genética en virtud de sus estructuras covalentes. Estas macromoléculas son *polímeros lineales* construidos a partir de unidades similares conectadas por los extremos (Figura 4.1). Cada unidad monomérica del polímero contiene tres componentes: un azúcar, un grupo fosfato y una de las cuatro bases. La secuencia de bases caracteriza exclusivamente un ácido nucleico y representa una forma de información lineal.

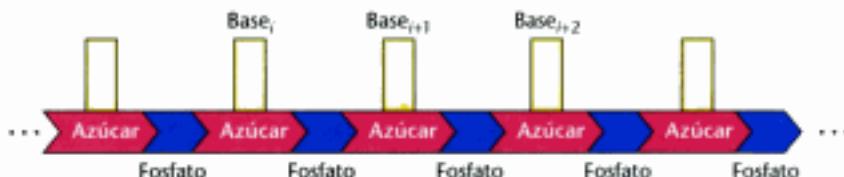


Figura 4.1 Estructura polimérica de los ácidos nucleicos.

El RNA y el DNA difieren en un azúcar componente y en una de las bases

La *desoxirribosa* es el azúcar del *ácido desoxirribonucleico (DNA)*. El prefijo desoxi indica que el átomo de carbono 2' del azúcar carece del átomo de oxígeno que si está unido al átomo de carbono 2' de la *ribosa* como muestra la Figura 4.2. Nótese que los carbonos de los azúcares aparecen señalados con "primas" para diferenciarlos de los átomos de las bases. Los azúcares de los ácidos nucleicos están unidos por puentes fosfodiéster. Concretamente, el grupo 3'-hidroxilo del componente de azúcar de un nucleótido se esterifica a un grupo fosfato, que, a su vez, se une al grupo

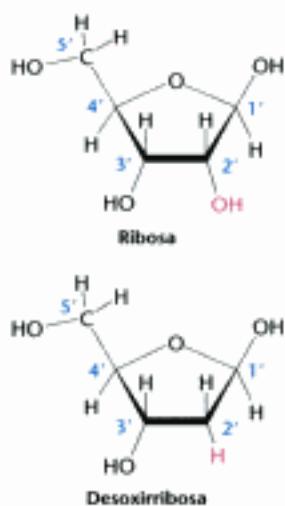


Figura 4.2 Ribosa y desoxirribosa. Los átomos están numerados con primas para diferenciarlos de los átomos de las bases (ver Figura 4.4).

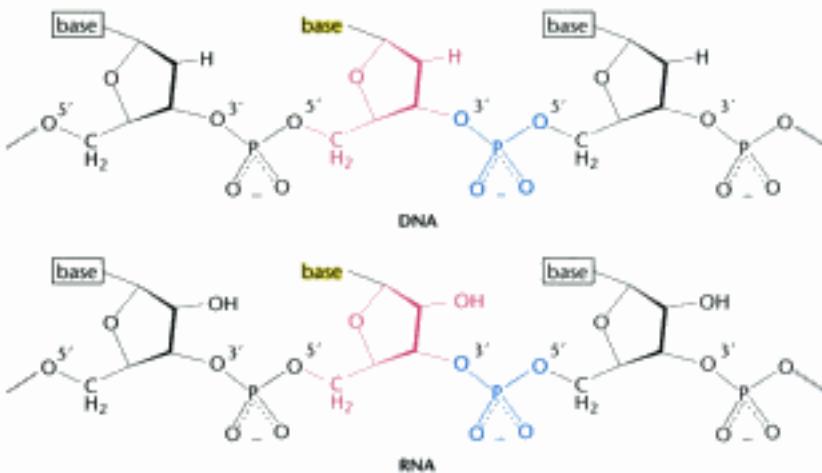


Figura 4.3 Ejes del DNA y RNA. Los ejes de estos ácidos nucleicos están formados por uniones fosfodiéster de 3' a 5'. Una unidad de azúcar está resaltada en rojo y un grupo fosfato en azul.

5'-hidroxilo del azúcar adyacente. La cadena de azúcares unidos por puentes fosfodiéster es conocida como el *eje* (*o esqueleto*) del ácido nucleico (Figura 4.3). Mientras que el eje es constante tanto en el DNA como en el RNA, las bases varían de un monómero al siguiente. Dos de las bases son derivados de la *purina* (adenina (A) y guanina (G)) y dos de la *pirimidina* (citosina (C) y timina (T)) como se muestra en la Figura 4.4.

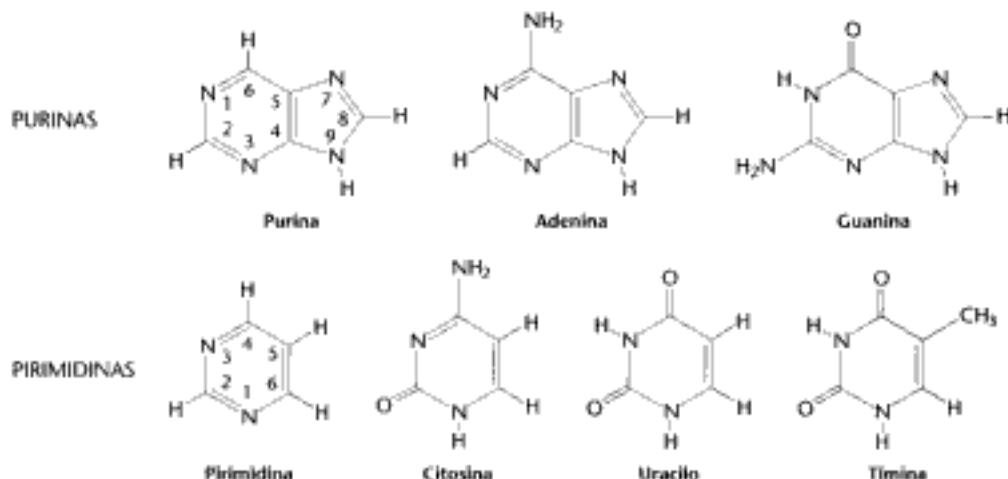


Figura 4.4 Purinas y pirimidinas. Los átomos dentro de las bases están numerados sin primas. En el RNA se utiliza uracilo en lugar de timina.

El ácido ribonucleico (RNA), así como el DNA, es un polímero largo no ramificado que consiste en nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster 3' → 5' (Figura 4.3). La estructura covalente del RNA difiere de la del DNA en dos aspectos. En primer lugar, las unidades de azúcar en el RNA son ribosas en lugar de desoxirribosas. La ribosa contiene un grupo 2'-hidroxilo que no está presente en la desoxiribosa. La otra diferencia, es que una de las cuatro bases principales en el RNA es el uracilo (U) en lugar de la timina (T).

Observe que cada puente fosfodiéster contiene una carga negativa. Esta carga negativa repele especies nucleofílicas como es el ion hidróxido; como consecuencia, los enlaces fosfodiéster son mucho menos susceptibles a un ataque hidrolítico que otros ésteres como los de los ácidos carboxílicos. Esta resistencia es crucial para mantener la integridad de la información que está almacenada en los ácidos nucleicos. La ausencia en el DNA del grupo 2'-hidroxilo aumenta aún más su resistencia a la hidrólisis. Esta mayor estabilidad del DNA es probablemente la razón por la que se utiliza, en lugar del RNA, como material hereditario en todas las células modernas y en muchos virus.

Los nucleótidos son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos

Una unidad consistente en una base unida a un azúcar se denomina *nucleósido*. Las cuatro unidades de nucleósido del RNA se llaman *adenosina*, *guanosina*, *citidina* y *uridina*, mientras que las del DNA se llaman desoxadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina y timidina. En cada caso, el N-9 de una purina o el N-1 de una pirimidina se une al C-1' del azúcar (Figura 4.5). La base descansa por encima del plano del azúcar cuando se escribe la estructura en la orientación estándar; es decir, la configuración del enlace *N*-glicosídico es β (p. 309). Un *nucleótido* es un nucleósido unido a uno o más grupos fosfato por un enlace éster. El sitio de esterificación más común en nucleótidos que se dan de forma natural es el grupo hidroxilo unido al C-5' del azúcar. Un compuesto formado por la unión de un grupo fosfato al C-5' de un azúcar nucleósido se llama un *nucleósido 5'-fosfato* o un *5'-nucleótido*. Por ejemplo, el ATP es *adenosina 5'-trifosfato*. Este nucleótido tiene una enorme importan-

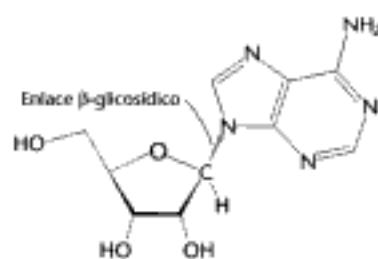


Figura 4.5 Enlace β -glicosídico en un nucleósido.

cia porque es la divisa o unidad energética más común. La energía liberada en la escisión del grupo trifosfato se utiliza para potenciar muchos procesos celulares (Capítulo 15). Otro nucleótido es la *desoxiguanosina 3'-monofosfato* (3'-dGMP; Figura 4.6). Este nucleótido difiere del ATP en que contiene guanina en lugar de adenina, desoxirribosa en lugar de ribosa (indicado por el prefijo "d"), un fosfato en lugar de tres y tiene el fosfato esterificado en el grupo hidroxilo de la posición 3' en lugar de la 5'. Los nucleótidos son los monómeros que se unen para formar el RNA y el DNA. Las cuatro unidades nucleotídicas del DNA se denominan *desoxiadenilato*, *desoxiguanilato*, *desoxicitidilato* y *timidilato*. Observe que el timidilato contiene desoxirribosa; se ha convenido que no se añada el prefijo desoxi porque los nucleótidos de timidina raramente se encuentran en el RNA.

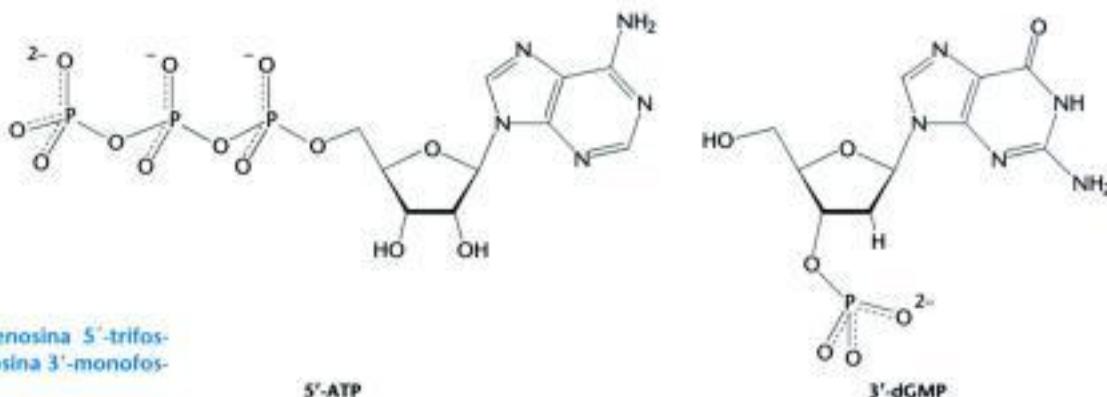


Figura 4.6 Nucleótidos adenosina 5'-trifosfato (5'-ATP) y desoxiguanosina 3'-monofosfato (3'-dGMP).

Las anotaciones abreviadas pApCpG o pACG indican un trinucleótido de DNA que consiste en los bloques constitutivos desoxiadenilato monofosfato, desoxicitidilato monofosfato y desoxiguanilato monofosfato unidos por un puente fosfodiéster, donde "p" indica el grupo fosfato (Figura 4.7). El extremo 5' a menudo tiene un fosfato unido al grupo 5'-OH. Observe que, al igual que un polipéptido (ver Sección 2.2), *una cadena de DNA tiene polaridad*. Un extremo de la cadena tiene un grupo 5'-OH libre (o un grupo 5'-OH unido a un fosfato), mientras que el otro extremo tiene un grupo 3'-OH, y ninguno de los dos está unido a otro nucleótido. Por convenio, *la secuencia de bases se escribe en la dirección 5' → 3'*. Por tanto, el símbolo ACG indica que el grupo 5'-OH libre está en el desoxiadenilato, mientras que el grupo 3'-OH libre está en el desoxiguanilato. Debido a esta polaridad, ACG y GCA corresponden a diferentes compuestos.

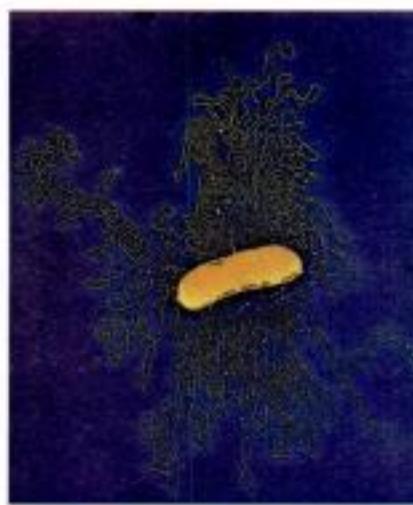


Figura 4.7 Estructura de una cadena de DNA. La cadena tiene un extremo 5', que normalmente está unido a un fosfato; y un extremo 3' que presenta normalmente un grupo hidroxilo libre.

Figura 4.8 Micrografía electrónica de parte del genoma de *E. coli*. [Dr. Gomai Murti / Science Photo Library / Photo Researchers.]

Las moléculas de DNA de organismos superiores pueden ser mucho mayores. El genoma humano contiene aproximadamente 3000 millones de nucleótidos, repartidos en 24 moléculas de DNA definidas de diferentes tamaños (22 autosomas y los cromosomas sexuales X e Y). Una de las mayores moléculas de DNA conocidas se encuentra en el muntjak indio, un venado asiático; su genoma es casi tan grande como el genoma humano pero está distribuido únicamente en 3 cromosomas (Figura 4.9). El mayor de estos cromosomas tiene cadenas de más de mil millones de nucleótidos. Si tal molécula de DNA pudiera extenderse totalmente, alcanzaría una longitud de más de un pie (>30.5 cm). Algunas plantas contienen moléculas de DNA aún mayores.

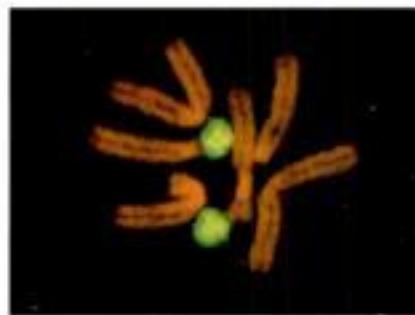


Figura 4.9 El muntjak indio y sus cromosomas. Las células de un muntjak indio hembra (derecha) contienen tres pares de cromosomas muy grandes (teñidos de naranja). La célula mostrada es un híbrido que contiene un par de cromosomas humanos (teñidos de verde) para su comparación. [(Izquierda) M. Birkhead, OSF/Animals Animals. (Derecha) J-Y lee, M. Koi, E. J. Stanbridge, M. Oshimura, A. T. Kumamoto y A. P. Feinberg. *Nature Genetics* 7 (1994):30.]

4.2 Una pareja de cadenas de ácido nucleico con secuencias complementarias puede formar una estructura de doble hélice

Como se ha visto en el Capítulo 1, la estructura covalente de los ácidos nucleicos les confiere la capacidad de portar la información en forma de una secuencia de bases a lo largo de una cadena de ácido nucleico.

Las bases de las dos hebras separadas de un ácido nucleico constituyen *parejas de bases específicas* de tal modo que originan una estructura helicoidal. La estructura doble-helicoidal del DNA facilita la *replicación* del material genético, es decir, la generación de dos copias del ácido nucleico a partir de una sola.

La doble hélice es estable gracias a puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas

Durante los estudios encaminados a determinar la estructura tridimensional de DNA se descubrió la existencia de interacciones específicas del emparejamiento de bases. Maurice Wilkins y Rosalind Franklin obtuvieron fotografías de la difracción de rayos X de fibras de DNA (Figura 4.10). Las características de estos patrones de difracción indicaron que el DNA estaba formado por dos cadenas que marcaban una estructura helicoidal regular. De éstos y otros datos, James Watson y Francis Crick dedujeron un modelo estructural para el DNA que explicaba el patrón de difracción y fue también la fuente de ciertas intuiciones notables de las propiedades funcionales de los ácidos nucleicos (Figura 4.11).

Las características del modelo de DNA de Watson y Crick deducido a partir de los patrones de difracción son:

1. Hay dos cadenas helicoidales de polinucleótidos enrolladas a lo largo de un eje común. Las cadenas transcurren en direcciones opuestas.

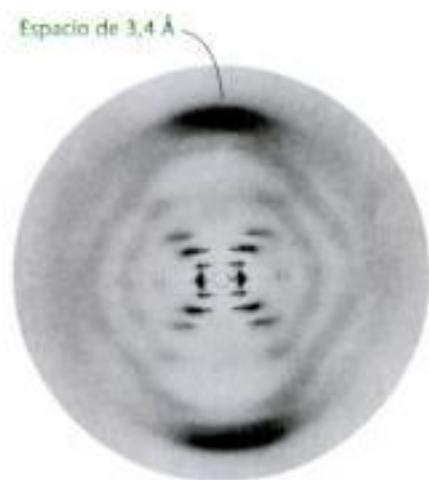


Figura 4.10 Fotografía de difracción de rayos X de una fibra de DNA hidratada. La cruz central es característica de una estructura helicoidal. Los arcos marcados sobre el meridiano surgen por la acumulación de las bases apareadas, que están separadas 3,4 Å. [Cortesía del Dr. Maurice Wilkins.]

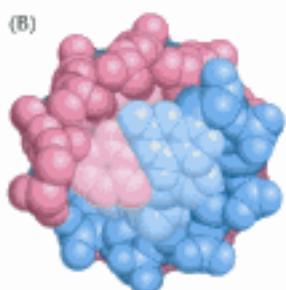
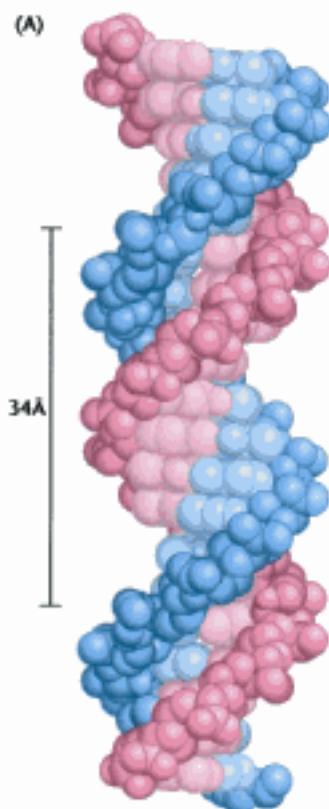


Figura 4.11 Modelo de Watson y Crick de la doble hélice de DNA. Una de las cadenas de polinucleótido se muestra en azul y la otra en rojo. Las bases púricas y pirimidínicas se indican en colores más claros que el eje de azúcar-fosfato. (A) Vista lateral. La estructura se repite a lo largo del eje helicoidal (vertical) a intervalos de 34 Å, que corresponden a 10 nucleótidos en cada cadena. (B) Vista frontal, tomada desde la base del eje helicoidal.

2. Los ejes de azúcar-fosfato se sitúan en el exterior y, por tanto, las bases de purina y pirimidina están en el interior de la hélice.

3. Las bases son casi perpendiculares al eje de la hélice y las bases adyacentes están separadas 3,4 Å. Este espaciado resulta evidente en el patrón de difracción del DNA (Figura 4.10). La estructura helicoidal se repite cada 34 Å, de modo que hay 10 bases (= 34 Å por vuelta/3,4 Å por base) por cada vuelta de hélice. Hay una rotación de 36 grados por base (360 grados por vuelta completa/10 bases por vuelta).

4. El diámetro de la hélice es de 20 Å.

¿Cómo puede ser capaz tal estructura helicoidal de acomodar una secuencia arbitraria de bases, dados los diferentes tamaños y formas de las purinas y pirimidinas? Intentando dar respuesta a esta cuestión, Watson y Crick descubrieron que la guanina solamente podía emparejarse con la citosina y la adenina con la timina para formar pares de bases que tuvieran básicamente la misma forma (Figura 4.12). Estos pares de bases se mantienen juntos por puentes de hidrógeno específicos. Aunque estos puentes sean débiles (de 4 a 21 kJ mol⁻¹ o de 1 a 5 kcal mol⁻¹) estabilizan la hélice debido a su gran número en la molécula de DNA. Las reglas de emparejamiento de bases fueron respaldadas por estudios previos de Edwin Chargaff, que en 1950 publicó que las proporciones de adenina a timina y de guanina a citosina eran casi las mismas en todas las especies estudiadas, mientras que la relación adenina-guanina variaba considerablemente (Tabla 4.1).

Dentro de la hélice, las bases están firmemente apiladas unas sobre otras (Figura 4.13). El apilamiento de bases una sobre la otra contribuye a la estabilidad de la doble hélice de dos maneras. Primero, los pares de bases adyacentes se atraen entre sí por efecto hidrofóbico (p. 9). El conjunto de bases hidrofóbicas en el interior de la hélice aleja el agua que las rodea, mientras que las superficies más polares quedan expuestas al agua. El apilamiento de bases, o interacciones hidrofóbicas entre las bases, da lugar a la exposición de las superficies más polares al agua circundante. Este ordenamiento recuerda a lo que ocurre en el plegamiento de proteínas, donde los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el interior de la proteína y los hidrofílicos en el exterior (Sección 2.4). El efecto hidrofóbico facilita el apilamiento de las bases, una encima de la otra. Los pares de bases apiladas se atraen mutuamente mediante fuerzas de van der Waals (p. 8). La energía asociada a una única interacción de van der Waals es muy débil, alrededor de 2 a 4 kJ mol⁻¹ (0,5 a 1,0 kcal mol⁻¹). Sin embargo, en la doble hélice es sustancial, debido al gran número de áto-

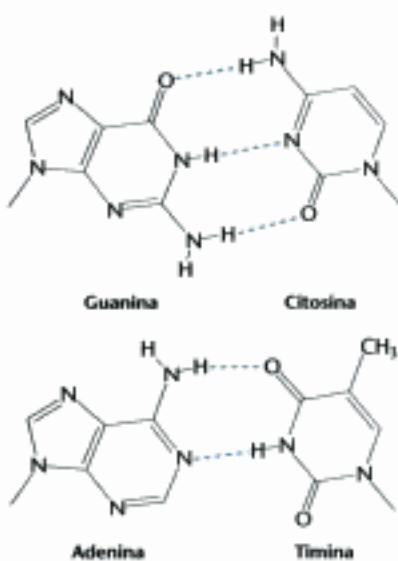


Figura 4.12 Estructuras de los pares de bases propuestos por Watson y Crick.

TABLA 4.1 Composición de bases, determinada experimentalmente, de distintos organismos

Especie	A:T	G:C	A:G
Ser humano	1,00	1,00	1,56
Salmón	1,02	1,02	1,43
Trigo	1,00	0,97	1,22
Levadura	1,03	1,02	1,67
Escherichia coli	1,09	0,99	1,05
Serratia marcescens	0,95	0,86	0,70

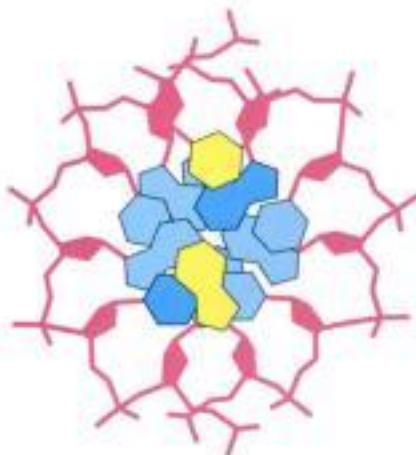


Figura 4.13 Vista axial del DNA. Los pares de bases están apilados en la doble hélice casi uno encima de otro.

mos en contacto de van der Waals y a la suma de sus efectos individuales. Además, el apilamiento de bases en el DNA está también favorecido por las conformaciones de los anillos de cinco miembros relativamente rígidos de los azúcares del eje.

La doble hélice facilita la transmisión precisa de la información hereditaria

El modelo de doble hélice del DNA y la presencia de pares de bases específicos sugirió inmediatamente cómo podría replicarse el material genético. La secuencia de bases de una hebra de la doble hélice determina de forma precisa la secuencia de la otra hebra; una base de guanina de una hebra siempre se empareja con una base de citosina de la otra hebra, y así sucesivamente. Por tanto, la separación de la doble hélice en sus dos cadenas componentes producirá dos moldes de hebra simple sobre los que se podrán formar nuevas dobles hélices, cada una con la misma secuencia de bases que la doble hélice parental. Como consecuencia, al replicarse el DNA, una de las cadenas de cada molécula de DNA descendiente se sintetizará *de novo*, mientras que la otra se transmitirá intacta desde la molécula de DNA parental. Esta distribución de átomos parentales se logra gracias a la *replicación semi-conservativa*.

Matthew Meselson y Franklin Stahl llevaron a cabo en 1958 una prueba crítica de esta hipótesis. Marcaron el DNA parental con ^{15}N , el isótopo pesado del nitrógeno, para hacerlo más denso que el DNA ordinario. Esto se realizó durante el crecimiento de *E. coli*, al cabo de muchas generaciones, en un medio que contenía $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como única fuente de nitrógeno. Al concluir la incorporación del nitrógeno pesado, la bacteria fue trasladada bruscamente a un medio que contenía ^{14}N , el isótopo ordinario del nitrógeno. La cuestión era: ¿Cuál sería la distribución de ^{14}N y ^{15}N en las moléculas de DNA después de sucesivos ciclos de replicación?

La distribución de ^{14}N y ^{15}N fue revelada por la técnica de *sedimentación de equilibrio en gradiente de densidad*. Se disolvió una pequeña cantidad de DNA en una disolución concentrada de cloruro de cesio que tenía una densidad prácticamente igual a la del DNA ($1,7 \text{ g cm}^{-3}$). Se centrifugó esta disolución hasta conseguir casi el equilibrio. Las tendencias antagónicas de sedimentación y difusión crearon un gradiente de concentración de cloruro de cesio a lo largo de la célula de centrifugación. El resultado fue un gradiente estable cuya densidad variaba entre $1,66$ y $1,76 \text{ g cm}^{-3}$. Las moléculas de DNA, en este gradiente de densidad, se trasladaron por la fuerza centrífuga a la zona donde la densidad de la disolución era igual a la suya propia. El DNA genómico formó una estrecha banda que fue detectada por absorción de luz ultravioleta. Una mezcla de moléculas de DNA con ^{14}N y de DNA con ^{15}N dieron lugar a bandas claramente separadas porque sus densidades diferían en un 1% aproximadamente (Figura 4.14).

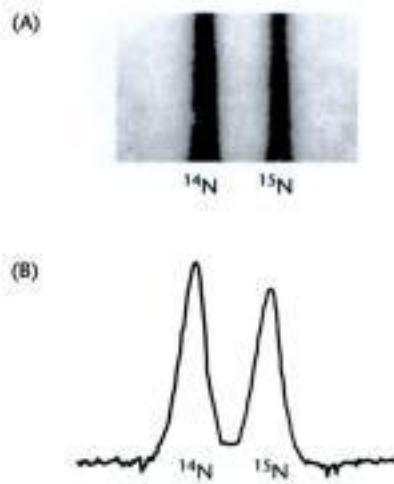


Figura 4.14 Resolución del ^{14}N DNA, del ^{15}N DNA por centrifugación en gradiente de densidad. (A) Fotografía de la absorción ultravioleta de una célula de centrifugación mostrando las dos bandas distintas de DNA. (B) Curva densitométrica de la fotografía de absorción. [Tomado de M. Meselson y F. W. Stahl, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44 (1958): 671-682.]

Figura 4.15 Detección de la replicación semiconservativa del DNA de *E. coli* por centrifugación en gradiente de densidad. La posición de una banda de DNA depende de su contenido en ^{14}N o ^{15}N . Después de la generación 1,0, todas las moléculas de DNA son hibridas y contienen cantidades iguales de ^{14}N y ^{15}N . [Tomado de M. Meselson y F. W. Stahl, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44 (1958): 671-682.]

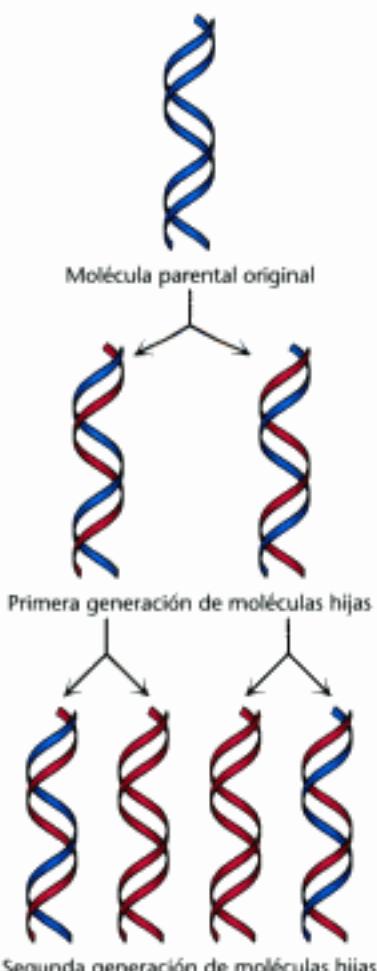
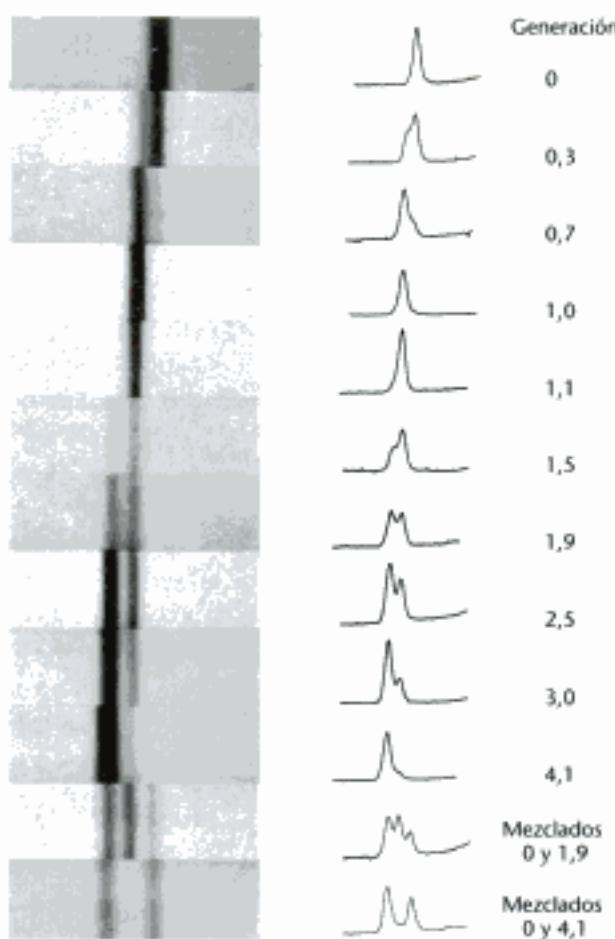


Figura 4.16 Diagrama de la replicación semiconservativa. El DNA parental se indica en azul, y el recién sintetizado en rojo. [Según M. Meselson y F. W. Stahl, Proc. Natl. Acad. Sci. 44 U.S.A. 44 (1958): 671-682.]



Se extrajo el DNA de la bacteria en distintos momentos después de que fueran transferidas desde el medio con ^{15}N al medio con ^{14}N y centrifugadas. Los análisis de esas muestras indicaron que después de una generación había una sola banda de DNA. La densidad de esta banda estaba situada precisamente en la mitad entre las densidades de las bandas de ^{14}N DNA y ^{15}N DNA (Figura 4.15). *La ausencia de ^{15}N DNA indicaba que el DNA parental no se mantenía como una unidad intacta en la replicación.* La ausencia de ^{14}N DNA indicaba que en todas las moléculas hijas de DNA algunos de sus átomos derivaban del DNA parental. Esta proporción debía ser la mitad, puesto que la densidad de la banda de DNA híbrido estaba situada a mitad de camino entre las del ^{14}N DNA y del ^{15}N DNA.

Después de dos generaciones había cantidades iguales de dos bandas de DNA. Una era de DNA híbrido y la otra de ^{14}N DNA. Meselson y Stahl después de estos brillantes experimentos llegaron a la conclusión de que la replicación era semiconservativa, de modo que cada nueva doble hélice contiene una hebra parental y otra sintetizada de nuevo. Sus resultados concordaban perfectamente con el modelo de Watson y Crick para la replicación del DNA (Figura 4.16).

La doble hélice se puede fundir reversiblemente

Durante la replicación del DNA y otros procesos, deben separarse las dos hebras de la doble hélice, una de la otra, al menos en una región localizada. Las dos hebras de la hélice de DNA se separan cuando se rompen los puentes de hidrógeno que unían los pares de bases. En el laboratorio, se puede deshacer la doble hélice calentando una disolución de DNA o bien añadiendo un ácido o un álcali para ionizar las bases. La dissociación de la doble hélice normalmente se llama *fusión* porque tiene lugar de forma relativamente brusca a una temperatura determinada. La *temperatura de fusión* (T_m , del inglés "melting temperature") se define como aquella temperatura en

la cual se deshace la mitad de la estructura helicoidal. Sin embargo, dentro de las células la doble hélice no se funde por calentamiento sino por acción de unas proteínas llamadas *helicasas* que utilizan energía química (procedente del ATP) para deshacer la hélice.

Las bases apiladas de los ácidos nucleicos absorben menos luz ultravioleta que las bases que no lo están, efecto que se conoce como *hipocromismo*. Por tanto, la fusión de ácidos nucleicos se puede seguir fácilmente midiendo su absorbancia de luz, que tiene un pico a una longitud de onda de 260 nm (Figura 4.17).

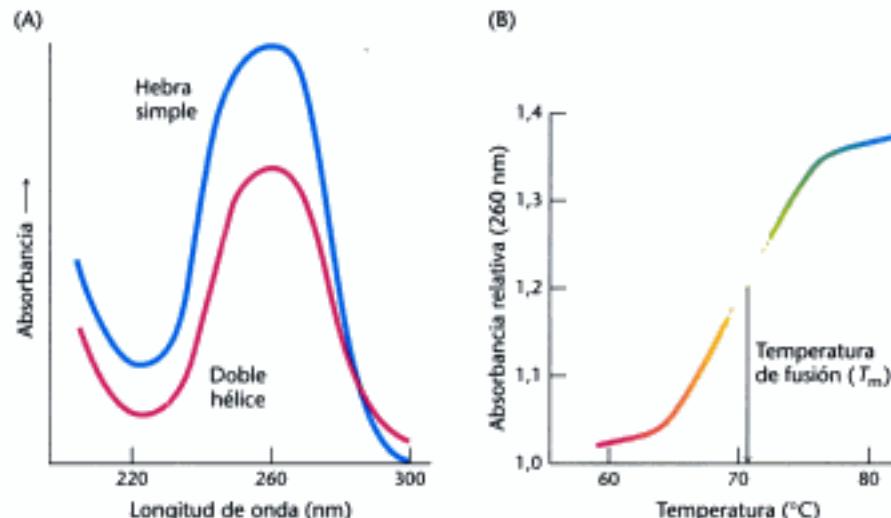


Figura 4.17 Hipocromismo. (A) El DNA de hebra simple absorbe la luz con más eficacia que el DNA de doble hélice. (B) La absorbancia de una disolución de DNA a una longitud de onda de 260 nm se incrementa cuando la doble hélice se funde en filamentos simples.

Cuando la temperatura desciende por debajo de la T_m , las hebras complementarias de los ácidos nucleicos se reasocian espontáneamente para formar una doble hélice. Este proceso de renaturalización a veces se llama *templado* o, en inglés, "*annealing*". La facilidad con la que las dobles hélices pueden fundir y reasociarse es esencial para las funciones biológicas de los ácidos nucleicos.

La posibilidad de fundir y retemplar el DNA de forma reversible en el laboratorio hace que sea un instrumento poderoso para investigar la similitud entre secuencias. Por ejemplo, se pueden fundir moléculas de DNA de dos organismos diferentes y permitir después el "*annealing*" o *hibridación* entre ellas. Si las secuencias son similares, se pueden formar díplex de DNA híbrido con el DNA de cada organismo, contribuyendo cada uno a una hebra de la doble hélice. De hecho, el grado de hibridación es una indicación del parentesco entre genomas y por tanto entre organismos. Con experimentos similares de hibridación de RNA y DNA se pueden localizar genes en el DNA de una célula que correspondan a un RNA en particular. Volveremos a esta importante técnica en el Capítulo 5.

Algunas moléculas de DNA son circulares y están superenrolladas

Las moléculas de DNA de los cromosomas humanos son lineales. Sin embargo, la microscopía electrónica y otros estudios han puesto de manifiesto que moléculas de DNA intactas de otros organismos son circulares (Figura 4.18A). El término *circular* se refiere a la continuidad de las cadenas de DNA y no a su forma geométrica. Las moléculas de DNA en las células tienen necesariamente una forma muy compacta. Obsérvese que la longitud del cromosoma de *E. coli* totalmente extendido es alrededor de 1000 veces mayor que el diámetro máximo de la bacteria.

En las moléculas de DNA cerradas aparece una propiedad nueva. El eje de la doble hélice puede a su vez estar enrollado formando una *superhélice* (Figura 4.18B). El superenrollamiento debe ser biológicamente importante por dos razones. La primera es que *una molécula de DNA superenrollada tiene una forma más compacta que la molécula relajada correspondiente*. Segundo, *el superenrollamiento*

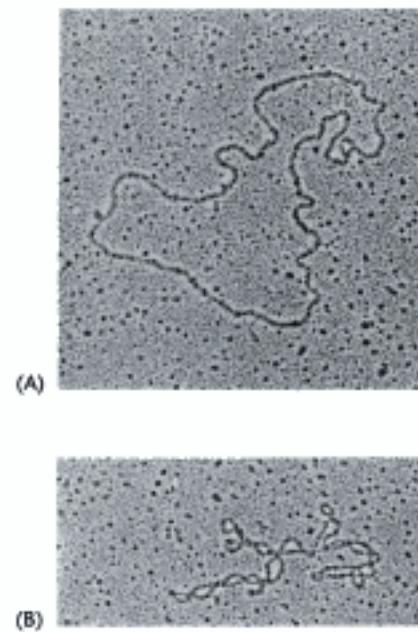


Figura 4.18 Micrografías electrónicas de DNA circular de la mitocondria. (A) Forma relajada. (B) Forma superenrollada. [Cortesía del Dr. David Clayton.]

puede dificultar o favorecer la capacidad de desenrollamiento de la doble hélice y por lo tanto afecta a las interacciones del DNA con otras moléculas. Estas propiedades topológicas del DNA serán estudiadas más adelante en el capítulo 28. A una molécula de DNA circular sin estructura superhelicoidal se le llama *molécula relajada*.

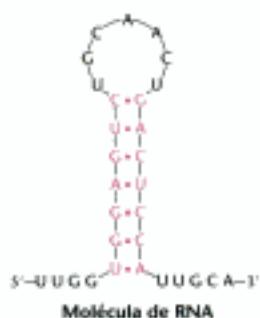
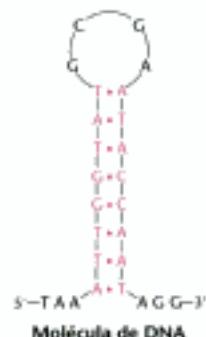


Figura 4.19 Estructuras en horquilla. Las estructuras en horquilla pueden formarse en moléculas de hebra simple de DNA y RNA.

Los ácidos nucleicos de hebra simple pueden adoptar estructuras complicadas

Los ácidos nucleicos de hebra simple a menudo se repliegan sobre sí mismos para formar estructuras bien definidas. Tales estructuras son importantes en todos los organismos actuales en entidades tales como el ribosoma, un gran complejo de RNAs y proteínas sobre el que se sintetizan las proteínas.

El motivo estructural más simple y común es la *horquilla* (en inglés, “stem-loop”, pedúnculo con cabeza), que se forma cuando dos secuencias complementarias de una misma hebra simple se juntan dando lugar a estructuras de doble hélice (Figura 4.19). En muchos casos, estas dobles hélices están hechas completamente de pares de bases de Watson y Crick. Sin embargo, en otros casos, en las estructuras se incluyen bases mal emparejadas o desparejadas (abultamientos). Estos malos emparejamientos desestabilizan la estructura local pero introducen desviaciones de la estructura de doble hélice estándar que pueden ser importantes para plegamientos de orden superior o para su función biológica (Figura 4.20).

Los ácidos nucleicos de hebra simple pueden adoptar estructuras más complejas que la simple horquilla a través de interacciones entre bases más alejadas. A menudo interaccionan tres o más bases para estabilizar estas estructuras. En tales casos, los elementos que pueden crear puentes de hidrógeno y que no participan en los pares de bases de Watson y Crick pueden formar puentes de hidrógeno en emparejamientos no estándares. En estas estructuras más elaboradas los iones metálicos tales como el ion magnesio (Mg^{2+}) normalmente ayudan a su estabilización. Estas estructuras complejas permiten al RNA realizar multitud de funciones que la molécula de doble

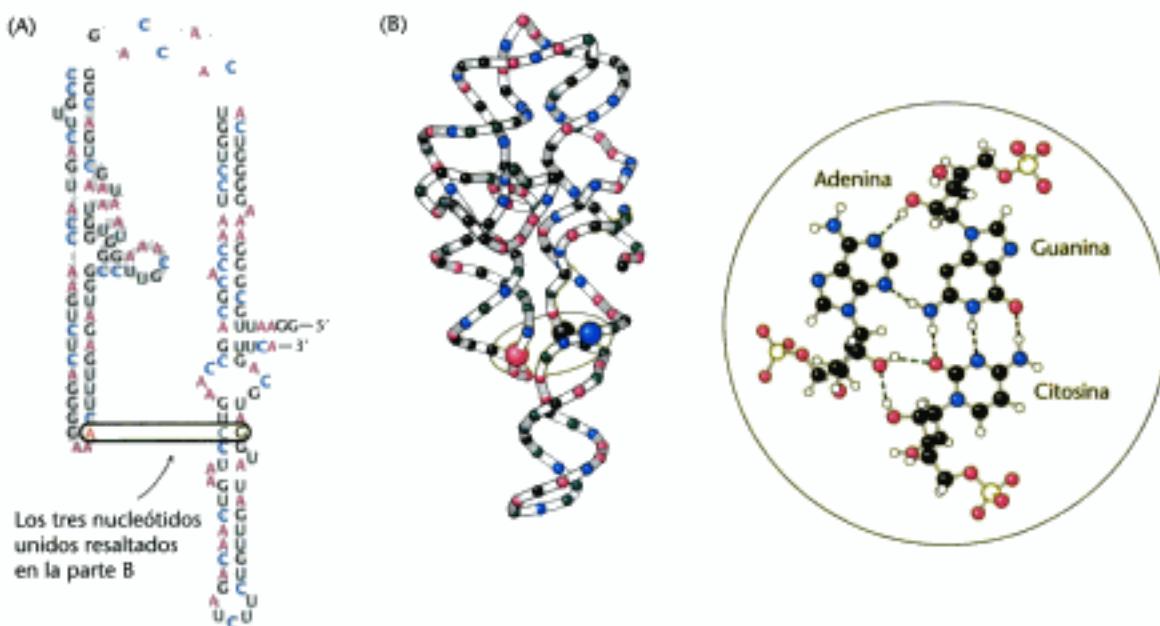


Figura 4.20 Estructura compleja de una molécula de RNA. Una molécula de RNA de hebra simple puede plegarse sobre sí misma formando una estructura compleja. (A) Secuencia nucleotídica de las estructuras en horquilla que muestra pares de bases de Watson-Crick y otros emparejamientos de bases no estándares. (B) Estructura tridimensional y una interacción importante de gran alcance entre tres bases. Los puentes de hidrógeno del par de bases de Watson-Crick se muestran en líneas negras de trazo; los puentes de hidrógeno adicionales se muestran en líneas verdes de trazo.

hebra de DNA no puede realizar. Incluso la complejidad de algunas moléculas de RNA rivaliza con las proteínas, y estas moléculas realizan un cierto número de funciones que se habían considerado anteriormente como dominio exclusivo de las proteínas.

4.3 Las polimerasas replican el DNA a partir de las instrucciones de moldes

Volvamos ahora al mecanismo molecular de la replicación del DNA. La maquinaria de la replicación completa de las células compromete a más de 20 proteínas interrelacionadas de forma compleja y coordinada. En 1958, Arthur Kornberg y sus colaboradores aislaron en *E. coli* el primero de los enzimas conocidos, las llamadas *DNA polimerasas*, que promueven la formación de enlaces entre las unidades del eje del DNA. La bacteria *E. coli* tiene diferentes DNA polimerasas, designadas mediante números romanos, que participan en la replicación del DNA y en su reparación (Capítulo 28).

Las DNA polimerasas catalizan la formación de enlaces fosfodiéster

Las DNA polimerasas catalizan la adición, paso a paso, de las unidades de desoxirribonucleótido a una cadena de DNA (Figura 4.21). La reacción catalizada, en su forma más simple, es:



donde dNTP indica cualquier desoxirribonucleótido trifosfato y PP_i es una molécula de pirofosfato.

La síntesis del DNA tiene las siguientes características:

1. La reacción requiere los cuatro precursores activados, es decir, *los desoxinucleósidos 5'-trifosfatos dATP, dGTP, dCTP y dTTP*, así como el ion Mg²⁺.
2. *La nueva cadena de DNA se ensambla directamente sobre un molde preexistente de DNA*. Las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster con eficacia solamente si la base del nucleótido entrante es complementaria de la base correspondiente de la hebra molde. Así pues, la DNA polimerasa es un *enzima dirigido por un molde* que sintetiza un producto con una secuencia de bases complementaria de la del molde.
3. *Las DNA polimerasas requieren un cebador ("primer") para empezar la síntesis*. Para ello una hebra *cebadora* con un grupo 3'-OH libre en su extremo debe estar ya unida a la hebra molde. La reacción de elongación de la cadena catalizada por las DNA polimerasas tiene lugar por medio de un *ataque nucleofílico del grupo 3'-hidroxilo del cebador sobre el átomo de fósforo más interno del desoxinucleósido tri-*

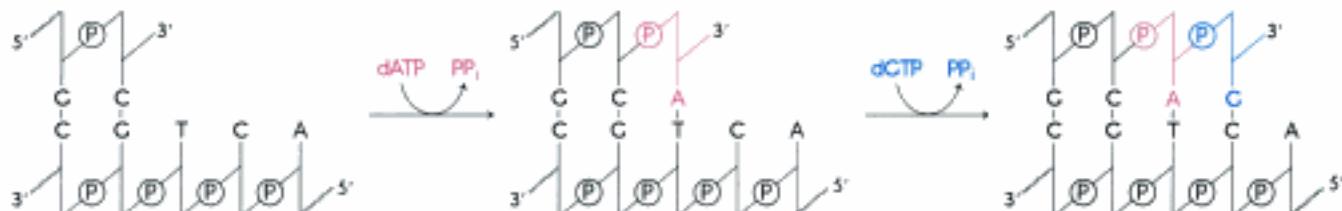


Figura 4.21 Reacción de polymerización catalizada por las DNA polimerasas.

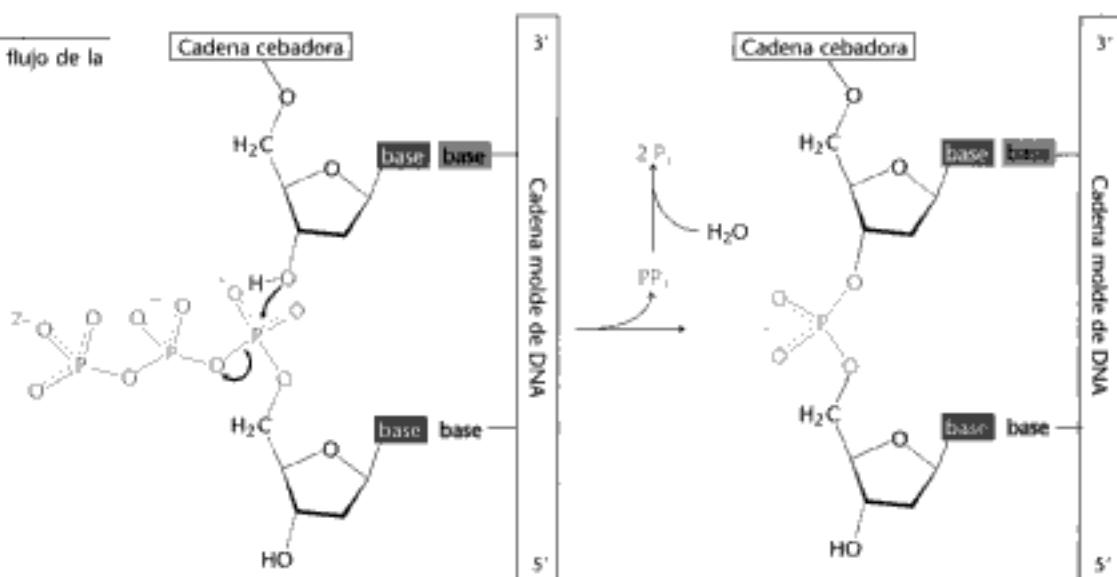


Figura 4.22 Replicación del DNA. Las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster.

fosfato (Figura 4.22). Se forma un puente fosfodiéster con la consiguiente eliminación de pirofosfato. La subsiguiente hidrólisis del pirofosfato para formar dos iones ortofosfato (P_i) por acción de una pirofosfatasa, un enzima omnipresente, hace que la polimerización siga adelante. *La elongación de la cadena de DNA se realiza en la dirección 5' → 3'.*

4. *Muchas DNA polimerasas son capaces de corregir los errores en el DNA eliminando los nucleótidos mal emparejados.* Estas propiedades de las DNA polimerasas contribuyen a la excepcional fidelidad de la replicación del DNA, que tiene una tasa de error inferior a 10^{-8} por cada par de bases.

Los genes de algunos virus son de RNA

Los genes de todos los organismos celulares son de DNA. Lo mismo ocurre en algunos virus, pero en otros el material genético es RNA. Los virus son elementos genéticos encerrados en cubiertas de proteína que se pueden desplazar de una célula a otra pero no son capaces de crecer independientemente. Un ejemplo muy bien estudiado de virus de RNA es el virus del mosaico del tabaco, el cuál infecta a las hojas de la planta del tabaco. Este virus consiste en una hebra simple de RNA (6930 nucleótidos) rodeada de una cubierta proteica formada por 2130 subunidades idénticas. Una RNA polimerasa dirigida por RNA cataliza la replicación de este RNA vírico.

Otra clase importante de virus de RNA comprende a los *retrovirus*, llamados así porque la información génica fluye del RNA al DNA en lugar de hacerlo del DNA al RNA. Esta clase incluye al virus 1 de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), causante del SIDA, así como un número de virus de RNA que producen tumores en animales susceptibles. Las partículas de retrovirus contienen dos copias de una molécula de RNA de hebra simple. Al entrar en la célula, se copia el RNA a DNA a través de la acción de un enzima vírico llamado *transcriptasa inversa* (Figura 4.23). La versión resultante de DNA de doble hélice del genoma vírico se puede incorporar al DNA cromosómico del hospedador y se replica junto con el DNA celular normal. Un tiempo más tarde, el genoma vírico integrado se expresa y forma RNA y proteínas víricas, las cuales se ensamblarán dando lugar a nuevas partículas víricas.

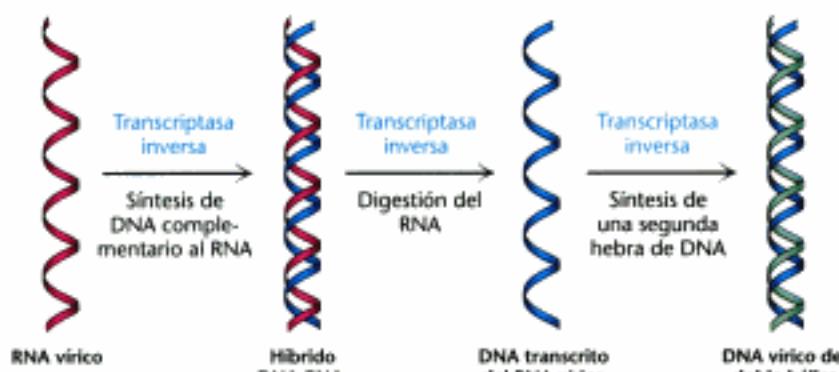


Figura 4.23 Flujo de información del RNA al DNA en los retrovirus. El genoma de RNA de un retrovirus se convierte en DNA mediante la transcriptasa inversa, un enzima introducido en la célula por la partícula infecciosa vírica. La transcriptasa inversa posee diversas actividades y cataliza la síntesis de una hebra de DNA complementaria, la digestión del RNA y la síntesis posterior de la otra hebra de DNA.

4.4 La expresión génica es la transformación de la información del DNA en moléculas funcionales

La información almacenada como DNA resulta útil cuando se expresa para producir RNA y proteínas. Este tema rico y complejo será la materia de estudio de muchos de los próximos capítulos de este libro, pero aquí haremos una introducción de lo esencial de la expresión génica. Se puede pensar en el DNA como una información archivable, almacenada y manipulada de forma juiciosa para minimizar perjuicios (mutaciones). Se expresa en dos pasos. Primero se hace una copia de RNA que codifica proteínas. Este RNA mensajero se considera como si fuera fotocopia de la información original; se pueden hacer copias múltiples, que se utilizan y después se eliminan. Segundo, la información del RNA mensajero se traduce para sintetizar proteínas funcionales. Para facilitar esta traducción existen otros tipos de moléculas de RNA.

Varios tipos de RNA desempeñan un papel clave en la expresión génica

Los científicos acostumbraban a creer que los RNAs ejercían un papel pasivo en la expresión génica, como meros transportadores de la información, en la forma de RNA mensajero. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el RNA ejerce diversas funciones, desde la catálisis hasta la regulación. Las células contienen diversos tipos de RNA (Tabla 4.2).

1. El *RNA mensajero* (mRNA) es el molde para la síntesis de proteínas o *traducción*. Se puede producir una molécula de mRNA por cada gen o grupo de genes que vayan a expresarse en *E. coli*, mientras que se produce un mRNA específico por cada gen en eucariotas. En consecuencia, el mRNA es una clase heterogénea de moléculas. La longitud media de una molécula de mRNA de *E. coli* es de alrededor de 1.2 kilobases (kb). En los eucariotas, el mRNA tiene aspectos estructurales, tales como estructuras en horquilla que regulan la eficiencia en la traducción y el tiempo de su vida media.

TABLA 4.2 Moléculas de RNA en *E. coli*

Tipo	Cantidad relativa (%)	Coeficiente de sedimentación (S)	Masa (kd)	Número de nucleótidos
RNA ribosómico (rRNA)	80	23	$1,2 \times 10^5$	3700
		16	$0,55 \times 10^5$	1700
		5	$3,6 \times 10^3$	120
RNA de transferencia (tRNA)	15	4	$2,5 \times 10^3$	75
RNA mensajero (mRNA)	5		Heterogéneo	

Kilobase (kb)

Unidad de longitud equivalente a 1000 pares de bases de una molécula de ácido nucleico de doble hebra (o 1000 bases de una molécula de hebra simple).

Una kilobase de DNA de doble hebra tiene una longitud de contorno de 0,34 μ m y una masa de aproximadamente 660 kd.

2. El RNA de transferencia (tRNA) transporta los aminoácidos en forma activada al ribosoma para la formación de enlaces peptídicos, en una secuencia dictada por el mRNA molde. Hay al menos un tipo de tRNA para cada uno de los 20 aminoácidos. El RNA de transferencia consta de alrededor de 75 nucleótidos (con una masa de unos 25 kd).

3. El RNA ribosómico (rRNA), es el componente principal de los ribosomas y desempeña un papel tanto catalítico como estructural en la síntesis de proteínas (Capítulo 30). En los procariotas existen tres tipos de rRNA, llamados 23S, 16S y 5S RNA debido a su comportamiento en la sedimentación. En el ribosoma está presente una molécula de cada una de estas especies de rRNA. Antes se creía que el RNA ribosomal desempeñaba solamente un papel estructural en los ribosomas. Ahora sabemos que el rRNA es el verdadero catalizador en la síntesis de las proteínas.

El RNA ribosómico es el más abundante de los tres tipos de RNA. Le siguen el RNA de transferencia y el RNA mensajero, el cual representa solamente el 5% del total de RNA. Las células eucarióticas contienen pequeñas moléculas de RNA adicionales.

4. El *RNA nuclear pequeño* (*snRNA*, "small nuclear RNA") participa en el empalme de los exones de RNA.

5. Una pequeña molécula de RNA es un compuesto esencial de la *partícula que reconoce señales*, un complejo de RNA y proteína citoplasmáticas que coadyuva en dirigir las proteínas recién sintetizadas hacia los destinos intra e extracelulares.

6. Los *microRNA* (miRNA) son una clase de moléculas pequeñas de RNA (de alrededor de 21 nucleótidos) no codificadoras que se unen a las moléculas de mRNA complementarias e inhiben su traducción.

7. Los *RNA pequeños de interferencia* (siRNA) son otra clase de moléculas pequeñas de RNA que se unen al mRNA y facilitan su degradación. Los microRNA y los RNA pequeños de interferencia también proporcionan a los investigadores unos potentes instrumentos experimentales para inhibir la expresión de determinados genes en las células.

8. El RNA también es un componente de la *telomerasa*, un enzima que mantiene los telómeros (extremos) de los cromosomas, durante la replicación del DNA.

En este capítulo estudiaremos los rRNA, mRNA y tRNA.

Todo el RNA celular se sintetiza por las RNA polimerasas

La síntesis de RNA a partir de un DNA molde se denomina *transcripción* y está catalizada por el enzima *RNA polimerasa* (Figura 4.24). La RNA polimerasa cataliza

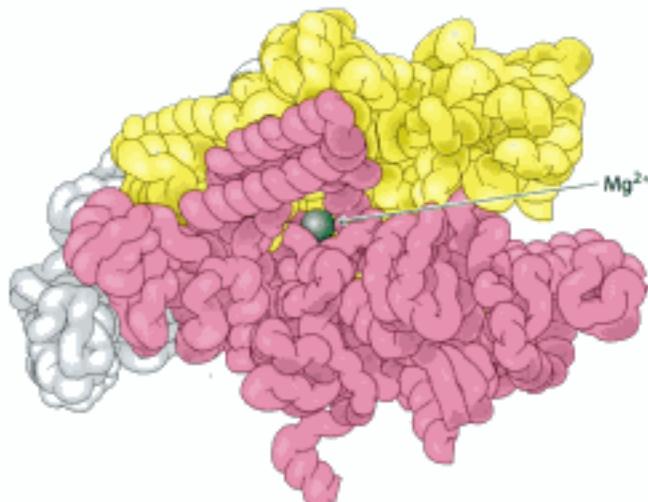


Figura 4.24 RNA polimerasa. Un enzima grande compuesto de muchas subunidades, entre ellas β (en rojo) y β' (en amarillo), las cuales forman una "garra" que sujetla al DNA para que se transcriba. El centro activo incluye un ion Mg^{2+} (en verde) en el centro de la estructura. Los tubos curvados descritos en la proteína de la imagen representan el esqueleto de la cadena polipeptídica. [Tomado de IL9Z.pdb.]

la iniciación y la elongación de las cadenas de RNA. La reacción catalizada por este enzima es:



La RNA polimerasa requiere los siguientes componentes:

1. *Un molde.* El molde preferente es *DNA de doble hebra*. También puede servir como molde DNA de hebra simple. El RNA, bien sea de una o de dos hebras, no es un molde eficaz, como tampoco lo son los híbridos RNA-DNA.
2. *Precursores activados.* Se requieren los cuatro *ribonucleósidos trifosfato*: ATP, GTP, UTP y CTP.
3. *Un ion metálico divalente.* Son eficaces el Mg^{2+} o el Mn^{2+} .

La síntesis de RNA se asemeja a la del DNA en varios aspectos (Figura 4.25). Primero, la dirección de síntesis es $5' \rightarrow 3'$. Segundo, el mecanismo de elongación es similar: hay un ataque nucleofílico del grupo 3'-OH del extremo de la cadena en crecimiento sobre el fosfato más interno del nucleósido trifosfato recién llegado. Tercero, la síntesis viene favorecida por la hidrólisis del pirofosfato. Al contrario de la DNA polimerasa, la RNA polimerasa no requiere un iniciador. Además, la RNA polimerasa carece de la capacidad nucleásica que utiliza la DNA polimerasa para cortar los nucleótidos mal emparejados.

Los tres tipos de RNA celular –mRNA, tRNA y rRNA– se sintetizan en *E. coli* por la misma RNA polimerasa según las instrucciones dadas por un DNA molde. En las células de mamífero existe una división del trabajo entre muchos tipos diferentes de RNA polimerasas. Volveremos a tratar estas RNA polimerasas en el Capítulo 29.

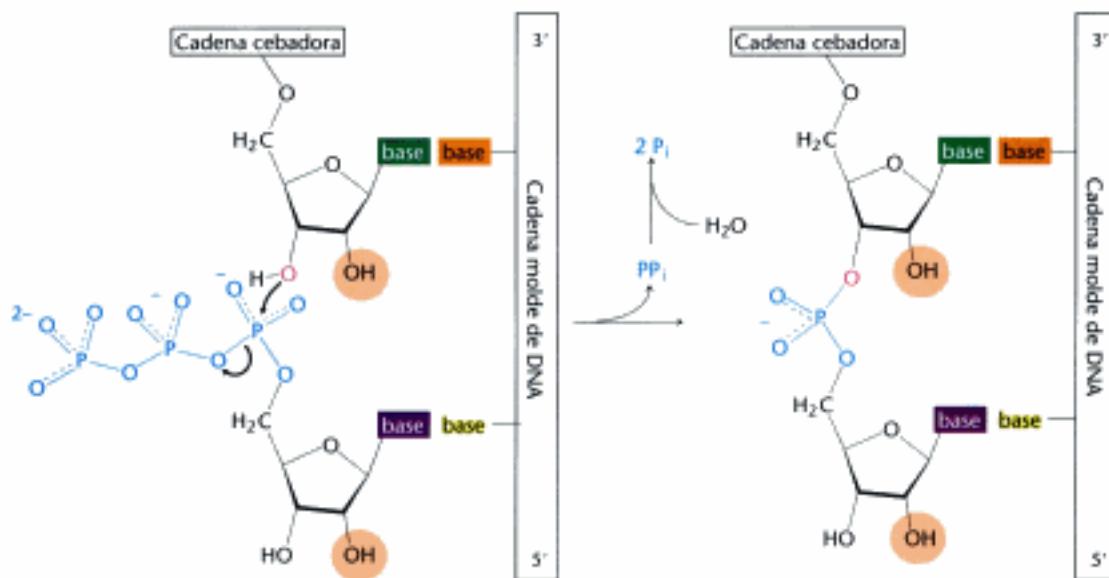


Figura 4.25 Mecanismo de transcripción en la reacción de elongación de cadena catalizada por la RNA polimerasa.

Las RNA polimerasas reciben instrucciones de DNA moldes

La RNA polimerasa, al igual que las DNA polimerasas descritas anteriormente, toma instrucciones de un DNA molde. La primera evidencia fue el descubrimiento de que la *composición de bases* del nuevo RNA sintetizado es complementaria de una de las hebras del DNA molde, como ocurre en el caso del RNA sintetizado sobre el DNA del virus ϕ X174 de una sola hebra (Tabla 4.3). Los *experimentos de hibridación* han demostrado que el RNA sintetizado por la RNA polimerasa es complementario del

TABLA 4.3 Composición de bases (en porcentaje) del RNA sintetizado a partir de un molde de DNA vírico

DNA molde (cadena positiva o codificadora del φX174)		RNA producto	
A	25	25	U
T	33	32	A
G	24	23	C
C	18	20	G

5'—CCGGGGACGCGCAGUUAAUCCCACAGCCGCCAGUUCGGCGGGCAUUUU—3'
 mRNA
 3'—CGCCGCTGCGCGTCATTAGGTGTCGGCGGTCAAGGGGACCCCCGTAAA—5'
 Hebra molde de DNA
 5'—GGGGGGACGGGAGTTAACCCCACAGCCGCCAGTTCGGCGGGCATTTT—3'
 Hebra codificadora de DNA

Figura 4.26 Complementariedad entre mRNA y DNA. La secuencia de bases del mRNA (en rojo) es la complementaria de la hebra molde de DNA (en azul). La secuencia aquí representada corresponde a un fragmento del operón del triptófano, un segmento de DNA que contiene los genes para cinco enzimas que catalizan la síntesis de triptófano. La otra hebra de DNA (en negro) se denomina hebra codificadora porque contiene la misma secuencia de bases que el transcripto de RNA, exceptuando la timina (T), que sustituye al uracilo (U).

La transcripción comienza junto a centros promotores y finaliza en los centros de terminación

La RNA polimerasa debe detectar y transcribir genes específicos situados en tramos enormes de DNA. ¿Qué es lo que marca el inicio de una unidad transcripcional? Los DNA moldes contienen regiones llamadas *centros promotores* que se unen específicamente a la RNA polimerasa y determinan dónde comienza la transcripción. En las bacterias, dos secuencias situadas en el extremo 5' ("izquierdo", en inglés conocido como "*upstream*") del primer nucleótido que se va a transcribir funcionan como centros promotores (Figura 4.27A). Una de ellas, llamada *caja Pribnow*, contiene la secuencia consenso TATAAT y está centrada a -10 (diez nucleótidos hacia el lado 5' del primer nucleótido transcrita, que se designa como +1). La otra, llamada *región -35*, tiene la secuencia consenso TTGACA. El primer nucleótido transcrita es normalmente una purina.

Los genes eucarióticos que codifican proteínas poseen centros promotores con una secuencia consenso TATAAA, llamada *caja TATA* o *caja Hogness*, centrada en alrededor de -25 (Figura 4.27B). Muchos promotores eucarióticos también presen-

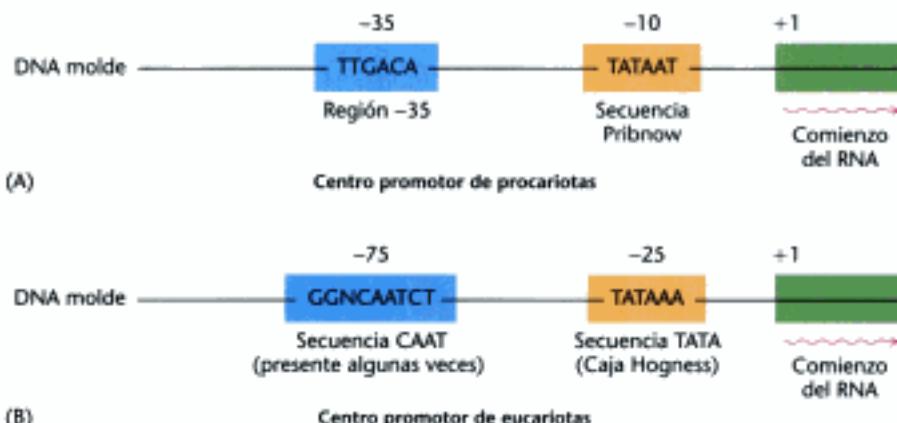


Figura 4.27 Centros promotores de la transcripción en (A) procariotas y en (B) eucariotas. Se señalan las secuencias consenso. El primer nucleótido que se transcribe recibe el número +1. Su nucleótido adyacente por el lado 5' se señala como -1. Las secuencias representadas corresponden a la hebra codificadora del DNA.

tan una caja CAAT con la secuencia consenso GGNCAATCT, centrada en alrededor de -75. La transcripción de los genes eucarióticos se estimula además por las llamadas *secuencias potenciadoras* (*enhancer sequences*) que pueden estar muy lejos (incluso a varias kilobases de distancia) del punto de iniciación tanto hacia el extremo 5' como el 3'.

La RNA polimerasa discurre a lo largo del molde de DNA y transcribe una de sus hebras hasta alcanzar la secuencia de terminación. Esta secuencia codifica una señal de terminación, que en *E. coli* consiste en una *horquilla de bases emparejadas* en la molécula de RNA recién sintetizada (Figura 4.28). Esta horquilla se forma por emparejamiento de bases de secuencias autocomplementarias, ricas en G y C. El RNA naciente se disocia espontáneamente de la RNA polimerasa cuando a la horquilla le sigue una hilera de residuos U. Otras veces, la síntesis de RNA puede terminar por la acción de la proteína *ρ* (ρ). Se sabe mucho menos sobre la terminación de la transcripción en eucariotas. Un estudio más detallado del inicio y la terminación de la transcripción se verá en el Capítulo 29. Lo importante ahora es que *unas señales concretas de iniciación y terminación de la transcripción están codificadas en el molde de DNA*.

En eucariotas, el mRNA se modifica después de la transcripción (Figura 4.29). Una estructura en forma de cofia se une al extremo 5', y una secuencia de adenilatos, la cola poli(A), se añade al extremo 3'. Estas modificaciones se presentarán con detalle en el Capítulo 29.



Figura 4.29 Modificación del mRNA. El RNA mensajero en eucariotas se modifica después de la transcripción. Al extremo 5' se añade un nucleótido "cofia" y el extremo 3' una cola de poli(A).

El RNA de transferencia es la molécula adaptadora en la síntesis de proteínas

Hemos visto que el mRNA es el molde para la síntesis de proteínas. ¿Cómo dirige a los aminoácidos para unirlos en la secuencia correcta y formar una proteína? En 1958, Francis Crick escribía:

El RNA presenta principalmente una secuencia de lugares donde pueden producirse puentes de hidrógeno. Podría esperarse, por ello, que lo que fuera que se aproximase al molde de forma específica lo haría formando puentes de hidrógeno. Por lo tanto, es una hipótesis lógica que una molécula adaptadora transporte a los aminoácidos hacia el molde, y que el adaptador sea la parte que se ajuste realmente al RNA. En su forma simplificada se requerirían veinte adaptadores, uno para cada aminoácido.

Esta hipótesis altamente innovadora pronto vino a ser un hecho consolidado. *El adaptador en la síntesis de proteínas es el RNA de transferencia*. La estructura y las reacciones de estas notables moléculas se estudiarán con detalle en el Capítulo 30. Por el momento es suficiente apuntar que el tRNA contiene *un centro de unión del aminoácido y un centro de reconocimiento del molde*. Cada molécula de tRNA transporta un aminoácido específico en forma activada hasta el lugar de la síntesis de la proteína. El carboxilo de este aminoácido está esterificado al grupo 3'- o 2'-hidroxilo de la ribosa en el extremo 3' de la cadena de tRNA (Figura 4.30). La unión de un aminoácido a una molécula de tRNA para formar un *aminoacil-tRNA* está catalizada por un enzima específico llamado *aminoacil-tRNA sintetasa*. Esta reacción de esterificación está dirigida por la ruptura del ATP. Hay al menos una sintetasa específica para cada uno de los 20 aminoácidos. El lugar de reconocimiento del molde en el tRNA es una secuencia de tres bases llamada el *anticodón* (Figura 4.31). El anticodón del tRNA reconoce una secuencia complementaria de tres bases del mRNA, llamada *codón*.



Figura 4.28 Secuencia de bases del extremo 3' de un transcripto de mRNA de *E. coli*. Una estructura en horquilla estable va seguida por una secuencia de residuos de uridina (U).

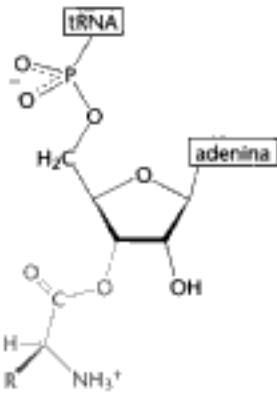


Figura 4.30 Unión de un aminoácido a una molécula de tRNA. El aminoácido (en azul) está esterificado al grupo 3'-hidroxilo del adenosílato terminal del tRNA.

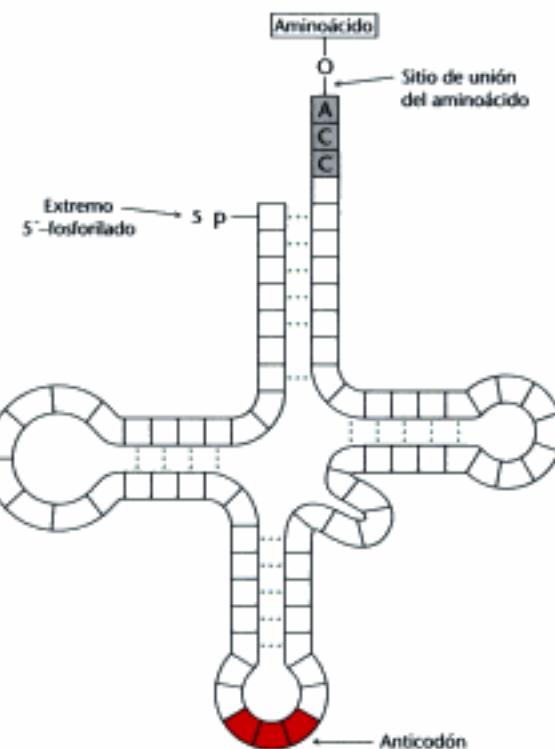


Figura 4.31 Estructura general de un aminoacil-tRNA. El aminoácido se une al extremo 3' del RNA. El anticodón es el sitio de reconocimiento del molde. Nótese que el tRNA tiene una estructura de hoja de trébol con muchos puentes de hidrógeno (puntos verdes) entre las bases.

4.5 Los aminoácidos se codifican por grupos de tres bases comenzando desde un punto fijo

El *código genético* es la relación entre la secuencia de bases en el DNA (o de su RNA transcrita) y la secuencia de aminoácidos en las proteínas. En 1961, los experimentos de Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana, Francis Crick, Sydney Brenner y otros establecieron las siguientes características del código genético:

1. *Tres nucleótidos codifican un aminoácido.* Las proteínas se construyen a partir de un repertorio básico de 20 aminoácidos, pero tan solo hay cuatro bases. Cálculos simples bastan para demostrar que, para codificar al menos 20 aminoácidos, se requiere un mínimo de tres bases. Los experimentos genéticos indicaron que *un aminoácido está, de hecho, codificado por un grupo de tres bases o codón*.
2. *El código no se solapa.* Consideremos una secuencia de bases ABCDEF. En un código con solapamiento, ABC especificaría el primer aminoácido, BCD el siguiente, CDE el siguiente, y así sucesivamente. En un código sin solapamiento, ABC designaría al primer aminoácido, EFG al segundo y lo mismo en adelante. De nuevo, los experimentos genéticos establecieron que el código es sin solapamiento.
3. *El código no tiene puntuación.* En principio, una base (denotada como Q) podría servir como una "coma" entre grupos de tres bases.

...QABCQDEFQGHIQJKLQ...

Este no es el caso. Más bien, la secuencia de bases se lee secuencialmente a partir de un punto fijo de partida, sin puntuación.

4. *El código genético está degenerado.* Algunos aminoácidos están codificados por más de un codón, puesto que existen 64 posibles tripletes de bases y sólo 20 aminoácidos. De hecho, 61 de los 64 posibles tripletes especifican a un aminoácido particular y 3 tripletes (llamados *codones stop*) designan la terminación de la traducción. Por tanto, *para la mayoría de los aminoácidos, hay más de un vocabulario codificador*.

Los 64 codones se han descifrado (Tabla 4.4). Debido a que el código es muy degenerado, solamente el triptófano y la metionina están codificados por un solo triplete. Los otros 18 aminoácidos vienen codificados por dos o más tripletes. De hecho, la leucina, la arginina y la serina están especificadas por seis codones cada uno. El número de codones para un aminoácido determinado está correlacionado con su frecuencia de aparición en la proteína.

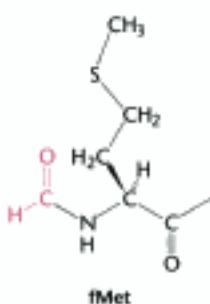
TABLA 4.4 El código genético

Primera posición (extremo 5')	Segunda posición				Tercera posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Nota: Esta tabla identifica el aminoácido codificado por cada triplete. Por ejemplo, el codón 5' AUG 3' del mRNA especifica metionina, mientras que CAU especifica histidina. UAA, UAG y UGA son señales de terminación (stop). AUG es parte de la señal de iniciación, además de codificar las metioninas internas.

Los codones que especifican al mismo aminoácido se llaman *sinónimos*. Por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para la histidina. Obsérvese que los sinónimos no están distribuidos arbitrariamente en el código genético (representados en la Tabla 4.4). Un aminoácido especificado por dos o más sinónimos ocupa una sola casilla (a no ser que los sinónimos fueran más de cuatro). Los aminoácidos de cada casilla son especificados por codones que tienen las dos primeras bases iguales pero difieren en la tercera, como por ejemplo GUU, GUC, GUA y GUG. Así pues, *la mayoría de los sinónimos difieren únicamente en la última base del triplete*. La revisión del código muestra que XYC y XYU codifican siempre al mismo aminoácido, mientras que XYG y XYA lo hacen casi siempre. La base estructural para estas equivalencias se hará evidente cuando estudiemos la naturaleza de los anticodones de las moléculas de tRNA (Sección 30.3).

¿Cuál es el significado biológico de la degeneración generalizada del código genético? Si el código no fuera degenerado, 20 codones designarían aminoácidos y los otros 44 conducirían a la terminación de la cadena. La probabilidad de mutación que originase la terminación de la cadena sería, por tanto, mucho mayor con un código no degenerado. Las mutaciones de terminación de la cadena generalmente conducen a proteínas inactivas, mientras que las sustituciones de un aminoácido por otro son generalmente inocuas. Además el código está construido de tal manera que un cambio de una sola base de un nucleótido produce un sinónimo o un aminoácido con propiedades químicas semejantes. Así pues, *la degeneración reduce al mínimo los efectos deletéreos de las mutaciones*.



El RNA mensajero contiene señales de iniciación y de parada para la síntesis de proteínas

El RNA mensajero se traduce a proteínas en los *ribosomas*, grandes complejos moleculares compuestos de proteínas y RNA ribosomal. ¿Cómo interpreta el aparato de traducción el mRNA? En las bacterias, la señal de iniciación de la síntesis proteica es compleja. Las cadenas polipeptídicas en las bacterias comienzan con un aminoácido modificado: la formilmetionina (fMet). Un tRNA específico, el tRNA iniciador, transporta la fMet. Este complejo fMet-tRNA reconoce al codón AUG o, menos frecuentemente, al GUG. Sin embargo, AUG es también el codón para una metionina interna y GUG lo es de una valina interna. Así pues, la señal para el primer aminoácido de una cadena polipeptídica de procariotas debe ser mucho más compleja que para el resto. *AUG* (*o GUG*) es solo parte de la señal de iniciación (Figura 4.32). En las bacterias, el codón AUG (o GUG) de iniciación viene precedido por una secuencia rica en purinas, llamada *secuencia Shine-Dalgarno*, a varios nucleótidos de distancia, que puede emparejarse con una secuencia complementaria de la molécula de RNA ribosomal (Sección 30.3). En los eucariotas, el AUG más próximo al extremo 5' de una molécula de mRNA es normalmente la señal de iniciación para la síntesis de la proteína. Este AUG particular es leído por un tRNA iniciador especial, cargado con metionina. Una vez que se localiza el AUG iniciador, queda establecido el *marco de lectura* ("reading frame"): se definen grupos de tres nucleótidos no solapados, comenzando por el codón iniciador AUG.

Como ya se ha mencionado, *UAA*, *UAG* y *UGA* designan la terminación de la cadena. Estos codones no son leídos por moléculas de tRNA pero sí por proteínas específicas llamadas *factores de liberación* (Sección 30.3). La unión de los factores de liberación a los ribosomas libera la proteína recién sintetizada.

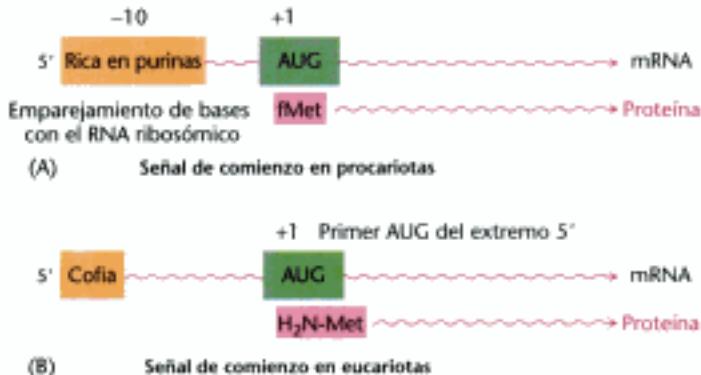


Figura 4.32 Iniciación de la síntesis de proteínas. Se requieren señales de partida para la iniciación de la síntesis de proteínas en (A) procariotas y (B) eucariotas.

El código genético es prácticamente universal

¿Y...? ¿Es el código genético el mismo en todos los organismos? Se conocen ya las secuencias de bases de muchos genes salvajes y mutantes, así como las secuencias de aminoácidos de las proteínas que codifican. En todos los casos, el cambio de nucleótido en el gen y el cambio de aminoácidos en la proteína se producen de acuerdo con lo pronosticado por el código genético. Además, los mRNAs pueden ser traducidos correctamente por la maquinaria sintetizadora de proteínas de especies muy diferentes. Así, por ejemplo, el mRNA de la hemoglobina humana se traduce correctamente con un extracto de germen de trigo, y las bacterias expresan eficazmente las moléculas de DNA recombinante que codifican proteínas humanas, tales como la insulina. Estos resultados experimentales sugieren firmemente que el código genético es universal.

Cuando se descubrió la secuencia del DNA mitocondrial humano, apareció algo sorprendente. Las mitocondrias humanas leen el triplete UGA como codón para el triptófano, en vez de señal de stop (Tabla 4.5). Además, AGA y AGG se leen como señales stop en vez de codificar a la arginina y AUA se lee como codón de la metio-

TABLA 4.5 Codones característicos de las mitocondrias humanas

Codón	Código estándar	Código mitocondrial
UGA	Stop	Trp
UGC	Trp	Trp
AUA	Ile	Met
AUG	Met	Met
AGA	Arg	Stop
AGG	Arg	Stop

nina en vez de la isoleucina. Las mitocondrias de otras especies, como las de la levadura, también utilizan un código genético ligeramente distinto del estándar. El código genético de las mitocondrias puede diferir del resto de la célula debido a que el DNA mitocondrial codifica una serie diferente de tRNAs. ¿Existe algún tipo de sistema celular de síntesis de proteínas que se desvíe del código genético estándar? Por lo menos, hay 16 organismos que se desvían del código genético universal. Los protozoos ciliados difieren de la mayoría de los organismos en que leen los tripletes UAA y UAG como codones para aminoácidos en lugar de señales de stop; su única señal de terminación es UGA. Así pues, *el código genético es prácticamente, pero no absolutamente, universal*. Existen variaciones en mitocondrias y en especies, como los ciliados, que se separaron muy pronto en la evolución de los eucariotas. Es interesante advertir que dos de los codones reasignados en las mitocondrias humanas disminuyen el contenido de información de la tercera base del triplete (por ejemplo, tanto AUA como AUG codifican metionina). La mayoría de las modificaciones observadas respecto al código genético estándar van en la dirección de un código más simple.

¿Por qué ha permanecido casi invariable el código genético después de miles de millones de años de evolución, desde las bacterias hasta los seres humanos? Una mutación que alterase la lectura del mRNA cambiaría la secuencia de aminoácidos de la mayoría, si no de todas las proteínas sintetizadas por ese organismo particular. Muchos de estos cambios serían indiscutiblemente deletéreos y por ello se produciría una fuerte selección contra una mutación de consecuencias tan devastadoras.

4.6 La mayoría de los genes de eucariotas son mosaicos de intrones y exones

En las bacterias, las cadenas polipeptídicas están codificadas por una disposición continua de codones: tripletes del DNA. Durante muchos años se había supuesto que los genes en los organismos superiores también eran continuos. Esta consideración fue inesperadamente desechada en 1977, cuando varios investigadores, como Philip Sharp y Richard Roberts descubrieron que diversos genes eran *discontinuos*. La naturaleza de mosaico de los genes eucarióticos se descubrió por estudios de microscopía electrónica sobre híbridos formados entre el mRNA y un segmento de DNA que contiene el gen correspondiente (Figura 4.33). Por ejemplo, el gen para la cadena β de la hemoglobina está interrumpido dentro de su secuencia de codificación de aminoácidos por una larga *secuencia intercalada* de 550 pares de bases y otra secuencia corta de 120 pares de bases. Así pues, *el gen de la β -globina está fragmentado en tres secuencias codificadoras*. Un gen humano medio tiene 8 intrones y algunos genes, más de 100. El tamaño medio de un intrón varía desde 50 a 10 000 nucleótidos.

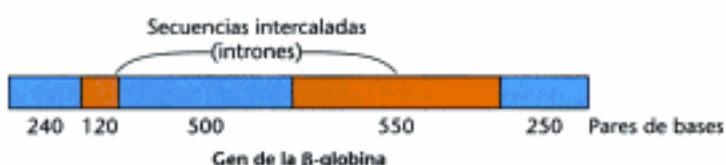


Figura 4.33 Reconocimiento de secuencias intercaladas por microscopía electrónica. Una molécula de mRNA (representada en rojo) se hibrida con el DNA genómico que contiene el gen correspondiente. (A) Si el gen es continuo, aparece un único bucle de DNA de una sola hebra (en azul). (B) Si el gen contiene una secuencia intercalada aparecen dos bucles de DNA de una sola hebra (en azul) y un bucle de DNA de doble hebra (en azul y verde). Si existe más de un intrón aparecen bucles adicionales.

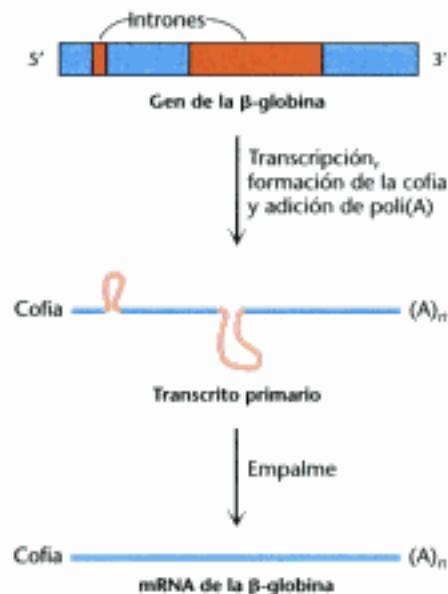
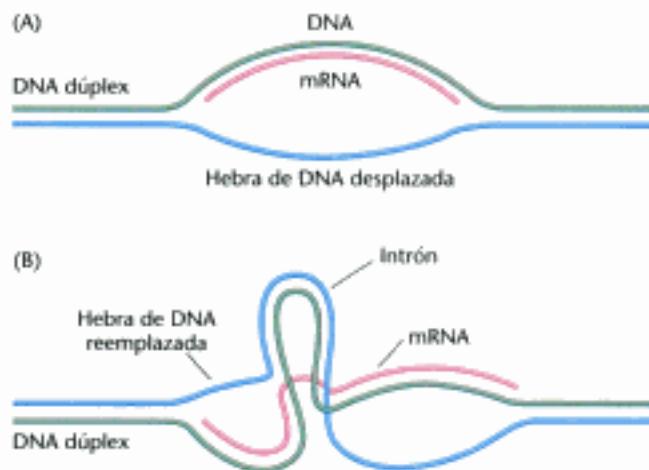


Figura 4.34 Transcripción y procesado del gen de la β -globina. El gen se transcribe para producir el transcrito primario, el cual se modifica por la adición de la cofia y la secuencia poli(A). Los intrones en el RNA transcritto primario se eliminan para formar mRNA maduro.

El procesamiento del RNA genera el RNA maduro

¿En qué fase de la expresión génica se eliminan los intrones? Las cadenas de RNA recién sintetizadas (pre-mRNA o transcritos primarios) aisladas de núcleos son mucho mayores que las moléculas de mRNA derivadas de ellas; en el caso del RNA de la β -globina, el primero sedimenta en 15S en experimentos de centrifugación zonal (p. 76) y el segundo en 9S. De hecho, el transcripto primario del gen de la β -globina contiene dos regiones que no están presentes en el mRNA. *Estas regiones del transcripto primario de 15S se escinden y las secuencias codificadoras se empalman simultáneamente por la acción de un enzima determinado de conexión que forma el mRNA maduro de 9S* (Figura 4.34). Las regiones que se eliminan de este transcripto primario se llaman *intrones* (que viene de secuencias *intercaladas*, en inglés “*intervening*”), mientras que aquellas que se mantienen en el mRNA maduro se denominan *exones* (que significa regiones expresadas, en inglés “*expressed*”). Un aspecto común de la expresión de estos genes entrecortados es que sus exones están ordenados en la misma secuencia en el mRNA y en el DNA. Así pues, los genes entrecortados, como los genes continuos, son colineales con sus productos polipeptídicos.

El entrecortado (“*splicing*”) es una operación compleja, realizada por los “*spliceosomas*”, que son asociaciones de proteínas y pequeñas moléculas de RNA. El RNA ejerce una función catalítica (Sección 29.3). Esta maquinaria enzimática reconoce las señales del RNA naciente que especifican los puntos de corte. *Los intrones casi siempre empiezan con GU y terminan con una pareja AG, precedida de un tramo rico en pirimidinas* (Figura 4.35). *Esta secuencia consenso forma parte de la señal de empalme*.

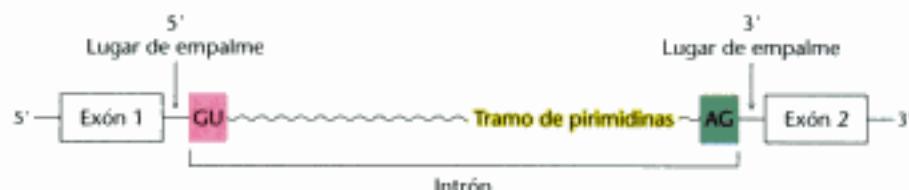


Figura 4.35 Secuencia consenso para el corte y empalme de precursores de mRNAs.

Muchos exones codifican dominios de proteínas

La mayoría de los genes de los eucariotas superiores, tales como las aves y los mamíferos, están entrecortados. Los eucariotas inferiores, como las levaduras, tienen una mayor proporción de genes continuos. En procariotas, los genes fragmentados se dan en muy rara ocasión. ¿Acaso los intrones se han introducido en los genes de los organismos superiores durante la evolución? ¿O más bien los intrones han sido eliminados de los genes, para formar genomas rectilíneos en los procariotas y los eucariotas más sencillos? La comparación entre secuencias de DNA de

genes que codifican proteínas muy conservadas durante la evolución, sugiere que *había intrones en los genes ancestrales y que se perdieron durante la evolución en aquellos organismos especializados en un crecimiento muy rápido, tales como los prokariotas*. Las posiciones de los intrones en algunos genes datan al menos desde hace 1000 millones de años. Además, el mecanismo común de empalme se desarrolló antes de la divergencia entre hongos, plantas y vertebrados, como se ha demostrado al comprobar que los extractos celulares de mamíferos son capaces de empalmar RNAs de levadura.

¿Qué ventajas puede aportar el empalmado de los genes? *Muchos exones codifican unidades discretas estructurales y funcionales de proteínas*. Una hipótesis muy atractiva es que *las proteínas nuevas aparecen durante la evolución por reordenamiento de los exones que codifican elementos estructurales discretos, centros de unión y centros catalíticos*, proceso conocido como *reestructuración o barajado de exones*. La reestructuración de exones es una manera rápida y eficaz de crear nuevos genes, porque se preservan las unidades funcionales, pero se les permite interactuar de formas inéditas (Figura 4.36). Los intrones son regiones extensas en las que el DNA puede romperse y recombinarse sin que se produzcan efectos perjudiciales sobre las proteínas codificadas. Por el contrario, el intercambio de secuencias entre diferentes exones lleva normalmente a una pérdida de función.

Otra ventaja derivada de la fragmentación de los genes es la posibilidad de originar una familia de proteínas emparentadas empalmando los transcritos del RNA naciente de maneras diferentes. Por ejemplo, un precursor de una célula productora de anticuerpos forma un anticuerpo que se queda anclado en la membrana plasmática de la célula (Figura 4.37). El anticuerpo unido reconoce a un antígeno específico extraño, y ello conduce a la diferenciación y proliferación celular. Las células productoras de anticuerpos, al ser activadas, empalman sus transcritos de RNA naciente de una forma alternativa para crear moléculas de anticuerpos solubles que se secretarán en vez de quedar retenidas en la superficie celular. Aquí vemos un ejemplo claro de un beneficio aportado por el ordenamiento complejo de intrones y exones en los organismos superiores. *Los diferentes ensamblajes constituyen una manera simple de crear una serie de proteínas que constituyen pequeñas variaciones sobre un modelo básico, de acuerdo con un plan programado sin requerir un gen para cada proteína*.

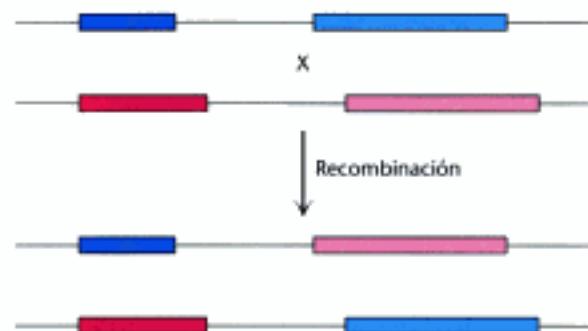


Figura 4.36 Reestructuración de exones. Los exones se pueden reorganizar mediante la recombinación del DNA para ampliar el repertorio genético.

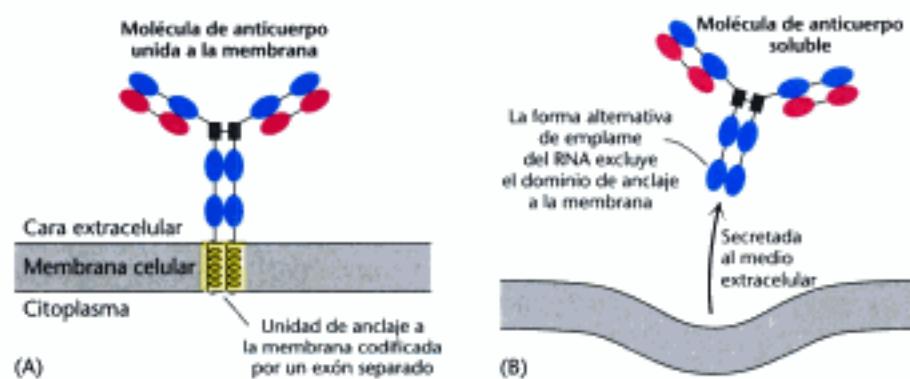


Figura 4.37 Empalmes alternativos. Los empalmes alternativos originan mRNAs que actúan como moldes para diferentes formas de una proteína: (A) un anticuerpo unido a la membrana en la superficie de un linfocito, y (B) su contrapartida soluble, excretada por la célula. El anticuerpo unido está anclado a la membrana plasmática por medio de un segmento helicoidal (en amarillo) codificado por su exón propio.

Resumen

4.1 Un ácido nucleico consiste en cuatro clases de bases ligadas a un eje de azúcar fosfato

El DNA y RNA son polímeros lineales de un número limitado de monómeros. En el DNA, las unidades repetitivas son nucleótidos con el azúcar desoxirribosa y las bases adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). En el RNA,

el azúcar es la ribosa y se utiliza la base uracilo (U) en lugar de la timina. El DNA es la molécula de la herencia en todos los organismos procarióticos y eucarióticos. En los virus, el material genético puede ser DNA o bien RNA.

4.2 Una pareja de cadenas de ácido nucleico con secuencias complementarias puede formar una estructura de doble hélice

Todos los DNA celulares constan de dos largas cadenas de polinucleótidos helicoidales enrolladas a lo largo de un eje común. El eje azúcar-fosfato de cada una de las hebras está situado hacia el exterior de la doble hélice y las bases púricas y pirimidínicas están en el interior. Las dos cadenas están unidas por puentes de hidrógeno entre las parejas de bases: la adenina está siempre emparejada con la timina y la guanina está siempre emparejada con la citosina. Por lo tanto, uno de los filamentos de la doble hélice es complementario del otro. Las dos hebras de la doble hélice discurren en sentidos opuestos. La información genética está codificada por la secuencia precisa de bases a lo largo de una hebra. La mayor parte de moléculas de RNA son de hebra simple, pero muchas de ellas contienen regiones extensas de doble hélice que surgen del plegamiento de la cadena en forma de horquillas.

4.3 Las polimerasas replican el DNA a partir de las instrucciones de moldes

En la replicación del DNA, las dos hebras de una doble hélice se desenrollan y separan a medida que se sintetizan las nuevas cadenas. Cada hebra parental actúa como molde para la formación de una nueva hebra complementaria. Así pues, la replicación del DNA es semiconservativa —cada molécula hija recibe una de las hebras de la molécula DNA parental. La replicación del DNA es un proceso complejo en el que intervienen muchas proteínas, incluyendo varias DNA polimerasas. Los precursores activados en la síntesis del DNA son los cuatro desoxirribonucleósidos 5'- trifosfato. La nueva cadena se sintetiza en dirección 5' → 3' por un ataque nucleofílico de los hidroxilos 3' terminales de la cadena cebadora sobre los átomos de fósforo más internos del desoxirribonucleósido trifosfato recién llegado. Lo más importante es que las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster solamente si la base del nucleótido recién llegado es complementaria de la base que está situada en la cadena molde. En otras palabras, las DNA polimerasas son enzimas dirigidas por molde. Los genes de algunos virus, tales como el virus del mosaico del tabaco, están formados por RNA de hebra simple. Este RNA vírico se replica mediante una RNA polimerasa dirigida por RNA. Los retrovirus, por ejemplo el HIV-1, tienen un genoma de RNA de hebra simple que se transcribe a un DNA de doble hebra mediante la transcriptasa inversa, una DNA polimerasa dirigida por RNA.

4.4 La expresión génica es la transformación de la información del DNA en moléculas funcionales

El flujo de la información genética en células normales va desde el DNA hasta el RNA y las proteínas. La síntesis de un RNA a partir de DNA molde se llama transcripción y la síntesis de una proteína a partir de un molde de RNA se llama traducción. Las células contienen varios tipos de RNA, entre los cuales están el RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosómico (rRNA) y sus tamaños oscilan desde los 75 a más de 500 nucleótidos. Todo el RNA celular se sintetiza por las RNA polimerasas según las instrucciones dadas por un DNA molde. Los intermedios activados son los ribonucleósidos trifosfato y la dirección de la síntesis es 5' → 3', semejante a la síntesis del DNA. Las RNA polimerasas difieren de la DNA polimerasa en que no requieren un cebador.

4.5 Los aminoácidos están codificados por grupos de tres bases partiendo de un punto fijo

El código genético es la relación entre la secuencia de bases del DNA (o de su RNA transcrita) y la secuencia de aminoácidos en las proteínas. Los aminoácidos

dos están codificados por grupos de tres bases (llamados codones) partiendo de un punto fijo. Sesenta y uno de los 64 codones especifican aminoácidos particulares mientras que los otros tres codones (UAA, UAG y UGA) son las señales para la terminación de la cadena. Así pues, para la mayoría de los aminoácidos hay más de un vocablo del código. En otras palabras, el código es degenerado. El código genético es prácticamente el mismo para todos los organismos. Los mRNAs naturales contienen señales de comienzo y de final de la traducción, igual como hacen los genes para dirigir dónde comienza y termina su transcripción.

4.6 La mayoría de los genes eucarióticos son mosaicos de intrones y exones

La mayoría de los genes de los eucariotas superiores son discontinuos. Las secuencias codificadoras (exones) de estos genes divididos están separadas por secuencias espaciadoras (intrones), que se excluyen durante la transformación del transcripto primario en mRNA y otras moléculas funcionales de RNA maduro. Los genes fragmentados, al igual que los genes continuos, son colineales con sus productos polipeptídicos. Un aspecto muy llamativo de muchos exones es que codifican dominios funcionales de proteínas. Durante la evolución han aparecido probablemente proteínas nuevas por intercambio de exones. Los intrones pudieron estar presentes en los genes primordiales, pero se perdieron durante la evolución de aquellos organismos de crecimiento rápido, como son las bacterias y las levaduras.

Términos clave

doble hélice (p. 107)	cebador (p. 117)	codón (p. 123)
desoxirribosa (p. 108)	molde (p. 117)	código genético (p. 124)
ribosa (p. 108)	transcriptasa inversa (p. 118)	ribosoma (p. 126)
ácido desoxirribonucleico (DNA) (p. 108)	RNA mensajero (mRNA) (p. 119)	secuencia Shine-Dalgarno (p. 126)
ácido ribonucleico (RNA) (p. 109)	traducción (p. 119)	exón (p. 127)
purina (p. 109)	RNA de transferencia (tRNA) (p. 120)	"splicing" (p. 128)
pirimidina (p. 109)	RNA ribosómico (rRNA) (p. 120)	entrecortado "splicing" (p. 128)
nucleósido (p. 109)	RNA nuclear pequeño (snRNA) (p. 120)	spliceosomas (p. 128)
nucleotídeo (p. 109)	transcripción (p. 120)	reestructuración de exones (p. 129)
replicación semiconservativa (p. 113)	RNA polimerasa (p. 120)	ensamblajes alternativos (p. 129)
DNA polimerasa (p. 117)	centro promotor (p. 122)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. Am.* 253(4):58–67.
Darnell, J. E., Jr. 1985. RNA. *Sci. Am.* 253(4):68–78.
Dickerson, R. E. 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Am.* 249(6):94–111.
Crick, F. H. C. 1954. The structure of the hereditary material. *Sci. Am.* 191(4): 54–61.
Chambon, P. 1981. Split genes. *Sci. Am.* 244(5):60–71.
Watson, J. D. y Crick, F. H. C. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738.
Watson, J. D. y Crick, F. H. C. 1953. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964–967.
Meselson, M. y Stahl, F. W. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:671–682.

Libros

- Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., Tinoco, I. y Hearst, J. 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*. University Science Books.

Singer, M. y Berg, P. 1991. *Genes and Genomes: A Changing Perspective*. University ScienceBooks

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L. y Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology* 5th ed.). W. H. Freeman and Company.

Lewin, B. 2004. *Genes VIII*. Oxford University Press.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. 2004. *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). Benjamin Cummings.

Estructura del DNA

- Saenger, W. 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer Verlag.
Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V. y Kopka, M. L. 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216:475–485.
Sinden, R. R. 1994. *DNA Structure and Function*. Academic Press.

Replicación del DNA

- Lehman, I. R. 2003. Discovery of DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278:34733–34738.

- Hübscher, U., Maga, G. y Spardari, S. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71:133–163.
- Hübscher, U., Nasheuer, H.-P. y Syväoja, J. E. 2000. Eukaryotic DNA polymerases: A growing family. *Trends Biochem. Sci.* 25:143–147.
- Bruning, C. A. y Steltz, T. A. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:54–63.
- Kornberg, A. y Baker, T. A. 1992. *DNA Replication* (2d ed.). W. H. Freeman and Company.

Descubrimiento del RNA mensajero

- Jacob, F. y Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318–356.
- Brenner, S., Jacob, F. y Meselson, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576–581.
- Hall, B. D. y Spiegelman, S. 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47:137–146.

Código genético

- Freeland, S. J. y Hurst, L. D. 2004. Evolution encoded. *Sci. Am.* 290(4):84–91.
- Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S. y Watts-Tobin, R. J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227–1232.
- Nirenberg, M. 1968. The genetic code. In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1963–1970), pp. 372–395. American Elsevier (1973).
- Crick, F. H. C. 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12:138–163.
- Woese, C. R. 1967. The Genetic Code. Harper & Row.
- Knight, R. D., Freeland, S. J. y Landweber, L. F. 1999. Selection, history and chemistry: The three faces of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 24(6):241–247.

Problemas

- Complementarios.** Escribir la secuencia complementaria (en la anotación estándar 5' → 3') de: (a) GATCAA, (b) TCGAAC, (c) ACGCGT y (d) TACCAT.
- Composición limitada.** La composición (en unidades de fracción molar) de una de las hebras de un DNA de doble hélice es [A] = 0.30 y [G] = 0.24. (a) ¿Qué puede decirse de las bases [T] y [C] de la misma hebra? (b) ¿Qué puede decirse acerca de las bases [A], [G], [T] y [C] de la cadena complementaria?
- DNA perdido.** El DNA de un mutante por delección del bacteriófago λ tiene una longitud de 15 μm en lugar de 17 μm. ¿Cuántos pares de bases se han perdido por esta mutación?
- Un modelo no visto.** ¿Qué resultado hubieran obtenido Meselson y Stahl si la replicación del DNA fuera conservativa (es decir, la doble hélice parental se mantuviese junta)? Dar la distribución esperada de moléculas de DNA después de las generaciones 1 y 2 para una replicación conservativa.
- Marcaje del DNA.** (a) Suponer que se desea marcar DNA con radioactividad sin marcar el RNA, en células bacterianas en división y crecimiento. ¿Qué molécula radiactiva se deberá añadir al medio de cultivo? (b) Supongamos que se desea preparar un DNA con sus átomos de fósforo estructurales marcados uniformemente con ^{32}P . ¿Qué precursores habría que añadir a una disolución que contuviera DNA polimerasa I y DNA molde cebador? Señalar la posición de los átomos radiactivos en estos precursores.
- En busca de un molde.** Una disolución acuosa contiene DNA polimerasa I y las sales magnésicas de dATP, dGTP, dCTP y TTP. A

Intrones, exones y genes fragmentados

- Sharp, P. A. 1988. RNA splicing and genes. *J. Am. Med. Assoc.* 260:3035–3041.
- Dorit, R. L., Schoenbach, L. y Gilbert, W. 1990. How big is the universe of exons? *Science* 250:1377–1382.
- Cochet, M., Gannon, E., Hen, R., Maroteaux, L., Perrin, F. y Chambon, P. 1979. Organization and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene. *Nature* 282:567–574.
- Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Seidman, J. G., Peterlin, B. M., Sullivan, M., Maizel, J. V. y Leder, P. 1978. Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse β-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:725–729.

Memorias y relatos históricos

- Clayton, J. y Dennis, C. (Eds.), 2003. *50 Years of DNA*. Palgrave Macmillan.
- Watson, J. D. 1968. *The Double Helix*. Atheneum.
- McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle: Discovering That Genes Are Made of DNA*. Norton, 290(4):84–91.
- Cairns, J., Stent, G. S. y Watson, J. D. 2000. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Olby, R. 1974. *The Path to the Double Helix*. University of Washington Press.
- Portugal, E. H. y Cohen, J. S. 1977. *A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance*. MIT Press.
- Judson, H. F. 1996. *The Eighth Day of Creation*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sayre, A. 2000. *Rosalind Franklin and DNA*. Norton.

diferentes aliquotas de esta disolución se les añaden las moléculas de DNA que se indican a continuación. ¿Cuáles de ellas conducirían a la síntesis de DNA? (a) Un círculo cerrado de una única hebra que contiene 1000 nucleótidos. (b) Un círculo cerrado de doble hebra que contiene 1000 pares de nucleótidos. (c) Un círculo cerrado de una hebra que contiene 1000 nucleótidos emparejados con un hebra lineal de 500 nucleótidos con el extremo 3'-OH libre. (d) Una molécula lineal de doble hebra que contiene 1000 pares de nucleótidos, con el grupo 3'-OH libre en cada uno de los extremos.

7. **El comienzo correcto.** Supongamos que se quiere ensayar la actividad de la transcriptasa inversa. Si el molde es de polirriboadenilato, ¿qué deberá emplearse como cebador? ¿Qué nucleótido radiactivo deberá utilizarse para continuar la elongación de la cadena?

8. **Degradeación esencial.** La transcriptasa inversa tiene actividad ribonucleasa así como polimerasa. ¿Cuál es la función de esta actividad ribonucleásica?

9. **Caza de virus.** Se ha purificado un virus que infecta las hojas de tulipán. Tratando una muestra con fenol se eliminan las proteínas víricas. Cuando se aplica el material residual a hojas raspadas se consigue obtener progenie de las partículas víricas. De ello se deduce que la sustancia infecciosa es un ácido nucleico. Proponer un método simple y muy sensible para determinar si el ácido nucleico infeccioso es DNA o RNA.

10. **Consecuencias mutagénicas.** La desaminación espontánea de las citosinas del DNA tiene lugar con una frecuencia baja pero medible. La citosina se transforma en uracilo por pérdida de su grupo amino. Después de esa transformación, ¿qué pareja de bases ocupará esta

posición en cada una de las hebras hijas en la primera generación? ¿Y en la segunda generación?

11. *Contenido informativo.* (a) ¿Cuántas secuencias octaméricas de DNA diferentes existen? (Ayuda: existen 16 dinucleótidos posibles y 64 trimucleótidos posibles.) Podemos medir la capacidad de transportar información de los ácidos nucleicos de la siguiente manera. En cada posición puede estar una de las cuatro bases, lo que corresponde a dos bits de información ($2^2 = 4$). Así pues, a una cadena de 5.100 nucleótidos le corresponden $2 \times 5.100 = 10.200$ bits, o bien, 1.275 bytes (1 byte = 8 bits). (b) ¿Cuántos bits de información se almacenan en una secuencia de DNA octamérica? ¿Y en el genoma de *E. coli*? ¿Y en el genoma humano? (c) Comparar cada uno de estos valores con la cantidad de información que se puede almacenar en un CD-ROM.

12. *Polymerasas clave.* Comparar la DNA polimerasa I y la RNA polimerasa de *E. coli* en relación con cada una de las características siguientes: (a) precursores activados, (b) dirección de crecimiento de la cadena, (c) conservación del molde y (d) necesidad de un cebador.

13. *Secuencias codificadas.* (a) Escribir la secuencia de la molécula de mRNA sintetizada a partir de una cadena de DNA molde que presenta la siguiente secuencia,



(b) ¿Qué secuencia de aminoácidos codifica la siguiente secuencia de bases de una molécula de mRNA? Se supone que el fragmento leído comienza en el extremo 5'.



(c) ¿Cuál es la secuencia del polipéptido formado por la adición de poli(UUAC) a un sistema de síntesis de proteínas libres de células?

14. *Una cadena más resistente.* El RNA se hidroliza fácilmente por un álcali, pero el DNA, no. ¿Por qué?

15. *Un potente bloqueante.* ¿Cómo bloquea la cordicepina (3'-desoxiadenosina) la síntesis del RNA?

16. *RNA silencioso.* El vocablo del código GGG no se puede desifrar de la misma forma que se descifra UUU, CCC y AAA porque el poli(G) no actúa como molde. El poli(G) forma una estructura helicoidal de triple hebra. ¿Por qué este molde no es efectivo?

17. *Dos de uno.* Moléculas sintéticas de RNA de secuencia definida fueron instrumentos para el desciframiento del código genético. Su síntesis requirió en primer lugar la síntesis de moléculas de DNA que servían de molde. H. Gobin Khorana sintetizó, por métodos químico-orgánicos, dos desoxirribonucleótidos complementarios, con nueve residuos cada uno: d(TAC)₃ y d(GTA)₃. Al mezclar estos oligonucleótidos se formaron unos duplex con hebras parcialmente solapadas. Estos, sirvieron después como moldes para la síntesis, por la DNA polimerasa, de largas cadenas repetidas de DNA de doble

hebra. El siguiente paso consistía en obtener cadenas largas de polirribonucleótido que contuviesen una secuencia complementaria a una sola de las dos hebras de DNA. ¿Cómo obtuvo solamente poli(UAC)? ¿Y sólo poli(GUA)?

18. *Solapamiento o no.* En un código de tripletes no solapado, cada grupo de tres bases de una secuencia ABCDEF... especifica solamente un aminoácido: ABC especifica el primero, DEF el segundo y así sucesivamente – mientras que en un código de tripletes totalmente solapado, ABC especifica el primer aminoácido, BCD el segundo, CDE el tercero y así en adelante. Se supone que se puede mutar un solo nucleótido de un código y detectar la mutación en la secuencia de aminoácidos. Diseñar un experimento que estableciera si un código genético se solapa o no.

19. *Triple interpretación.* El RNA transcripto de una región del DNA del fago T4 contiene la secuencia 5'-AAAUGAGGA-3'. Esta secuencia codifica tres polipéptidos diferentes. ¿Cuáles son?

20. *Sinónimos valiosos.* Las proteínas tienen generalmente contenidos bajos en Met y Trp, intermedios en His y Cys, y elevados en Leu y Ser. ¿Cuál es la relación entre el número de codones de un aminoácido determinado y su frecuencia de aparición en las proteínas? ¿Cuál puede ser la ventaja selectiva de esta relación?

21. *Una nueva traducción.* Un RNA de transferencia con el anticodón UGU se marca enzimáticamente utilizando cisteína que contiene ¹⁴C. La cisteína se modifica químicamente a alanina (utilizando niquel Raney que elimina el átomo de azufre de la cisteína). El aminoacil-tRNA, alterado se añade a un sistema sintetizador de proteínas, que contiene todos los componentes normales excepto este aminoacil-tRNA. El mRNA añadido a esta mezcla contiene la siguiente secuencia:



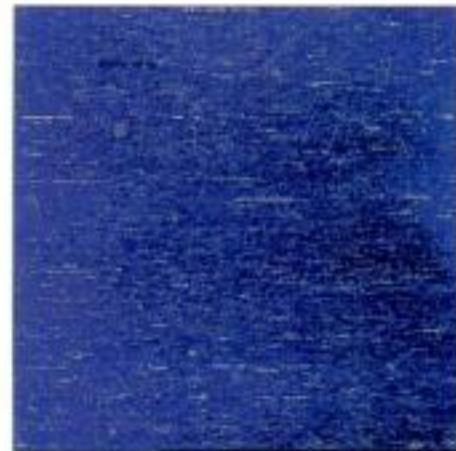
¿Cuál es la secuencia del péptido radiactivo correspondiente?

Problemas de Integración del capítulo

22. *De vuelta a la palestra.* Un químico de proteínas comunicó a un genetista molecular que había encontrado un nuevo mutante de la hemoglobina en el que el aspartato reemplazaba a la lisina. El genetista molecular expresó su sorpresa y pidió a su amigo que viniera rápidamente al laboratorio. (a) ¿Por qué dudaba el genetista molecular sobre la referida sustitución del aminoácido? (b) ¿Qué sustituciones de aminoácidos habrían sido mucho más aceptables para el genetista molecular?

23. *Millones de años de distancia.* Las secuencias de aminoácidos de una proteína de levadura y una proteína humana que desempeñan la misma función son idénticas en un 60%. Sin embargo, las correspondientes secuencias del DNA sólo son idénticas en un 45%. Justificar este diferente grado de identidad.

La investigación de genes y genomas



Procesos como el desarrollo de una mariposa a partir de una oruga implican cambios drásticos en los patrones de expresión génica. Los niveles de expresión de miles de genes se pueden visualizar mediante micromatrices (en inglés, "microarrays") de DNA. A la derecha, un GeneChip muestra los niveles de expresión de más de 12 000 genes humanos; la intensidad de cada mancha indica el nivel de expresión del correspondiente gen. [Izquierda) Roger Hart/Rainbow. (Derecha) GeneChip cortesía de Affymetrix.]

Contenido

- 5.1 La investigación de los genes se basa en unas herramientas básicas
- 5.2 La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado todos los aspectos de la biología
- 5.3 Se han secuenciado y analizado genomas completos
- 5.4 Los genes eucarióticos se pueden manipular con una precisión considerable

Desde su nacimiento en la década de 1970, la tecnología del DNA recombinante ha revolucionado la bioquímica. Hoy en día es posible alterar de manera precisa e intencionada la dotación genética de los organismos. La tecnología del DNA recombinante es el fruto de varias décadas de investigación básica sobre DNA, RNA y virus. Se basa, en primera instancia, en la existencia de enzimas capaces de cortar, unir y replicar el DNA y de realizar la transcripción inversa del RNA. Los enzimas de restricción cortan moléculas muy largas de DNA dando lugar a fragmentos específicos, fáciles de manipular; las DNA ligasas unen los fragmentos entre sí. Hay muchos tipos de enzimas de restricción disponibles. Utilizándolos con habilidad, los investigadores pueden tratar las secuencias de DNA como si fuesen módulos que se pueden mover a voluntad de una molécula de DNA a otra. Por tanto, la tecnología del DNA recombinante se basa en la enzimología de los ácidos nucleicos.

Un segundo fundamento es el lenguaje de emparejamiento de las bases, que permite a las secuencias complementarias reconocerse y unirse entre sí. La hibridación con DNA complementario (cDNA) o con sondas de RNA es un método sensible para detectar secuencias concretas de nucleótidos. En la tecnología del DNA recombinante, el emparejamiento de las bases se utiliza para construir nuevas combinaciones de DNA así como para detectar y amplificar determinadas secuencias. Esta revolucionaria tecnología también depende en gran medida de nuestro conocimiento sobre los virus, los parásitos por excelencia. Los virus introducen su propio DNA (o RNA) de manera eficiente en los hospedadores, obligándoles bien a replicar el genoma vírico y producir proteínas víricas, bien a incorporar el DNA vírico en el genoma del hospedador.

Análogamente, los plásmidos, que son cromosomas accesorios presentes en bacterias, han resultado indispensables para la tecnología del DNA recombinante.

En tercer lugar, se han desarrollado potentes métodos para la secuenciación del DNA. Estos métodos han sido aprovechados para secuenciar genomas completos, primero genomas pequeños procedentes de virus, posteriormente genomas de mayor tamaño procedentes de bacterias y, por último, genomas eucarióticos entre los que se incluye el genoma humano, formado por 3000 millones de pares de bases. Los científicos apenas han empezado a sacar partido de la enorme cantidad de información contenida en estas secuencias genómicas.

Estos nuevos métodos conllevan una amplia gama de beneficios. Se puede investigar el papel de determinados genes y productos génicos en su contexto natural o en otras condiciones. Se pueden crear nuevas proteínas alterando genes de forma concreta para obtener información detallada sobre la función proteica. Hoy en día se sintetizan proteínas de uso clínico, como las hormonas, mediante técnicas de DNA recombinante. Se están generando cosechas resistentes a plagas y a condiciones extremas. Las nuevas expectativas que ofrece la tecnología del DNA recombinante prometen tener repercusiones de aún mayor alcance.

5.1 La investigación de los genes se basa en unas herramientas básicas

El rápido progreso de la biotecnología, de hecho su propia existencia, es el resultado de la aplicación de unas pocas técnicas básicas.

1. *Ánalisis por medio de enzimas de restricción.* Los enzimas de restricción son bisturíes moleculares de precisión que permiten a un investigador manipular segmentos de DNA.
2. *Técnicas de transferencia o "blotting".* Las transferencias Southern y Northern se utilizan para separar y caracterizar DNA y RNA, respectivamente. La transferencia Western, que utiliza anticuerpos para caracterizar proteínas, se describió en la página 88.
3. *Secuenciación del DNA.* Se puede determinar la secuencia nucleotídica precisa de una molécula de DNA. La secuenciación ha dado lugar a abundante información sobre la arquitectura de los genes, el control de la expresión génica y la estructura proteica.
4. *Síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida.* Se pueden sintetizar *de novo* secuencias concretas de ácidos nucleicos y utilizarlas para identificar o amplificar otros ácidos nucleicos.
5. *La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, "polymerase chain reaction").* La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar un segmento de DNA hasta obtener miles de millones de copias. Una molécula de DNA se puede amplificar hasta obtener cantidades que permitan su caracterización y manipulación. Esta poderosa técnica se está utilizando para detectar patógenos y enfermedades genéticas, para determinar la procedencia de un pelo obtenido en la escena de un crimen y para resucitar genes de fósiles.

Un último conjunto de herramientas, cuyo uso ilustraremos en el Capítulo 6, se basa en el ordenador. Sin ordenador, sería imposible catalogar, acceder y caracterizar la abundante información que las técnicas que acabamos de resumir están generando con tanta rapidez, especialmente la información obtenida en forma de secuencias de DNA.

Los enzimas de restricción cortan el DNA en fragmentos específicos

Los enzimas de restricción, también denominados *endonucleasas de restricción*, reconocen determinadas secuencias de bases en el DNA de doble hélice y cortan las dos hebras de ese dúplex en lugares específicos. Para los bioquímicos, estos bisturíes de exquisita precisión constituyen maravillosos regalos de la naturaleza. Son imprescindibles para analizar la estructura de los cromosomas, secuenciar moléculas

Palíndromo

Palabra, frase o verso que se lee igual de derecha a izquierda que de izquierda a derecha.

Radar

Anilina

Dábale arroz a la zorra el abad

Roma tibi subito motibus ibit amor

Del griego palíndromos, "corriendo de nuevo hacia atrás"

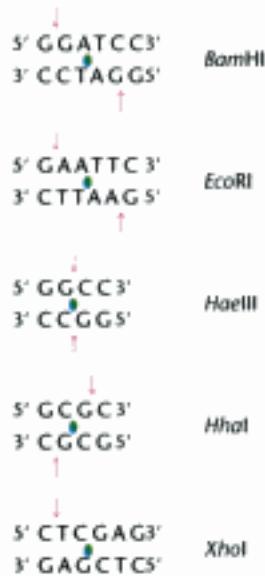
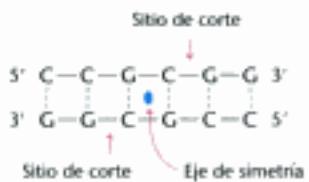


Figura 5.1 Especificidad de algunas endonucleasas de restricción. Las secuencias reconocidas por estos enzimas presentan un eje de simetría binaria. En estas regiones, las dos hebras se relacionan mediante una rotación de 180° en torno al eje marcado por el símbolo verde. Los lugares de corte están señalados mediante flechas rojas. A la derecha de cada secuencia se indica el nombre abreviado del enzima de restricción que la reconoce. Obsérvese que los cortes pueden ser escalonados o al ras.

muy largas de DNA, aislar genes y crear nuevas moléculas de DNA que se puedan clonar. Los enzimas de restricción fueron descubiertos por Werner Arber y Hamilton Smith, y fue Daniel Nathans el primero en utilizarlos a finales de la década de 1960.

Se han encontrado enzimas de restricción en una amplia gama de procariotas. Su función biológica consiste en cortar moléculas foráneas de DNA. El DNA de la propia célula no se degrada porque las secuencias reconocidas por sus propios enzimas de restricción se encuentran metiladas. Muchos enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de entre cuatro y ocho pares de bases e hidrolizan un enlace fosfodiéster de cada una de las hebras de esta región. Una característica notable de estos lugares de corte es que casi siempre poseen *simetría rotacional binaria*. En otras palabras, la secuencia que reconocen es *palindrómica*, o una repetición invertida, y los lugares de corte se disponen simétricamente. Por ejemplo, la secuencia reconocida por un enzima de restricción de *Streptomyces achromogenes* es:



En cada hebra, el enzima hidroliza el enlace fosfodiéster C–G localizado en el lado 3' del eje de simetría. Como se verá en el Capítulo 9, esta simetría se corresponde con la que existe en la estructura de los propios enzimas de restricción.

Se han purificado y caracterizado varios cientos de enzimas de restricción. Sus nombres están formados por una abreviatura de tres letras que hace referencia al organismo que los alberga (por ejemplo, *Eco* para *Escherichia coli*, *Hin* para *Haemophilus influenzae*, *Hae* para *Haemophilus aegyptius*), seguida (si es preciso) de una indicación de la cepa en cuestión y de un número romano (en el caso de que se haya identificado más de un enzima de restricción a partir de la misma cepa). En la Figura 5.1 se muestra la especificidad de varios de estos enzimas.

Los enzimas de restricción se utilizan para cortar moléculas de DNA en fragmentos específicos que puedan ser analizados y manipulados con más facilidad que la molécula completa original. Por ejemplo, el DNA circular de doble hebra de 5,1 kilobases (kb) del virus cancerígeno SV40 posee un sitio de corte para *EcoRI*, 4 para *HpaI* y 11 para *HindIII*. Un fragmento de DNA obtenido por la acción de un enzima de restricción puede cortarse de forma específica en fragmentos más pequeños mediante otro enzima de restricción. El conjunto de dichos fragmentos puede ser utilizado como si fuese la *huella dactilar* de una molécula de DNA, como se verá en seguida. De hecho, utilizando una serie de enzimas de restricción es posible cartografiar cromosomas complejos que contienen cientos de millones de pares de bases.

Los fragmentos de restricción pueden separarse por electroforesis en gel y visualizarse

Es posible detectar con facilidad pequeñas diferencias entre moléculas de DNA similares, porque sus fragmentos de restricción se pueden separar y visualizar por medio de la electroforesis en gel. En muchos tipos de gel la movilidad electroforética de un fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases, hasta cierto límite. Para separar fragmentos que contienen hasta mil pares de bases se utilizan geles de poliacrilamida, mientras que para separar mezclas de fragmentos mayores (hasta 20 kb) se emplean geles de agarosa, más porosos. Una característica importante de estos geles es su elevado poder de resolución. En ciertos tipos de gel se pueden distinguir fragmentos de varios cientos de nucleótidos cuya longitud difiere en un único nucleótido. Además, es posible separar en geles de agarosa cromosomas enteros, que contienen millones de nucleótidos, utilizando campos eléctricos pulsados en diferentes direcciones (electroforesis en gel con campos pulsados o PFGE, "pulsed-field gel electrophoresis"). Los cromosomas se separan uno de otro por las di-

ferencias en el estiramiento y relajación que se producen en moléculas grandes de DNA al conectar y desconectar un campo eléctrico durante intervalos cortos. Mediante autorradiografía es posible visualizar en los geles bandas o manchas de DNA radiactivo. Un método alternativo consiste en teñir el gel con bromuro de etidio, que emite una intensa fluorescencia de color naranja cuando se encuentra unido a una molécula de DNA de doble hélice (Figura 5.2). Una banda que contenga tan solo 50 ng de DNA puede visualizarse fácilmente.

Es posible identificar un fragmento de restricción que contenga una determinada secuencia de bases si se hibrida con una hebra de DNA complementario marcada (Figura 5.3). A partir de una mezcla, se separan los fragmentos de restricción mediante electroforesis en un gel de agarosa, se desnaturizan para formar DNA de una hebra y se transfieren a una hoja de nitrocelulosa. Las posiciones que ocupan los fragmentos de DNA en el gel se mantienen en la hoja de nitrocelulosa, donde se exponen a una sonda de DNA de una hebra, marcada con ^{32}P . La sonda forma un híbrido con un fragmento de restricción que contenga una secuencia complementaria y, a continuación, por autoradiografía se visualiza la posición del dúplex formado por el fragmento de restricción y la sonda. De esta manera se puede identificar con facilidad un fragmento concreto de entre una mezcla que contenga un millón de fragmentos distintos, algo así como encontrar una aguja en un pajar. Esta poderosa técnica se conoce como *transferencia Southern* ("Southern blotting"), ya que fue diseñada por Edwin Southern.

De forma similar, se pueden separar moléculas de RNA por electroforesis en gel y se pueden identificar secuencias concretas por hibridación posterior a su transferencia a nitrocelulosa. Esta técnica análoga para el análisis de RNA se ha denominado de forma un tanto caprichosa *transferencia Northern* ("Northern blotting"). Siguiendo con este juego de palabras se ha acuñado el término *transferencia Western* ("Western blotting"), que hace referencia a una técnica que permite detectar una proteína concreta mediante la tinción con un anticuerpo específico (p. 88). Las transferencias Southern, Northern y Western también se conocen como *transferencias de DNA, RNA y proteínas*, respectivamente.

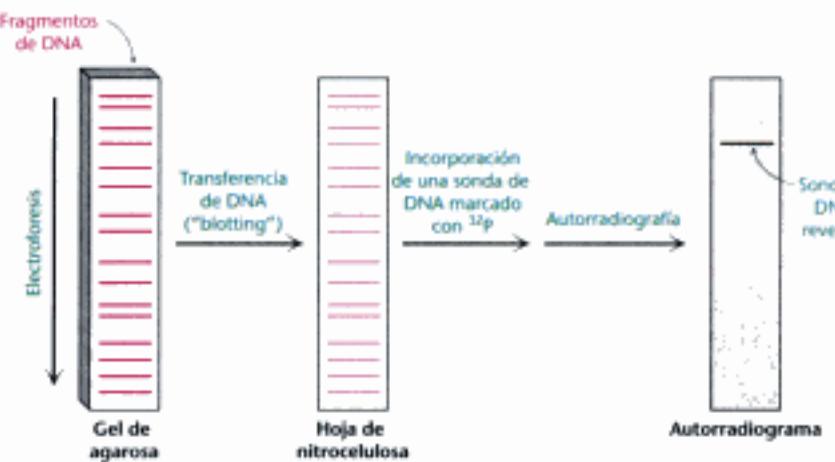


Figura 5.2 Patrón de electroforesis en gel obtenido tras una digestión con enzimas de restricción. Este gel muestra los fragmentos obtenidos tras cortar el DNA de SV40 con tres enzimas de restricción distintas. La fluorescencia de los fragmentos se debe a la tinción del gel con bromuro de etidio. [Cortesía del Dr. Jeffrey Sklar.]

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Se puede utilizar la transferencia Southern para determinar el patrón hereditario de determinados genes. Las mutaciones localizadas en los lugares de restricción producen cambios en el tamaño de los fragmentos de restricción y, por tanto, la posición de las bandas obtenidas tras una transferencia Southern. La existencia de diversidad genética dentro de una población se denomina polimorfismo. La mutación detectada puede ser la causante directa de la enfermedad o puede estar íntimamente relacionada con otra mutación que sí lo es. Enfermedades genéticas como la anemia falciforme, la fibrosis quística y la corea de Huntington pueden detectarse mediante análisis de RFLP.

Figura 5.3 Transferencia Southern. Un fragmento de DNA que contiene una secuencia determinada puede ser identificado separando una mezcla de fragmentos por electroforesis, transfiriéndolos a nitrocelulosa e hibridándolos con una sonda complementaria a la secuencia buscada y que esté marcada con ^{32}P . A continuación, se visualiza el fragmento que contiene la secuencia buscada por autoradiografía.

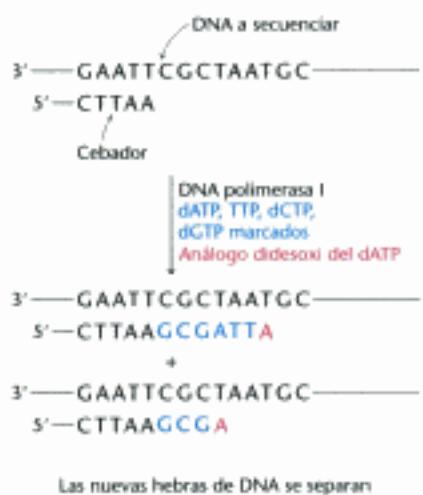
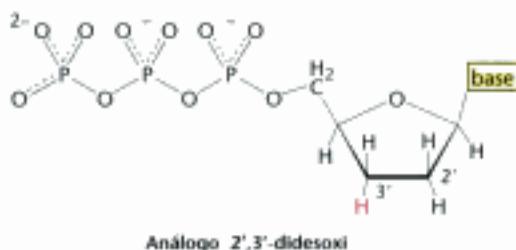


Figura 5.4 Estrategia del método de terminación de la cadena para secuenciar el DNA. Los fragmentos se generan añadiendo el análogo 2', 3'-didesoxi de un dNTP a cada una de las cuatro mezclas de polimerización. Por ejemplo, la adición del análogo didesoxi del dATP (mostrado en rojo) origina fragmentos que terminan en A. La cadena no puede crecer más allá del análogo didesoxi.

El DNA se puede secuenciar mediante la interrupción controlada de la replicación

El análisis de la estructura del DNA y de su papel en la expresión génica también se ha visto notablemente facilitado por el desarrollo de poderosas técnicas para la *secuenciación* de moléculas de DNA. La clave para la secuenciación del DNA es la generación de fragmentos de DNA cuya longitud depende de la última base de la secuencia. Se pueden generar conjuntos de fragmentos de este tipo mediante la *interrupción controlada de la replicación* (método didesoxi de Sanger), un método desarrollado por Frederick Sanger y sus colaboradores. Esta técnica ha reemplazado a métodos alternativos debido a su sencillez. Se lleva a cabo el mismo proceso de forma simultánea en cuatro mezclas de reacción. En cada mezcla se utiliza una DNA polimerasa para sintetizar la hebra complementaria a una secuencia concreta perteneciente a una molécula de DNA de hebra sencilla. El cebador para la síntesis es un fragmento sintetizado por métodos químicos (p. 139) complementario a una parte de la secuencia, que se ha llegado a conocer gracias a otros estudios. Cada mezcla de reacción contiene, además de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (marcados radiactivamente), una pequeña cantidad del *análogo 2', 3'-didesoxi* de uno de los nucleótidos, uno diferente para cada mezcla de reacción.



Análogo 2',3'-didesoxi

La incorporación de este análogo impide todo crecimiento posterior de la nueva cadena, ya que carece del grupo hidroxilo en posición 3', que es esencial para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. La concentración del análogo didesoxi es lo suficientemente pequeña como para que la interrupción de la síntesis de la cadena tenga lugar únicamente de forma esporádica. La polimerasa añadirá unas veces el nucleótido correcto y otras veces el análogo didesoxi, parando la reacción. Por ejemplo, en presencia del análogo didesoxi del dATP se producen fragmentos de distinta longitud, pero todos habrán sido interrumpidos por el análogo didesoxi (Figura 5.4). Es importante destacar que este análogo didesoxi del dATP se insertará únicamente allí donde se presente una T en el DNA que se está secuenciando. Por tanto, los fragmentos de diferente longitud corresponderán a las posiciones de T. A continuación, los cuatro conjuntos de *fragmentos cuya secuencia está interrumpida* (uno por cada análogo didesoxi) se someten a electroforesis y la secuencia de bases del nuevo DNA se lee a partir del autorradiograma de las cuatro calles.

Una alternativa muy eficaz a la autorradiografía es la detección por fluorescencia. Se incorpora un marcador fluorescente a cada análogo didesoxi, de manera que cada uno de los cuatro terminadores de la cadena presente un color distinto (p. ej., uno que emita luz de color azul para la terminación en A y uno que emita luz de color rojo para la terminación en C). Utilizando una mezcla de terminadores, se puede realizar una única reacción y, posteriormente, los fragmentos resultantes se someten a electroforesis. Las bandas de DNA separadas se detectan gracias a su fluorescencia a medida que van surgiendo en el transcurso de la electroforesis; la secuencia de sus colores proporciona directamente la secuencia de bases (Figura 5.5). De esta manera se pueden determinar secuencias de hasta 500 bases. La detección por fluorescencia es una técnica atractiva ya que elimina el uso de

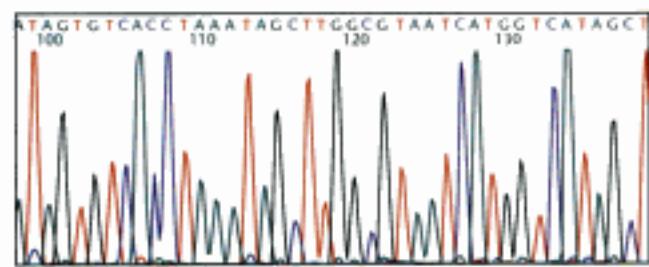


Figura 5.5 Detección por fluorescencia de los fragmentos oligonucleotídicos producidos por el método didesoxi. Se inicia una reacción de secuenciación con los cuatro didesoxinucleótidos responsables de la terminación de la cadena, cada uno marcado con un compuesto fluorescente que emite a una longitud de onda distinta (p. ej., rojo en el caso de T). Cada uno de los cuatro colores representa una base diferente en el registro cromatográfico obtenido tras realizar medidas de fluorescencia a cuatro longitudes de onda. [Tomado de A. J. F. Griffiths y col. *An Introduction to Genetic Analysis*, 8^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2005).]

compuestos radiactivos y se puede automatizar fácilmente. De hecho, utilizando este método, los modernos instrumentos para secuenciar DNA pueden secuenciar más de un millón de bases al día.

Se pueden sintetizar sondas de DNA y genes mediante métodos en fase sólida automatizados

Las hebras de DNA, al igual que los polipéptidos (Sección 4.4), se pueden sintetizar mediante la adición secuencial de monómeros activados a una cadena en crecimiento unida a un soporte insoluble. Los monómeros activados son *desoxirribonucleósido 3'-fosforamiditas* protonadas. En el paso número 1, el átomo de fósforo en posición 3' del elemento entrante se une al átomo de oxígeno en posición 5' de la cadena en crecimiento para formar un *triéster de fosfito* (Figura 5.6). El grupo OH en posición 5' del monómero activado no reacciona porque está bloqueado por un grupo protector dimetoxitritilo (DMT) y el grupo fosforilo en posición 3' no reacciona porque se le ha unido el grupo β -cianoetilo (β Ce). Análogamente, los grupos amino de las bases púricas y pirimidínicas se encuentran bloqueados.

El acoplamiento se lleva a cabo en condiciones anhidrasas, porque el agua reacciona con las fosforamiditas. En el paso número 2, el triéster de fosfito (cuyo P es trivalente) se oxida por el yodo para formar un *triéster de fosfato* (cuyo P es pentavalente). En el paso número 3, se desprende el grupo protector DMT del OH en posición 5' de la cadena en crecimiento mediante la adición de ácido dicloroacético, que deje intactos a los demás grupos protectores. En este momento, la cadena de DNA se ha alargado una unidad y está lista para otro ciclo de elongación. Cada ciclo tarda tan solo unos diez minutos y, habitualmente, provoca el alargamiento de más del 99% de las cadenas.

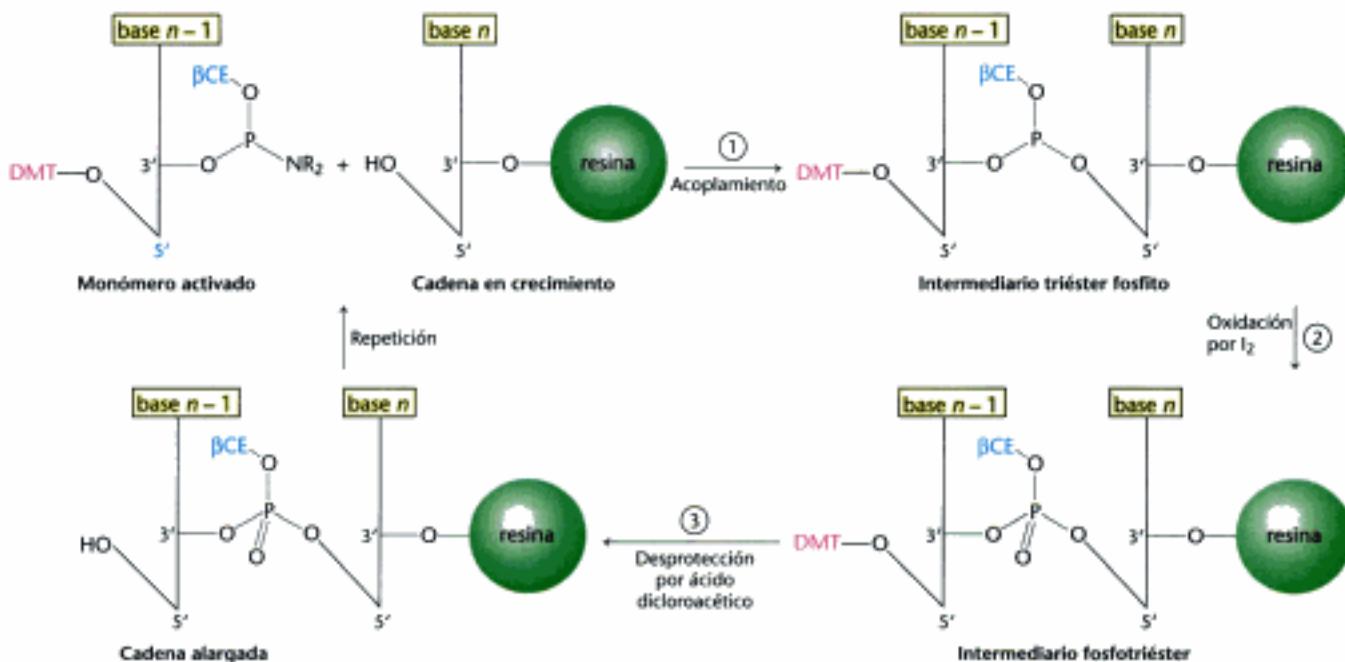


Figura 5.6 Síntesis en fase sólida de una cadena de DNA por el método del triéster fosfito. El monómero activado que se añade a la cadena en crecimiento es un desoxirribonucleósido 3'-fosforamidita que contiene un grupo protector DMT unido al átomo de oxígeno en posición 5', un grupo protector β -cianoetilo (β Ce) unido al átomo de oxígeno del grupo fosforilo en posición 3' y un grupo protector en la base.

Este método en fase sólida es ideal para la síntesis de DNA, al igual que para la de polipéptidos, ya que el producto buscado permanece unido al soporte insoluble hasta el último paso, el de la separación. Todas las reacciones tienen lugar en el mismo recipiente, y se pueden añadir reactivos solubles en exceso para lograr que las reacciones se lleven a cabo por completo. Al término de cada paso, mediante un lavado, los reactivos solubles y los productos secundarios se separan de la resina que sirve de soporte a las cadenas en crecimiento. Al final de la síntesis se añade NH₃ para eliminar todos los grupos protectores y liberar el oligonucleótido del soporte sólido. Como la elongación nunca se produce en el 100% de los casos, las nuevas cadenas de DNA tienen longitudes diversas y la cadena deseada es la más larga. La muestra se puede purificar por cromatografía líquida de alta presión o por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con este método automatizado se pueden sintetizar fácilmente cadenas de DNA de hasta 100 nucleótidos.

La capacidad para sintetizar de forma rápida cadenas de DNA con cualquier secuencia seleccionada abre numerosas vías experimentales. Por ejemplo, un oligonucleótido sintético marcado en uno de sus extremos con ³²P o con un marcador fluorescente puede utilizarse para buscar una secuencia complementaria en una molécula muy larga de DNA o incluso en un genoma compuesto por multitud de cromosomas. El uso de oligonucleótidos marcados como sondas de DNA es muy útil y se ha generalizado. Por ejemplo, una sonda de DNA cuyas bases se puedan aparear con una secuencia complementaria y conocida de un cromosoma puede servir como punto de partida para la exploración de una región adyacente del DNA no cartografiada. Una sonda de estas características puede utilizarse como *cebador* para iniciar la replicación del DNA vecino por medio de la DNA polimerasa. Una de las aplicaciones más apasionantes del método en fase sólida es la síntesis de genes nuevos, diseñados a medida. Hoy en día, mediante la expresión de genes sintéticos es posible producir en abundancia nuevas proteínas con características novedosas.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa es posible amplificar enormemente secuencias seleccionadas de DNA

En 1984, Kary Mullis ideó un ingenioso método para amplificar secuencias específicas de DNA denominado *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, "polymerase chain reaction"). Consideremos un DNA de doble hebra constituido por una secuencia diana que nos interesa, flanqueada por un DNA que no nos interesa. Mediante PCR es posible obtener fácilmente millones de copias de la secuencia diana si se conocen las secuencias que la flanquean. La PCR se lleva a cabo añadiendo los siguientes componentes a una disolución que contiene la secuencia diana: (1) un par de cebadores que hibridan con las secuencias que flanquean a la secuencia diana, (2) los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) y (3) una DNA polimerasa termoestable. Un ciclo de PCR consta de tres etapas (Figura 5.7).

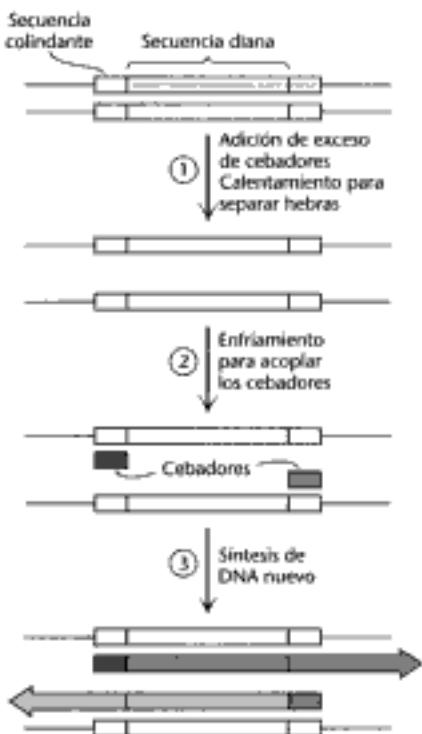


Figura 5.7 Primer ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un ciclo consta de tres etapas: separación de las hebras, hibridación de los cebadores y alargamiento de los cebadores por síntesis de DNA.

1. *Separación de las hebras*. Calentando la disolución a 95 °C durante 15 segundos se separan las dos hebras de la molécula de DNA parental.

2. *Hibridación de los cebadores*. A continuación se enfria bruscamente la disolución a 54 °C, de forma que cada cebador pueda hibridar con una de las hebras del DNA. Un cebador hibrida con el extremo 3' de la secuencia diana localizada en una de las hebras y el otro cebador hibrida con el extremo 3' de la hebra complementaria a la secuencia diana. Como los cebadores se encuentran en exceso no se forman dúplex entre las hebras del DNA parental. Normalmente, los cebadores tienen una longitud de entre 20 y 30 nucleótidos.

3. *Síntesis de DNA*. Posteriormente se calienta la disolución a 72 °C, la temperatura óptima para la *Taq* DNA polimerasa. Esta polimerasa termoestable, proviene de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila que vive en fuentes termales. La polimerasa elonga ambos cebadores en dirección a la secuencia diana porque la síntesis de DNA se realiza en el sentido 5' → 3'. La síntesis de DNA tiene lugar sobre las dos hebras y se extiende más allá de la secuencia diana.

Estas tres etapas (separación de las hebras, hibridación de los cebadores y síntesis de DNA) constituyen un ciclo de la amplificación por PCR y se pueden realizar de forma repetitiva mediante un simple cambio de la temperatura de la mezcla de reacción. Gracias a la termoestabilidad de la polimerasa es posible llevar a cabo la PCR en un recipiente cerrado; no se añade ningún reactivo después del primer ciclo. Los dúplex se calientan para comenzar el segundo ciclo, el cual produce cuatro dúplex y, a continuación, comienza el tercer ciclo (Figura 5.8). Al final del tercer ciclo aparecen dos hebras cortas que están formadas únicamente por la secuencia diana (que incluye tanto a la secuencia que está delimitada por los cebadores como a los propios cebadores). Los ciclos siguientes amplificarán la secuencia diana de forma exponencial. El número de hebras más grandes aumenta de forma aritmética y sirven como fuente para la síntesis de más hebras cortas. En condiciones ideales, después de n ciclos, la secuencia que nos interesa se habrá amplificado 2^n veces. Tras 20 ciclos, la amplificación es de un millón de veces y tras 30 ciclos, que se pueden llevar a cabo en menos de una hora, de mil millones de veces.

Merece la pena destacar algunas de las características de este sorprendente método de amplificación del DNA. En primer lugar, no es necesario conocer la secuencia del fragmento diana. Lo único que hay que conocer son las secuencias colindantes. En segundo lugar, la secuencia diana puede ser mucho mayor que los cebadores. Por PCR se han amplificado fragmentos de más de 10 kb. En tercer lugar, para amplificar secuencias diana no es necesario que los cebadores se emparejen perfectamente con las secuencias que la flanquean. Utilizando cebadores obtenidos a partir de un gen de secuencia conocida se puede realizar una búsqueda de posibles variaciones sobre un mismo tema. De este modo se están descubriendo familias de genes gracias a la PCR. En cuarto lugar, la PCR es muy específica debido a la rigurosidad de la hibridación a temperaturas relativamente elevadas. La *rigurosidad* es la exactitud que se necesita para el emparejamiento entre el cebador y la secuencia diana, y se puede controlar por medio de la temperatura y de la concentración salina. A temperaturas elevadas, el único DNA que se amplifica es el que está comprendido entre los cebadores que han hibridado. Mediante PCR se puede acceder a un gen que representa menos de una millonésima parte del DNA total de un organismo superior. En quinto lugar, la sensibilidad de la PCR es exquisita. Es posible detectar y amplificar una única molécula de DNA.

La PCR es una técnica poderosa para el diagnóstico médico, la medicina forense y los estudios de evolución molecular

La PCR puede proporcionar información valiosa para los diagnósticos médicos. Mediante cebadores específicos es posible detectar con facilidad bacterias y virus. Por ejemplo, la PCR puede revelar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana en individuos que no han desarrollado una respuesta inmune a este patógeno y que, por tanto, pasaría desapercibida en un ensayo con anticuerpos. La detección de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos es un proceso lento y laborioso. Con esta técnica, se pueden detectar fácil-

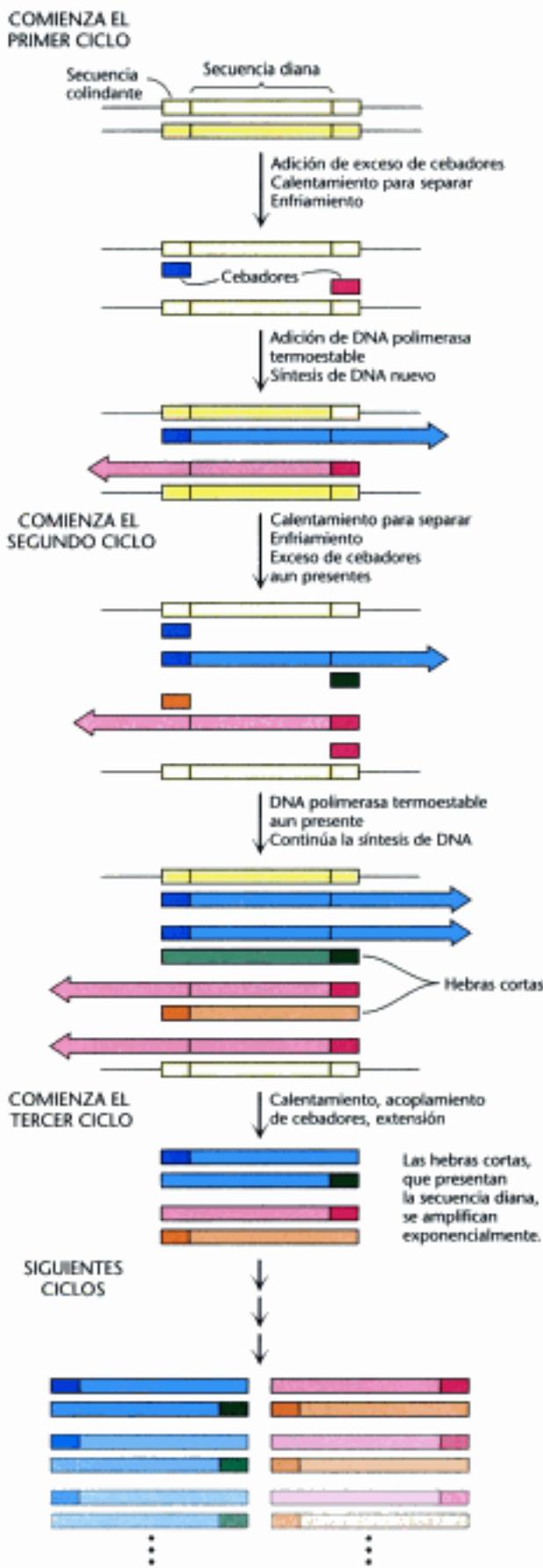


Figura 5.8 Los diversos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa. Las dos hebras cortas que se originan al final del tercer ciclo (junto con las otras hebras más largas, que no se muestran) contienen la secuencia diana. Los ciclos sucesivos amplificarán de forma exponencial la secuencia diana y de forma aritmética la secuencia parental.

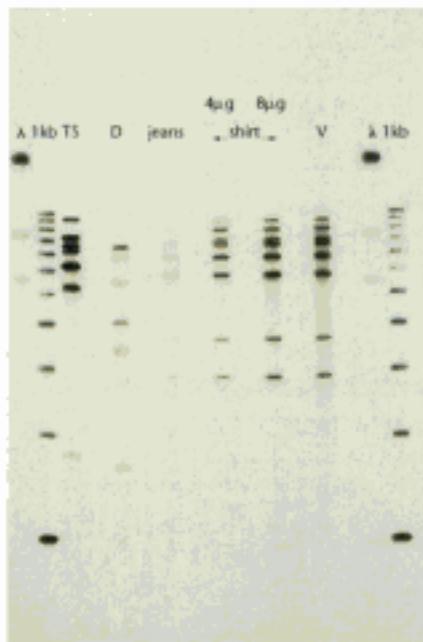


Figura 5.9 DNA y medicina forense. Se recogió DNA de las manchas de sangre encontradas en los pantalones y en la camisa de un acusado, se amplificó por PCR y, a continuación, se comparó tanto con el DNA de la víctima como con el DNA del acusado, utilizando electroforesis en gel y autorradiografía. El DNA de las manchas de sangre de la ropa del acusado coincidía con el patrón de la víctima, pero no con el del acusado. La probabilidad de encontrar una coincidencia fortuita entre el patrón de DNA de la ropa y el de la víctima es de aproximadamente una entre treinta y tres mil millones. Las calles λ, 1 kb y TS corresponden a muestras de DNA control; la calle D contiene DNA del acusado; las calles "jeans" y "shirt" contienen DNA procedente de las manchas de sangre encontradas en los vaqueros y en la camisa del acusado (se han analizado dos cantidades diferentes); la calle V contiene una muestra de DNA obtenida a partir de la sangre de la víctima. [Cortesía de Cellmark Diagnostics, Germantown, Maryland.]

mente, aunque sólo haya 10 bacilos de la tuberculosis por cada millón de células humanas. La PCR es un método prometedor para la detección temprana de ciertos tipos de cáncer. Esta técnica permite identificar las mutaciones de ciertos genes del control del crecimiento, como los genes *ras* (p. 397). La capacidad de amplificar enormemente regiones de DNA seleccionadas también puede resultar de gran valor informativo durante el seguimiento de la quimioterapia contra el cáncer. Los tests que utilizan PCR pueden detectar cuándo se han eliminado las células cancerígenas y poder así interrumpir el tratamiento; del mismo modo, también pueden detectar una recaída y la necesidad de reanudar inmediatamente el tratamiento. Asimismo, esta técnica es ideal para detectar leucemias causadas por una reorganización de los cromosomas.

La PCR también está repercutiendo en la medicina legal y forense. El perfil del DNA de un individuo posee gran valor distintivo, ya que muchos *loci* genéticos son muy variables dentro de una misma población. Por ejemplo, las variaciones en uno de estos lugares específicos determina qué HLA (antígeno de leucocito humano, del inglés “*human leukocyte antigen*”) posee una persona (Sección 33.5); los órganos transplantados se rechazan cuando los tipos de HLA del donante y del receptor no se parecen lo suficiente. Se está utilizando la amplificación por PCR de múltiples genes para determinar el parentesco biológico en casos de disputa de la paternidad y en casos de inmigración. Los análisis por PCR de manchas de sangre y de muestras de semen han supuesto la culpabilidad o la inocencia en numerosos casos de asalto y violación. La raíz de un único cabello suelto encontrado en la escena de un crimen contiene suficiente DNA como para ser analizado por PCR (Figura 5.9).

El DNA es una molécula extraordinariamente estable, sobre todo cuando se encuentra relativamente protegido del aire, de la luz y del agua. En estas circunstancias, grandes fragmentos de DNA pueden permanecer intactos durante miles de años o incluso más tiempo. La PCR proporciona un método ideal para la amplificación de estas moléculas antiguas de DNA de modo que puedan ser detectadas y caracterizadas (p. 178). También se puede utilizar la PCR para amplificar el DNA de microorganismos que todavía no se han logrado aislar y cultivar. Como se verá en el siguiente capítulo, las secuencias de estos productos de PCR pueden ser una considerable fuente de información sobre las relaciones evolutivas entre organismos.

5.2 La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado todos los aspectos de la biología

Los trabajos pioneros de Paul Berg, Herbert Boyer y Stanley Cohen a principios de la década de 1970 dieron lugar al desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, lo que ha hecho que la biología pase de ser una ciencia exclusivamente analítica a ser una ciencia sintética. Mediante la aplicación de las técnicas del DNA recombinante es posible construir en el laboratorio nuevas combinaciones a partir de genes no relacionados. Estas nuevas combinaciones se pueden clonar (amplificar muchas veces) mediante su inserción en células adecuadas, donde serán replicadas por la maquinaria de síntesis de DNA del hospedador. Con frecuencia, los genes introducidos se transcriben y traducen en su nuevo entorno. Lo más sorprendente de todo es que la dotación genética del hospedador se puede alterar permanentemente de forma intencionada.

Los enzimas de restricción y la DNA ligasa son herramientas básicas para la construcción de moléculas recombinantes de DNA

Comencemos por ver de qué manera se pueden construir nuevas moléculas de DNA en el laboratorio. Un fragmento de DNA de interés se une covalentemente a un DNA vector. La característica esencial de un vector es que se puede replicar de forma autónoma en un hospedador apropiado. Para la clonación en *E. coli*, se eligen como vectores los plásmidos (moléculas circulares de DNA que aparecen de forma natural en bacterias y que actúan como cromosomas accesorios) y el bacteriófago lambda (el fago λ), un virus. La escisión del vector en un único lugar específico mediante un enzima de restricción lo puede dejar listo para aceptar un nuevo fragmento de DNA. Por ejem-

ple, el enzima de restricción *EcoRI* escinde en un único sitio al plásmido pSC101, una molécula circular de DNA de doble hélice de 9,9 kb. Los cortes escalonados que produce este enzima generan *extremos complementarios de una sola hebra*, que presentan afinidad específica entre sí y que, por tanto, se denominan *extremos cohesivos* o *pegajosos*. Cualquier fragmento de DNA que tenga los mismos extremos cohesivos puede insertarse en este plásmido. Este tipo de fragmentos se puede preparar a partir de un fragmento más grande de DNA, utilizando el mismo enzima de restricción que se usó para abrir el DNA del plásmido (Figura 5.10).

En ese caso, los extremos monocatenarios del fragmento son complementarios a los del plásmido escindido. El fragmento de DNA y el plásmido escindido pueden combinarse para formar un anillo y, a continuación, la unión queda sellada por medio de la *DNA ligasa*, que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster allí donde hubiere una discontinuidad en la cadena de DNA. La DNA ligasa requiere un grupo hidroxilo libre en el extremo 3' y un grupo fosforilo en el extremo 5'. Además, las cadenas unidas por la ligasa deben estar formando una doble hélice. Tal y como se describirá en el Capítulo 28, la reacción de unión requiere una fuente de energía como, por ejemplo, el ATP o el NAD⁺.

Este método de los extremos cohesivos para unir moléculas de DNA puede generalizarse mediante el empleo de un *DNA adaptador* ("linker"), una molécula de DNA corta, sintetizada por métodos químicos y que puede ser escindida por enzimas de restricción. En primer lugar, el adaptador se une covalentemente a los extremos 5' de un adaptador decamérico y de una molécula de DNA se fosforilan mediante una polinucleótido quinasa y, a continuación, se unen por medio de la ligasa del fago T4 (Figura 5.11). Esta ligasa puede formar un enlace covalente entre moléculas de DNA de doble hélice con extremos romos (es decir, con las dos hebras cortadas al mismo nivel). Cuando se escinden estas prolongaciones terminales mediante un enzima de restricción adecuado se generan extremos cohesivos. De esta manera, es posible añadir a prácticamente cualquier molécula de DNA los extremos cohesivos correspondientes a un enzima de restricción determinado. He aquí un ejemplo de los frutos obtenidos al combinar técnicas de síntesis química y enzimática a la hora de manipular nuevas moléculas de DNA.

Los plásmidos y el fago lambda son los vectores a escoger para clonar DNA en bacterias

Multitud de plásmidos y bacteriófagos han sido modificados de forma ingeniosa para intensificar la introducción de moléculas de DNA recombinante en bacterias y para facilitar la selección de las bacterias que albergan a estos vectores. Como ya se ha indicado, los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble hebra que, de forma natural, aparecen en algunas bacterias. Su tamaño oscila entre 2 y varios cientos de kilobases. Los plásmidos portan genes para la desactivación de antibióticos, la producción de toxinas y la degradación de productos naturales. Estos cromosomas accesorios se pueden replicar con independencia del cromosoma del hospedador. A diferencia del genoma del hospedador, son prescindibles bajo ciertas condiciones. Una célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar hasta veinte copias de un mismo plásmido.

El plásmido pBR322. Uno de los primeros plásmidos utilizados en la clonación fue el *pBR322*, que contiene genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina (un antibiótico análogo a la penicilina). Diversas endonucleasas de restricción pueden escindir este plásmido en una serie de lugares únicos, en los cuales es posible insertar fragmentos de DNA. La inserción de DNA en el lugar de restricción de la

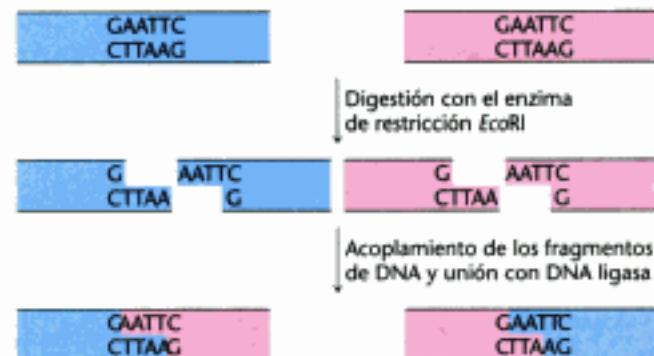


Figura 5.10 Unión de moléculas de DNA por el método de los extremos cohesivos. Dos moléculas de DNA, cortadas con un mismo enzima de restricción (por ejemplo, EcoRI) pueden unirse para dar lugar a moléculas recombinantes.

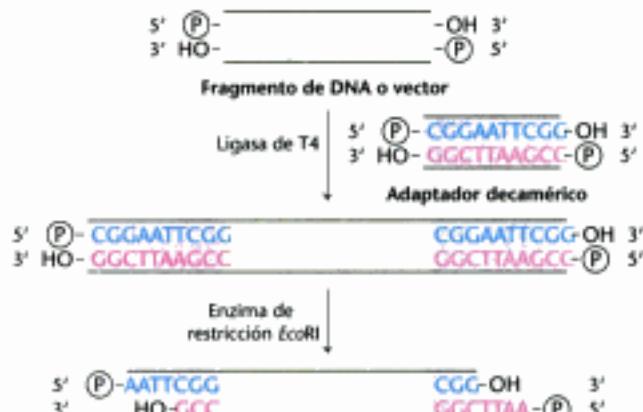


Figura 5.11 Formación de extremos cohesivos. Se pueden generar extremos cohesivos añadiendo un adaptador sintetizado por métodos químicos que, posteriormente, es escindido.



Figura 5.12 Mapa genético del plásmido pBR322. Este plásmido contiene dos genes de resistencia a antibióticos. Al igual que todos los plásmidos, es un DNA circular de doble hebra.

*Eco*RI no desactiva a ninguno de los genes para la resistencia a antibióticos (Figura 5.12). Sin embargo, la inserción en los lugares de restricción de *Sall* o *Bam*HI desactiva al gen para la resistencia a tetraciclina, un efecto que se denomina *desactivación insertional*. Las células que contienen pBR322 con un inserto de DNA en uno de estos lugares de restricción son resistentes a la ampicilina pero son sensibles a la tetraciclina y, por tanto, pueden ser fácilmente seleccionadas. Las células que no consiguen captar el vector son sensibles a los dos antibióticos, mientras que las que contienen pBR322 sin un DNA insertado son resistentes a ambos.

El plásmido pUC18. Muchos de los vectores plasmídicos más recientes presentan características adicionales que aumentan su versatilidad si los comparamos con pBR322. pUC18 representa a una familia de plásmidos de este tipo (Figura 5.13). Al igual que pBR322, este plásmido tiene un origen de replicación y puede ser seleccionado gracias a un marcador basado en la resistencia a ampicilina. Sin embargo, este plásmido también contiene un gen para la β -galactosidasa, un enzima que degrada determinados azúcares (p. 311). En presencia de un determinado análogo del sustrato, este enzima produce un pigmento de color azul que puede ser fácilmente observado. El gen de este enzima se ha modificado por ingeniería genética de forma que presente una región *poliadaptadora* ("polylinker") que incluye múltiples lugares de restricción en su secuencia. Este poliadaptador puede ser escindido por muchos enzimas de restricción distintos o por mezclas de enzimas, lo que se traduce en una gran versatilidad en cuanto a los tipos de fragmentos de DNA que pueden ser clonados. La inserción de un fragmento de DNA desactiva a la β -galactosidasa. No se genera el pigmento de color azul, lo que permite identificar las células que contienen el DNA recombinante.

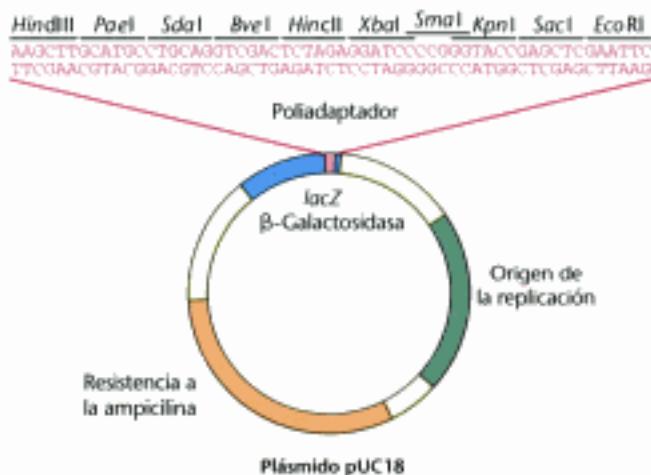
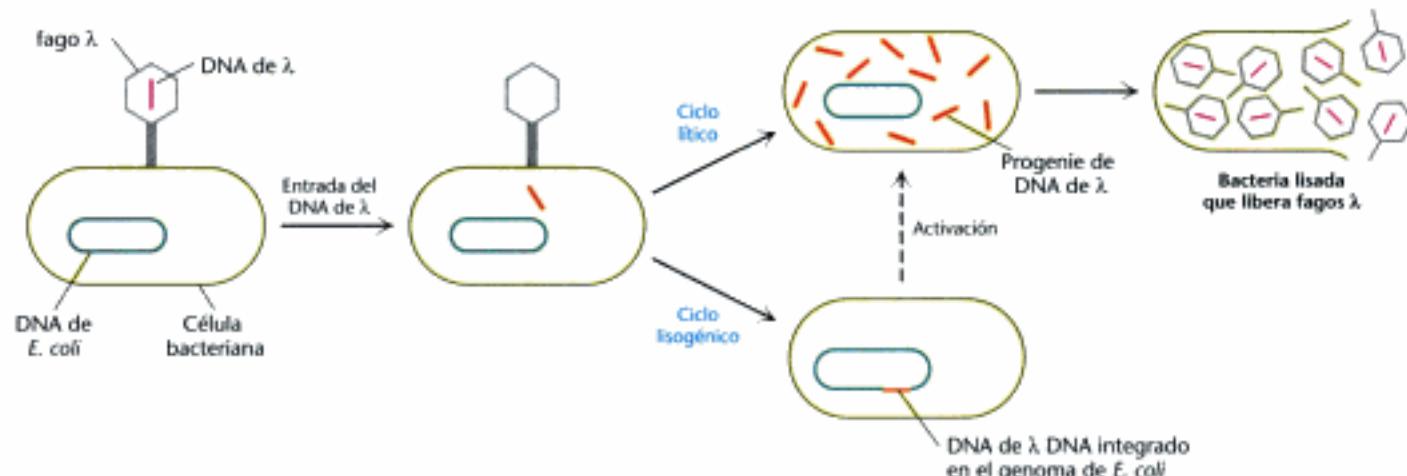


Figura 5.13 Mapa genético del plásmido pUC18. Este plásmido contiene un poliadaptador dentro del gen de la β -galactosidasa (al que, a menudo, se le denomina gen *lacZ*). Se puede detectar la inserción de un fragmento de DNA en uno de los múltiples lugares de restricción presentes en este poliadaptador por la ausencia de actividad β -galactosidasa.

El fago λ . Otro vector ampliamente utilizado, el *fago λ* , puede escoger su estilo de vida: este bacteriófago puede destruir a su hospedador o puede pasar a formar parte de él (Figura 5.14). En el *ciclo lítico* las funciones víricas se expresan plenamente: se producen rápidamente tanto el DNA como las proteínas del virus y se empaquetan en forma de partículas víricas, lo que provoca la lisis (destrucción) de la célula hospedadora y la súbita aparición de una progenie de alrededor de 100 partículas víricas o *viriones*. En el *ciclo lisogénico*, el DNA del fago se integra en el genoma de la célula hospedadora y puede replicarse junto con el DNA de la célula hospedadora durante muchas generaciones, permaneciendo inactivo. Determinados cambios ambientales pueden desencadenar la expresión de este DNA vírico latente, lo que da lugar a la formación de una progenie de virus y a la lisis del hospedador. En el DNA de 48 kb del fago λ existen amplias regiones que no son esenciales para la infección lítica y pueden ser reemplazadas por DNA foráneo, convirtiendo así al fago λ en un vector ideal.

Se han construido fagos λ mutantes diseñados para la clonación. Uno particularmente útil, denominado λ gt- λ β , contiene tan solo dos lugares de escisión para la *Eco*RI, en vez de los cinco que presenta habitualmente (Figura 5.15). Después de la escisión, es posible eliminar el segmento central de esta molécula de DNA de λ . Los dos frag-



mentos de DNA restantes (denominados brazos) tienen una longitud conjunta que equivale al 72% de la longitud normal del genoma. Esta cantidad de DNA es demasiado pequeña para el ensamblaje de una partícula λ ya que sólo se pueden empaquetar sin problemas fragmentos de DNA cuya longitud esté comprendida entre el 75% y el 105% de la longitud normal del genoma. Sin embargo, la inserción de un fragmento de DNA con el tamaño adecuado (por ejemplo, 10 kb) entre los dos extremos del DNA de λ hace posible que esta molécula recombinante de DNA (cuyo tamaño es el 93% de lo normal) se pueda empaquetar. Prácticamente todas las partículas λ infecciosas formadas de esta manera contendrán un fragmento de DNA foráneo insertado. Otra ventaja de utilizar estos virus modificados como vectores es que se introducen en las bacterias con mucha más facilidad que los plásmidos. Entre la variedad de mutantes de λ que se han construido para ser utilizados como vectores de clonación, uno de ellos, denominado *cósmido*, es básicamente un híbrido entre el fago λ y un plásmido, que puede servir de vector para grandes insertos de DNA (de hasta 45 kb).

Figura 5.14 Modos de infección alternativos del fago λ. El fago lambda se puede multiplicar en el interior de un hospedador y lisarlo (ciclo lítico) o puede integrar su DNA en el genoma del hospedador (ciclo lisogénico), donde permanece en estado latente hasta que se activa.

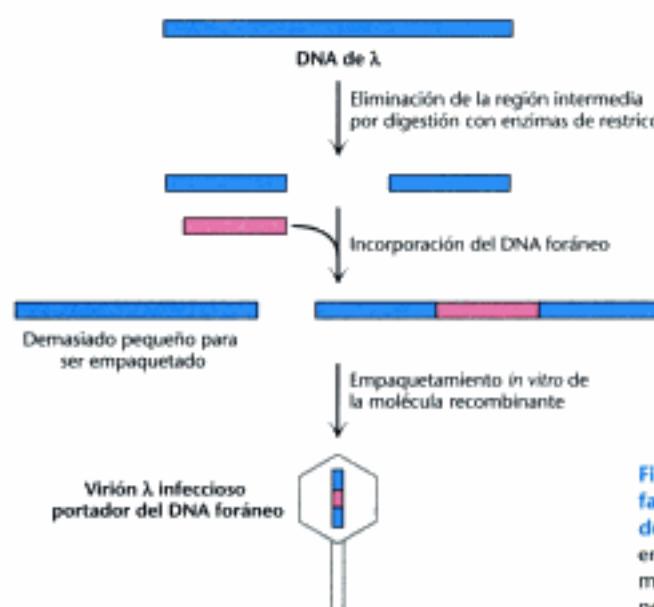


Figura 5.15 Un mutante del fago λ se utiliza como vector de clonación. El proceso de empaquetado selecciona las moléculas de DNA que contienen un fragmento insertado.

Cromosomas artificiales de bacterias y de levaduras

Hoy en día, mediante *cromosomas artificiales bacterianos* (BAC, “*bacterial artificial chromosomes*”) o *cromosomas artificiales de levadura* (YAC, “*yeast artificial chromosomes*”), es posible propagar fragmentos de DNA mucho más grandes. Los BAC son versiones del factor de fertilidad (factor F) de *E. coli* muy modificadas por ingeniería genética y que pueden incluir insertos con un tamaño de hasta 300 kb. Los YAC contienen un centrómero, una secuencia de replicación autónoma (ARS, “au-

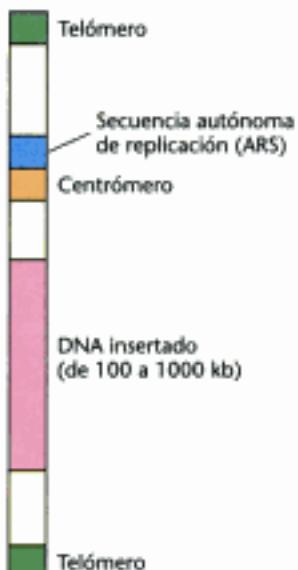


Figura 5.16 Diagrama de un cromosoma artificial de levadura (YAC). Estos vectores presentan las características necesarias para poder replicarse y ser estables en células de levadura.

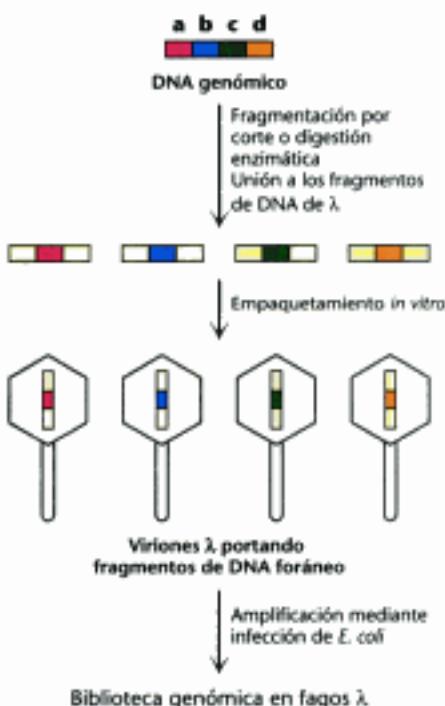


Figura 5.17 Creación de una biblioteca genómica. Se puede crear una biblioteca genómica a partir de la digestión de un genoma complejo entero.

(“autonomously replicating sequence”) donde comienza la replicación, un par de telómeros (los extremos normales de los cromosomas eucarióticos), genes marcadores para llevar a cabo la selección y un lugar de clonación (Figura 5.16). En los vectores YAC se pueden clonar insertos de hasta 1000 kb.

Se pueden clonar determinados genes a partir de fragmentos obtenidos por digestión del DNA genómico

Mediante ingeniosos métodos de clonación y selección es posible aislar un fragmento específico de DNA con una longitud de varias kilobases a partir de un genoma de más de 3×10^6 kb. Veamos cómo se puede clonar un gen que aparece una sola vez en el genoma humano. La estrategia consiste en preparar una amplia colección (o *biblioteca*) de fragmentos de DNA y, posteriormente, identificar aquellos miembros de la colección que contienen el gen que nos interesa.

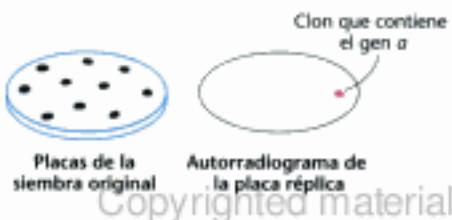
En primer lugar, una muestra que contiene muchas copias del DNA genómico total se somete a fragmentación mecánica o se digiere parcialmente mediante enzimas de restricción para obtener fragmentos de gran tamaño (Figura 5.17). Este proceso genera una población prácticamente aleatoria de fragmentos de DNA que se solapan. A continuación, estos fragmentos se separan mediante electroforesis en gel para aislar el conjunto de todos los fragmentos que tienen una longitud de unas 15 kb. Se añaden adaptadores sintéticos a los extremos de estos fragmentos, se generan extremos cohesivos y, a continuación, se insertan los fragmentos en un vector, como el DNA del fago λ, preparado con los mismos extremos cohesivos. Posteriormente, se infectan bacterias de *E. coli* con estos fagos recombinantes. Estos fagos se replican y acaban provocando la lisis celular. El lisado resultante contiene fragmentos de DNA humano alojados en un número de partículas víricas lo suficientemente elevado como para asegurar que prácticamente todo el genoma se encuentra representado. Estos fagos constituyen una *biblioteca genómica*. Los fagos se pueden propagar de forma indefinida y, por tanto, la biblioteca se puede utilizar repetidamente durante largos períodos de tiempo.

A continuación, se explora esta biblioteca genómica para encontrar la pequeñísima fracción de fagos que alberga el gen de interés. En el caso del genoma humano, se calcula que para tener un 99% de probabilidades de éxito hay que examinar unos 500 000 clones; por tanto, es esencial disponer de una técnica exploratoria muy rápida y eficiente. Mediante la hibridación del DNA es posible llevar a cabo exploraciones rápidas.

En primer lugar, se siembra una suspensión diluida de los fagos recombinantes sobre un césped bacteriano (Figura 5.18). Allí donde una partícula vírica se encuentre con una bacteria y la infecte se desarrolla una *calva* en la placa de Petri que contiene fagos idénticos. A continuación, se hace una réplica de esta placa original, colocando una hoja de nitrocelulosa. Las bacterias infectadas y el DNA de los fagos procedentes de las células lisadas se adhieren a la hoja formando un conjunto de manchas cuya posición se corresponde con la de las calvas formadas en la placa de Petri original. Las bacterias intactas depositadas sobre esta hoja se lisan con NaOH que, de paso, desnaturiza el DNA y crea condiciones para la hibridación con una sonda marcada con ^{32}P . Utilizando como sonda una molécula de DNA o RNA complementaria marcada radiactivamente se puede detectar la presencia de una secuencia específica de DNA en una única mancha de la réplica. Posteriormente, la autorradiografía revela la posición de las manchas de la réplica que albergan el DNA recombinante. Las calvas correspondientes se extraen de la placa de Petri original y se cultivan por separado. Un único investigador puede examinar fácilmente un millón de clones en un día.

Este método hace posible aislar prácticamente cualquier gen, siempre que se disponga de una sonda adecuada. ¿Cómo se obtiene una sonda específica? Una posibilidad consiste en comenzar a partir del mRNA correspondiente extraído de las células donde éste abunda. Por ejemplo, las células precursoras de los eritrocitos contienen gran-

Figura 5.18 Búsqueda de un gen determinado en una biblioteca genómica. En este caso, se analiza una placa de Petri para identificar las colonias que contienen el gen α de la Figura 5.17.



des cantidades de mRNA para la hemoglobina, y las células plasmáticas son ricas en mRNA para moléculas de anticuerpos. Los mRNA procedentes de estas células se pueden fraccionar por tamaños para obtener una preparación enriquecida en el mRNA de interés. Como se describirá en seguida, es posible sintetizar *in vitro* un DNA complementario al mRNA que buscamos y clonarlo para obtener una sonda muy específica.

También es posible preparar una sonda para un gen si se conoce parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen. Surge entonces un problema, porque una secuencia peptídica determinada puede estar codificada por distintos oligonucleótidos (Figura 5.19). Por tanto, para este fin es preferible utilizar secuencias peptídicas que contengan triptófano y metionina, porque estos aminoácidos están especificados por un único codón, mientras que el resto de los residuos de aminoácido posee entre dos y seis codones (ver la Tabla 4.4).

Secuencia de aminoácidos	...	Cys	Pro	Asn	Lys	Trp	Thr	His	...
		A					A		
Possibles secuencias de oligonucleótidos		TGC	CCG	AAC	AAA	TGG	ACC	CAC	
		T	G	T	G	T	C	T	

Todas las secuencias de DNA que codifican la secuencia peptídica seleccionada (o sus secuencias complementarias) se sintetizan por el método en fase sólida y se marcan radiactivamente mediante la fosforilación de sus extremos 5' con ^{32}P . La membrana de nitrocelulosa se coloca en presencia de una mezcla que contenga todas estas sondas y se somete a autorradiografía para identificar los clones con una secuencia de DNA complementaria. A continuación se secuencian los clones positivos para determinar cuáles contienen una secuencia que coincide con la de la proteína de interés. Algunos de ellos pueden contener el gen deseado o un fragmento significativo de él.

Mediante cambios dirigidos en el DNA es posible crear proteínas con nuevas funciones

Es mucho lo que se ha aprendido sobre genes y proteínas gracias al análisis de genes mutados seleccionados de entre el repertorio que nos ofrece la naturaleza. En la metodología genética clásica las mutaciones se generan al azar en cualquier punto del genoma y se seleccionan aquellas que muestran un fenotipo concreto. El análisis posterior de estos mutantes revela qué genes están alterados y la secuenciación del DNA identifica la naturaleza exacta de los cambios. Hoy en día, la tecnología del DNA recombinante hace posible la creación de mutaciones específicas *in vitro*. Podemos construir genes nuevos con propiedades previamente diseñadas mediante tres tipos de cambios dirigidos: *deleciones, inserciones y sustituciones*.

Deleciones. Se puede producir una delección específica escindiendo un plásmido por dos sitios mediante un enzima de restricción y ligándolo para formar un círculo más pequeño. Generalmente, esta sencilla operación permite eliminar un fragmento grande de DNA. Se puede producir una delección más pequeña cortando el plásmido por un único lugar. A continuación se digieren los extremos del DNA lineal por medio de una exonucleasa que hidroliza nucleótidos de ambas hebras. Posteriormente, el fragmento acortado de DNA se vuelve a ligar para formar un círculo en el que falta una pequeña secuencia de DNA en torno al lugar de restricción.

Sustituciones: mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos. Se pueden obtener fácilmente proteínas mutantes en las que se ha sustituido un único aminoácido por *mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos* (Figura 5.20). Supongamos que queremos reemplazar un determinado residuo de serina por una cisteína. Esta mutación podrá hacerse si (1) disponemos de un plásmido que contenga el gen o el

Figura 5.19 Sondas generadas a partir de una secuencia proteica. Se puede generar una sonda sintetizando todos los oligonucleótidos posibles que codifican una secuencia de aminoácidos determinada. Debido a la degeneración del código genético, hay que sintetizar 256 oligonucleótidos diferentes para estar seguros de que la sonda complementaria a la secuencia de siete aminoácidos mostrada en este ejemplo esté presente.



Figura 5.20 Mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos. Para producir el cambio deseado en la secuencia de DNA se utiliza un ceñidor que contiene un nucleótido mal emparejado.

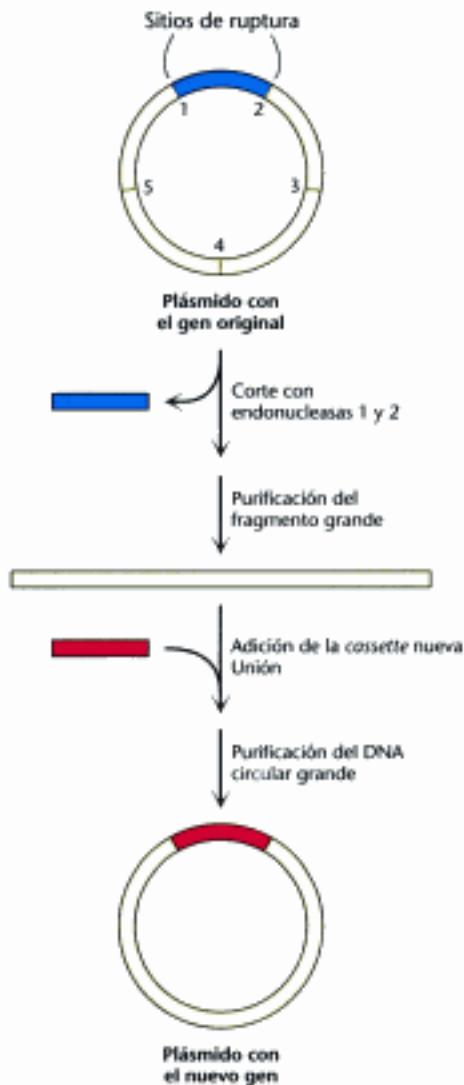


Figura 5.21 Cassete de mutagénesis. Se corta el DNA en dos lugares de restricción únicos mediante dos endonucleasas de restricción diferentes. A continuación, se liga este DNA a un oligonucleótido sintético (la *cassette*) cuyos extremos son complementarios a los extremos cohesivos generados. El método es muy versátil porque el DNA insertado puede contener cualquier secuencia deseada.

cDNA de esa proteína y (2) conocemos la secuencia de bases en torno al lugar que será alterado. Si la serina en cuestión se halla codificada por TCT, tenemos que cambiar la C por una G para obtener cisteína, ya que está codificada por TGT. Este tipo de mutación se llama *mutación puntual* porque solamente se modifica una base. La clave para esta mutación consiste en preparar un oligonucleótido cebador complementario a esta región del gen, pero con la excepción de que en vez de TCT contiene TGT. Se separan las dos hebras del plásmido y, a continuación, el cebador se empareja con la hebra complementaria. El emparejamiento incorrecto de un par de bases de un total de 15 se tolera bien siempre que la hibridación se realice a una temperatura adecuada. Tras emparejarse con la hebra complementaria, el cebador se alarga por medio de la DNA polimerasa, y el círculo de doble hebra se cierra añadiendo DNA ligasa. La posterior replicación de esta estructura de doble hebra da lugar a dos tipos de progenie plasmídica, una mitad con la secuencia original TCT y la otra mitad con la secuencia mutada TGT. La expresión del plásmido que contiene la nueva secuencia TGT producirá una proteína con la sustitución deseada: en una única posición, la cisteína habrá sustituido a la serina. Encontraremos muchos ejemplos de la utilización de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos para modificar de forma precisa regiones reguladoras de genes y para producir proteínas con características hechas a medida.

Inserciones: cassette de mutagénesis. En otra valiosa técnica, la *cassette de mutagénesis*, el DNA plasmídico se corta con un par de enzimas de restricción para eliminar un segmento corto (Figura 5.21). A continuación se añade un oligonucleótido sintético de doble hebra (la *cassette*) cuyos extremos cohesivos son complementarios a los extremos del plásmido escindido y se liga a éste. Cada plásmido presenta ahora la mutación deseada.

Genes de diseño. También se pueden crear nuevas proteínas empalmando fragmentos de genes que codifican dominios proteicos que en la naturaleza no se encuentran asociados. Por ejemplo, un gen de un anticuerpo se puede unir al gen de una toxina para generar una proteína químérica capaz de matar a las células reconocidas por el anticuerpo. Estas *immunotoxinas* están siendo evaluadas como posibles agentes anticancerígenos. Además, mediante las técnicas de DNA recombinante se pueden producir grandes cantidades de las proteínas no infecciosas presentes en la envoltura de los virus. Estas proteínas pueden servir como *vacunas sintéticas* que resulten más seguras que las vacunas convencionales preparadas por desactivación de virus patógenos. Una subunidad del virus de la hepatitis B producida por levaduras está resultando ser una eficaz vacuna contra esta debilitante enfermedad vírica. Por último, mediante el método en fase sólida es posible sintetizar genes totalmente nuevos partiendo de cero. Estos genes pueden codificar proteínas que carecen de un homólogo conocido en la naturaleza (Figura 5.22).

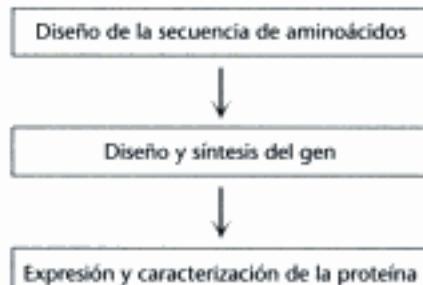
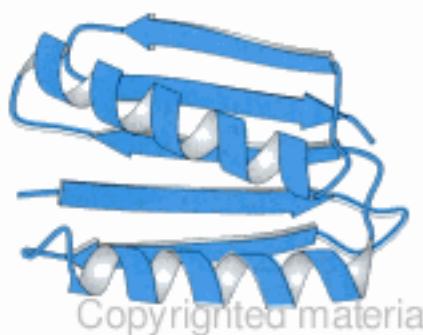


Figura 5.22 Diseño de proteínas. Es posible sintetizar un nuevo gen en su totalidad. En algunos casos, estos genes codifican proteínas que han sido diseñadas partiendo de cero utilizando programas de ordenador basados en los fundamentos de la construcción de proteínas descubiertos recientemente. La estructura mostrada en la figura no tiene un equivalente conocido en la naturaleza. [Dibujado a partir de 1QYS.pdb.]



5.3 Se han secuenciado y analizado genomas completos

Los métodos que se acaban de describir son extremadamente eficaces para aislar y caracterizar fragmentos de DNA. Sin embargo, los genomas de organismos, desde los virus hasta los seres humanos, constan de secuencias más largas de DNA, dispuestas de una forma muy específica que resulta crucial para la integración de sus funciones. ¿Es posible secuenciar y analizar genomas completos? En el caso de los genomas pequeños, este tipo de secuenciación se logró poco después del desarrollo de los métodos de secuenciación del DNA. En 1977, Sanger y colaboradores determinaron la secuencia completa de las 5386 bases del DNA del virus ϕ 174, justo un cuarto de siglo después de los trabajos pioneros de Sanger para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína. Varios años después, a esta hazaña le siguió la determinación de la secuencia del DNA mitocondrial humano, una molécula circular de DNA de doble hebra que contiene 16 569 pares de bases. Codifica dos RNA ribosómicos, 22 RNA de transferencia y 13 proteínas. En los años siguientes, se secuenciaron otros muchos genomas víricos. Sin embargo, los genomas de organismos de vida libre representaban un enorme desafío porque incluso el más sencillo está formado por más de un millón de pares de bases. Por tanto, los proyectos de secuenciación necesitan tanto de técnicas rápidas de secuenciación como de métodos eficaces para ensamblar multitud de segmentos cortos, de entre 300 y 500 pares de bases, en una secuencia completa.

Se han secuenciado los genomas de una serie de organismos que abarca desde bacterias hasta eucariotas pluricelulares

La secuenciación rápida de grandes cantidades de DNA se ha hecho realidad gracias al desarrollo de secuenciadores automáticos de DNA basados en dideoxínucleótidos terminadores de cadena fluorescentes. En 1995 se determinó la secuencia del genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae* utilizando el "método de la escopeta" (en inglés, "shotgun"). El DNA genómico se dividió aleatoriamente en fragmentos que, posteriormente, fueron secuenciados. El ensamblaje de la secuencia completa se realizó mediante programas de ordenador que hacían coincidir las regiones solapadas de los fragmentos. El genoma de *H. influenzae* está formado por 1 830 137 pares de bases y codifica unas 1740 proteínas (Figura 5.23). Mediante técnicas similares, los investigadores han determinado las secuencias de más de 100 especies de bacterias y arqueas, entre las que se incluyen organismos modelo básicos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Archeoglobus fulgidus*, así como organismos patógenos como *Yersinia pestis* (causante de la peste bubónica) y *Bacillus anthracis* (causante del ántrax).

El primer genoma eucariótico secuenciado por completo fue el de la levadura de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*, en 1996. El genoma de la levadura está formado por unos 12 millones de pares de bases distribuidos en 16 cromosomas y codifica más de 6000 proteínas. A este logro le sucedió, en 1998, la primera secuenciación completa del genoma de un organismo pluricelular, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que contiene 97 millones de pares de bases. Este genoma incluye más de 19 000 genes. Hoy en día se han secuenciado los genomas de muchos otros organismos ampliamente utilizados en la investigación biológica y biomédica, entre los que se incluyen los de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, el ratón, la rata y el perro. Hay que destacar que la secuenciación de un genoma complejo tiene lugar en varias etapas que van desde la secuencia "borrador", pasa por la secuencia "completada" y acaba en la secuencia "terminada".

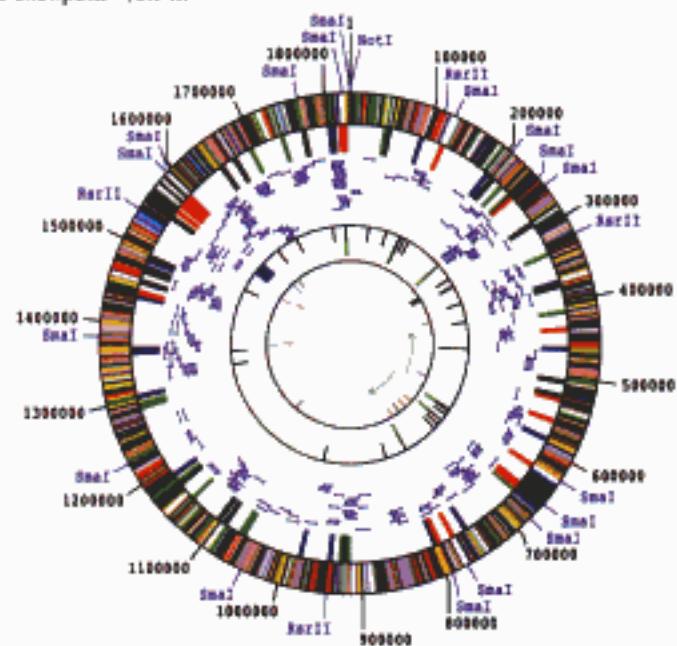


Figura 5.23 Un genoma completo. El diagrama representa el genoma de *Haemophilus influenzae*, el primer genoma perteneciente a un organismo de vida libre que se secuenció por completo. El genoma codifica más de 1700 proteínas y 70 moléculas de RNA. Se ha podido determinar la función más probable de aproximadamente la mitad de las proteínas por comparación con las secuencias de proteínas de otras especies caracterizadas con anterioridad. [Tomado de R. D. Fleichmann y col. *Science* 269(1995):496-512; ilustración mostrada por cortesía del Instituto de Investigación Genómica.]

Incluso después de determinar que una secuencia está "terminada", pueden faltar algunas regiones (como las secuencias repetitivas que constituyen la heterocromatina) porque estas secuencias de DNA son muy difíciles de manipular utilizando las técnicas estándar.

La secuenciación del genoma humano está terminada

El objetivo último de gran parte de la investigación genómica ha consistido en la secuenciación y análisis del genoma humano. Dado que el genoma humano está formado por unos 3000 millones de pares de bases de DNA distribuidos entre 24 cromosomas, el desafío que supone generar una secuencia completa era abrumador. Sin embargo, hoy en día, gracias a un esfuerzo internacional y organizado que incluía tanto a laboratorios académicos como a empresas privadas, el genoma humano ha avanzado desde una secuencia "borrador" publicada por primera vez en 2001 hasta una secuencia "terminada", publicada a finales de 2004 (Figura 5.24).

El genoma humano es una rica fuente de información sobre múltiples aspectos de la humanidad, entre los que se incluye la bioquímica y la evolución. El análisis del genoma continuará todavía muchos años. Una de las primeras tareas consiste en la elaboración de un inventario de genes que codifican proteínas. Al comienzo del proyecto de secuenciación del genoma humano se estimaba que había unos 100 000 genes de este tipo. Cuando se dispuso del genoma "completado" (todavía no "terminado"), esta estimación se redujo a 30 ó 35 000. Con la secuencia "terminada" la estimación bajó a 20 ó 25 000. A lo largo de este libro adoptaremos la estimación de que hay 25 000. La disminución del valor estimado se debe, en parte, a la

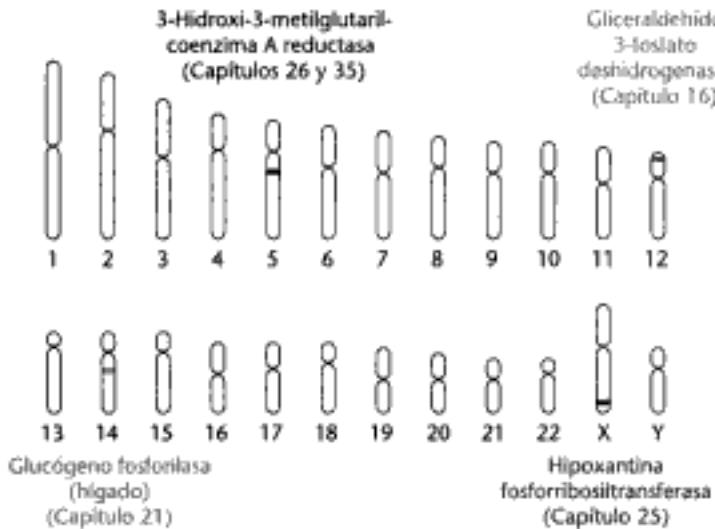


Figura 5.24 El genoma humano. El genoma humano está distribuido en 46 cromosomas (22 pares de autosomas y los cromosomas sexuales X e Y). Se destaca la ubicación de varios genes asociados a importantes vías bioquímicas.

constatación del hecho de que hay un número relativamente grande de *pseudogenes*, muchos de los cuales son genes que antes eran funcionales pero que han sufrido mutaciones y ya no se expresan. Por ejemplo, más de la mitad de las regiones genómicas que corresponden a receptores olfativos (moléculas clave responsables de nuestro sentido del olfato) son pseudogenes (Sección 32.1). Las regiones correspondientes del genoma de otros primates y roedores codifican receptores olfativos funcionales. No obstante, el sorprendentemente pequeño número de genes oculta la complejidad del proteoma humano. *Muchos genes codifican más de una proteína gracias a mecanismos como el entrecortado alternativo ("alternative splicing") del mRNA y las modificaciones postraduccionales de las proteínas.* Las diversas proteínas que codifica un único gen exhiben, a menudo, variaciones importantes en sus propiedades funcionales.

El genoma humano contiene una gran cantidad de DNA que no codifica proteínas. Uno de los grandes desafíos de la bioquímica moderna y de la genética consiste en averiguar las funciones de este DNA no codificador. Gran parte de este DNA se debe a la existencia de *elementos genéticos móviles*. A lo largo del tiempo, estos elementos, relacionados con los retrovirus (p. 118), se han insertado ellos solos por todo el genoma. La mayoría de estos elementos han ido acumulando mutaciones y ya no son funcionales. En el genoma humano se encuentran más de un millón de *secuencias Alu*, cada una con una longitud aproximada de 300 bases. Las secuencias *Alu* son ejemplos de *elementos intercalados cortos*, o *SINES* ("short interspersed elements"). El genoma humano también incluye casi un millón de *elementos intercalados largos*, o *LINEs* ("long interspersed elements"), secuencias de DNA que pueden tener una longitud de hasta 10 kilopares de bases (kpb). Actualmente se está investigando el papel de estos elementos como parásitos genéticos neutrales o como instrumentos de la evolución del genoma.

La genómica comparativa se ha convertido en una poderosa herramienta de investigación

La comparación con genomas de otros organismos es una fuente de información para la comprensión del genoma humano. La secuenciación del genoma del chimpancé, nuestro pariente vivo más cercano, está a punto de terminar. Los genomas de otros mamíferos ampliamente utilizados en la investigación biológica (como el ratón o la rata) ya se han “completado”. Los estudios comparativos revelan que, para nuestro asombro, el 99% de los genes humanos tienen análogos en los genomas de estos roedores. Sin embargo, estos genes se han redistribuido sustancialmente entre los cromosomas a lo largo de los 75 millones de años de evolución que, según las estimaciones, han transcurrido desde que humanos y roedores derivaron a partir de un antepasado común (Figura 5.25).

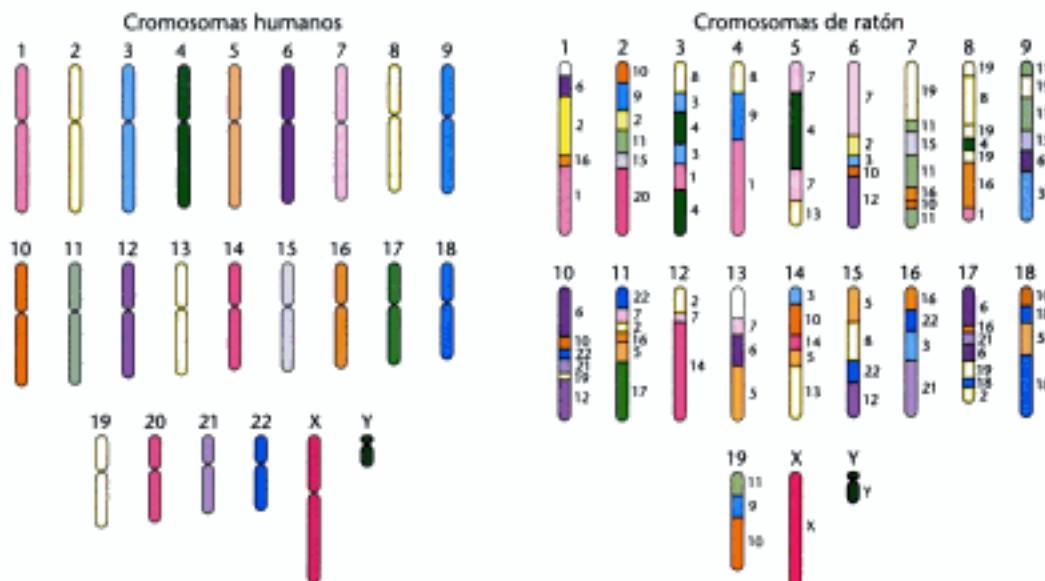
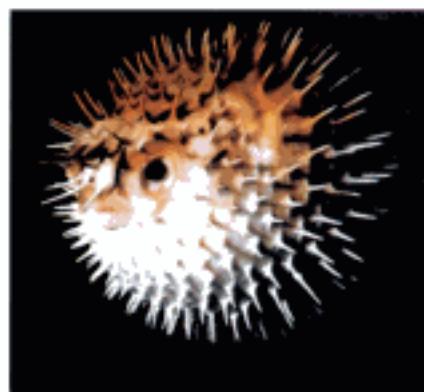


Figura 5.25 Comparación de genomas. Representación esquemática en la que se comparan el genoma humano y el de ratón y que muestra la redistribución de fragmentos cromosómicos de gran tamaño.

También se han determinado los genomas de otros organismos para ser utilizados de forma específica en estudios de genómica comparativa. Por ejemplo, se han determinado los genomas de dos especies del pez globo (*Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*). Se seleccionaron estos genomas porque son muy pequeños y porque carecen de gran parte del DNA intergenético que tanto abunda en el genoma humano. Los genomas del pez globo contienen menos de 400 megapares de bases (Mpb), la octava parte de las bases que contiene el genoma humano, pero, sin embargo, presentan prácticamente el mismo número de genes. El estudio comparativo de los genomas de estas especies con el de los humanos sacó a la luz más de 1000 genes humanos que previamente habían pasado desapercibidos. Además, el estudio comparativo de las dos especies de pez globo, que compartieron un antepasado común hace aproximadamente 25 millones de años, es una fuente de conocimiento sobre sucesos más recientes de la evolución. La genómica comparativa es una herramienta poderosa, tanto para la interpretación del genoma humano como para la comprensión de los principales eventos que dieron lugar al origen de géneros y especies.

Es posible examinar de forma exhaustiva los niveles de la expresión génica

La mayor parte de los genes se encuentran en igual cantidad en todas las células, a saber, una copia en las células haploides o dos copias en las células diploides. Sin embargo, el nivel de expresión de cada gen, estimado a partir de la cantidad de mRNA,



Un pez globo. [Fred Bavendam/Peter Arnold.]

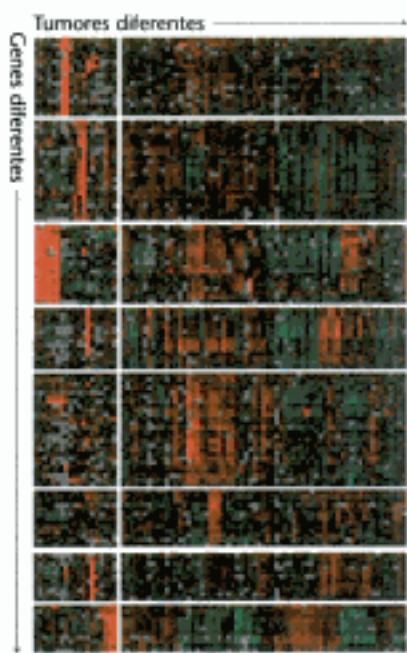


Figura 5.26 Análisis de la expresión génica usando micromatrices. Utilizando micromatrices de DNA (chips génicos) es posible analizar de forma simultánea el nivel de expresión de miles de genes. En este caso, el análisis de 1733 genes pertenecientes a 84 muestras distintas de tumores de mama indica que los tumores se pueden dividir en distintas clases en función de sus patrones de expresión génica. El color rojo representa la inducción del gen y el color verde representa la represión del gen. [Tomado de C. M. Perou y col., *Nature* 406(2000):747-752.]

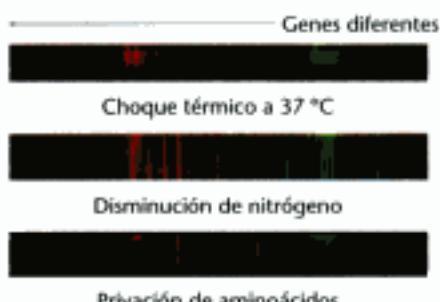


Figura 5.27 Control de los cambios de la expresión génica en levaduras. El análisis con micromatrices muestra los niveles de expresión de los genes de levadura en condiciones diferentes. [Tomado de Lyer y col., *Nature* 409(2001):533-538.]

puede variar ampliamente, desde la no expresión hasta la presencia de cientos de copias de mRNA en cada célula. Los patrones de expresión génica varían de un tipo de célula a otro, lo que distingue, por ejemplo, a una célula muscular de una célula nerviosa. Incluso dentro de la misma célula, los niveles de expresión génica pueden variar a medida que la célula responde a cambios en las condiciones fisiológicas. Hay que hacer notar que, algunas veces, los niveles de mRNA se corresponden con los niveles de proteínas expresadas, pero no siempre se cumple esta correlación. Por tanto, hay que tener cuidado a la hora de interpretar únicamente los datos de los niveles de mRNA.

Hoy en día, haciendo uso de nuestro conocimiento de las secuencias de genomas completos podemos analizar el patrón y el nivel de expresión de todos los genes en una célula o tejido concreto. Uno de los métodos más potentes desarrollados hasta la fecha con este fin se basa en la hibridación. Es posible fabricar matrices de oligonucleótidos de alta densidad, denominadas *micromatrices de DNA* ("DNA micro-arrays") o *chips génicos*, bien mediante síntesis química dirigida por la luz (que se lleva a cabo con técnicas de microfabricación fotolitográfica utilizadas en la industria de los semiconductores), bien mediante la aplicación puntual de cantidades muy pequeñas de oligonucleótidos o de cDNAs sobre un soporte sólido (como puede ser un portabjetos para microscopio). La formación de híbridos entre cDNAs marcados fluorescentemente y el chip indica el nivel de expresión de cada gen, que se puede identificar porque se conoce su posición exacta en el chip (Figura 5.26). La intensidad de la mancha fluorescente sobre el chip indica el grado de transcripción de un gen concreto. Se han preparado chips de DNA que contienen oligonucleótidos complementarios a todas las pautas abiertas de lectura conocidas (cuyo número asciende a 6200) presentes en el genoma de levadura (Figura 5.27). Un análisis del contenido de mRNA basado en la utilización de estos chips puso de manifiesto, por ejemplo, que el grado de expresión de aproximadamente el 50% de los genes de levadura en estado estacionario es de entre 0.1 y 1.0 copia de mRNA por célula. Este método detectó fácilmente los cambios en los niveles de expresión que exhibieron determinados genes sometidos a distintas condiciones de cultivo.

5.4 Los genes eucarióticos se pueden manipular con una precisión considerable

Es posible introducir genes eucarióticos en bacterias y se pueden utilizar estas bacterias a modo de fábricas para producir una proteína deseada. También es posible introducir DNA en las células de organismos superiores. Los genes introducidos en animales son valiosas herramientas para el estudio de la actividad génica y constituyen los fundamentos de la terapia génica. Los genes introducidos en plantas pueden hacer que las plantas se vuelvan resistentes a plagas, sean capaces de crecer en condiciones extremas o contengan más cantidad de nutrientes esenciales. La manipulación de genes eucarióticos promete ser una fuente de beneficios para la medicina y la agricultura, pero también es objeto de controversia.

Es posible preparar DNA complementario a partir de mRNA y expresarlo en células hospedadoras

¿Cómo se puede clonar y expresar DNA de mamíferos en *E. coli*? Recordemos que la mayoría de los genes de mamíferos son un mosaico de intrones y exones (p. 127). Estos genes interrumpidos no se pueden expresar en bacterias, ya que carecen de la maquinaria necesaria para escindir los intrones y eliminarlos del transcripto primario. Sin embargo, este problema se puede solucionar introduciendo en las bacterias un DNA recombinante que sea complementario al mRNA. Por ejemplo, la proinsulina, un precursor de la insulina, se sintetiza en bacterias que albergan plásmidos que contienen un DNA complementario al mRNA de la proinsulina (Figura 5.28). De hecho, las bacterias producen gran parte de la insulina utilizada hoy en día por millones de diabéticos.

La clave para construir ese DNA complementario es el enzima *transcriptasa inversa*. Como se comentó en la página 112, los retrovirus utilizan este enzima para

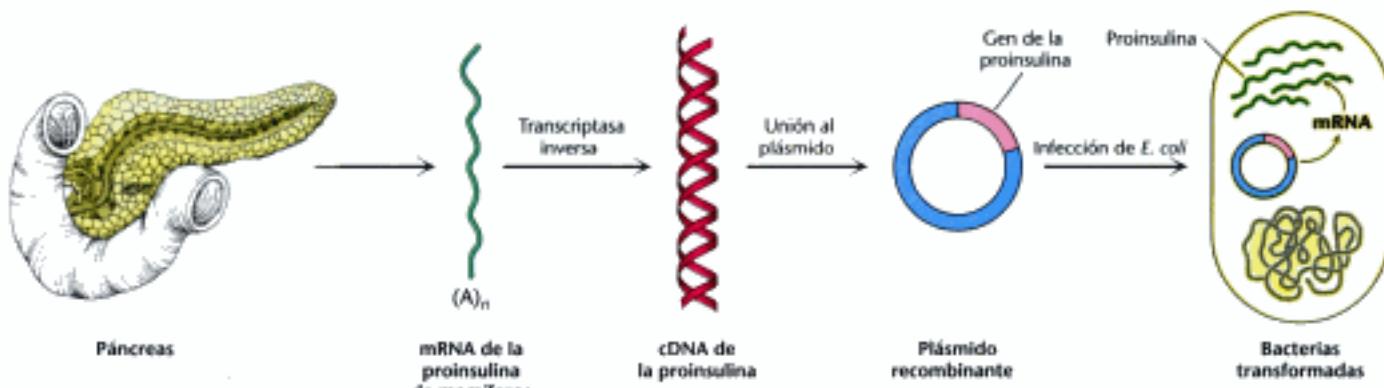


Figura 5.28 Síntesis de proinsulina en bacterias. La proinsulina, un precursor de la insulina, puede ser sintetizada por clones de *E. coli* transformados (alterados genéticamente). Los clones contienen el gen de la proinsulina de mamífero.

formar un híbrido DNA–RNA durante la replicación de su RNA genómico. La transcriptasa inversa sintetiza una hebra de DNA complementaria a un molde de RNA si se le proporciona un DNA cebador que esté formando pares de bases con el RNA y que posea un grupo OH libre en posición 3'. Podemos utilizar como cebador una secuencia sencilla formada por residuos de timidina unidos [oligo(T)]. Esta secuencia oligo(T) se empareja con la secuencia poli(A) presente en el extremo 3' de la mayoría de las moléculas de mRNA eucarióticas (p. 123), tal y como se muestra en la Figura 5.29. A continuación, la transcriptasa inversa sintetiza el resto de la hebra de cDNA en presencia de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato. Posteriormente, la hebra de RNA de este híbrido RNA–DNA se hidroliza aumentando el pH. A diferencia del RNA, el DNA es resistente a la hidrólisis alcalina. Para convertir la hebra sencilla de DNA en un DNA de doble hebra hay que generar otro lugar que funcione como cebador. El enzima *transferasa terminal* añade nucleótidos (por ejemplo, varios residuos de dG) al extremo 3' del DNA. Un oligo(dC) se puede unir a los residuos dG y servir de cebador para la síntesis de la segunda hebra del DNA. A esta doble hélice de DNA se le pueden añadir adaptadores sintéticos para ligarlo a un vector adecuado. Se puede fabricar DNA complementario para todos los mRNA presentes en una célula, insertarlo en vectores y, posteriormente, introducirlo en bacterias. A esta colección se le denomina *biblioteca de cDNA*.

Las moléculas de DNA complementario se pueden insertar en vectores que favorezcan su expresión eficiente en hospedadores como *E. coli*. Este tipo de plásmidos o fagos se denominan *vectores de expresión*. Para conseguir un grado máximo de transcripción, el cDNA se inserta en el vector con la pauta de lectura correcta y cerca de un promotor bacteriano muy activo. Además, estos vectores aseguran una traducción

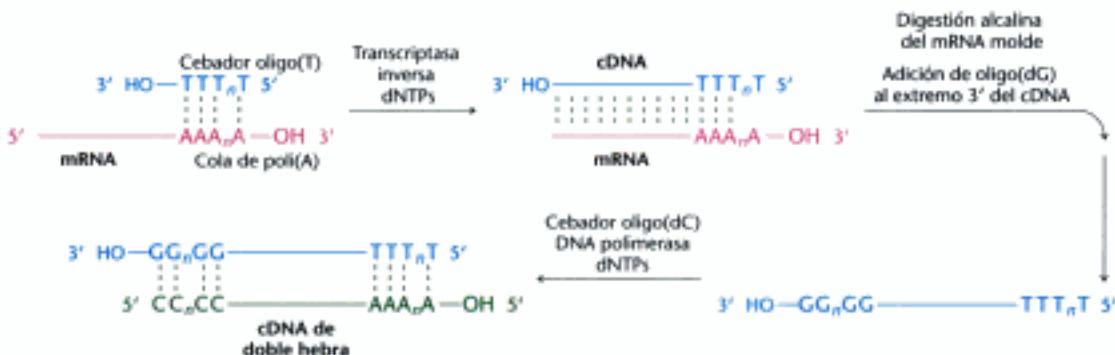


Figura 5.29 Formación de un cDNA de doble hebra. A partir del mRNA se puede generar un DNA complementario (cDNA) de doble hebra. La transcriptasa inversa sintetiza primero una hebra de cDNA utilizando como molde el mRNA y después, tras la digestión del mRNA, utiliza la hebra de cDNA recién sintetizada como molde para formar una doble hélice.

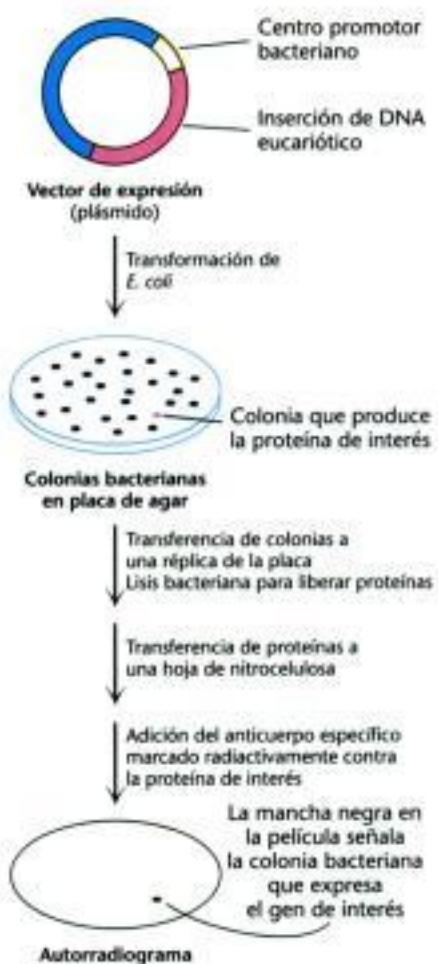


Figura 5.30 Búsqueda de clones de cDNA. Un método para buscar clones de cDNA consiste en la identificación de los productos expresados mediante la tinción con un anticuerpo específico.

eficiente porque codifican en el mRNA, cerca del codón de iniciación, una secuencia de unión a ribosomas. Los clones que contienen cDNA se pueden analizar en base a su capacidad para sintetizar una proteína ajena a las bacterias. Para identificar las colonias bacterianas que albergan el vector con el cDNA correspondiente a la proteína que nos interesa, se pueden utilizar anticuerpos radiactivos específicos para la proteína en cuestión (Figura 5.30). Como se ha descrito en la página 146, se lisán las manchas bacterianas obtenidas sobre una réplica de la placa de Petri para liberar las proteínas y se aplica un filtro de nitrocelulosa para que se unan a él. Añadiendo un anticuerpo marcado con ^{125}I que sea específico para la proteína de interés, se puede averiguar por autorradiografía la posición de las colonias deseadas en la placa original. Este método de identificación inmunooquímica se puede utilizar siempre que una proteína se exprese y se disponga del anticuerpo correspondiente.

Es posible expresar de forma eficaz genes nuevos introducidos en células eucarióticas

Las bacterias son hospedadores ideales para la amplificación de moléculas de DNA. También pueden servir como fábricas para la producción de una amplia gama de proteínas procarióticas y eucarióticas. Sin embargo, las bacterias carecen de los enzimas necesarios para efectuar modificaciones posteriores a la traducción como son la hidrólisis específica de polipéptidos o la adición de carbohidratos. Por tanto, muchos genes eucarióticos sólo se pueden expresar correctamente en células hospedadoras eucarióticas. La introducción de moléculas de DNA recombinante en células de organismos superiores también puede aportar información sobre cómo se organizan y expresan sus genes. Cómo se activan o desactivan los genes durante el desarrollo embrionario, o cómo puede un óvulo fecundado originar un organismo con células altamente diferenciadas, dotadas de una organización espacio-temporal son preguntas que se pueden responder gracias a esta técnica. Hoy en día, mediante la expresión de genes foráneos en células de mamífero es posible abordar de forma fructífera estas cuestiones centrales de la biología.

Las moléculas de DNA recombinante se pueden introducir en células animales de diversas maneras. En uno de los métodos, las células animales captan moléculas de DNA foráneo que han precipitado con fosfato cálcico. Una pequeña fracción del DNA incorporado se integra de forma estable en el DNA cromosómico. La eficacia de la incorporación es pequeña, pero el método resulta útil porque su aplicación es muy sencilla. Otro procedimiento consiste en *microinyectar* DNA en el interior de las células. Para ello se utiliza una micropipeta de vidrio de punta muy fina ($0.1\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro) que contiene una disolución del DNA foráneo que se introduce directamente en el núcleo de una célula (Figura 5.31). Un investigador con práctica puede inyectar cientos de células por hora. Aproximadamente un 2% de las células de ratón inyectadas resultan viables y contienen el nuevo gen. En un tercer método se utilizan *virus* para introducir nuevos genes en células animales. Los vectores más efectivos son los *retrovirus*. Como se ha dicho en la página 118, el DNA es una molécula intermediaria durante la replicación de los retrovirus, en contra del flujo normal de la información. Una característica notable del ciclo vital de un retrovirus es que la versión de su genoma en forma de doble hélice de DNA, producida por la acción de la transcriptasa inversa, se incorpora de forma aleatoria al DNA cromosómico del hospedador. Esta versión en DNA del genoma vírico, denominada DNA *provírico*, se puede expresar de forma eficaz por la célula hospedadora y se puede replicar junto con el DNA celular normal. En general, los retrovirus no matan a su hospedador. Se han introducido eficazmente genes foráneos en células de mamífero infectándolas con vectores derivados del *virus de la leucemia murina de Moloney*, que puede aceptar insertos de hasta 6 kb. Algunos de los genes incorporados al genoma de una célula hospedadora transformada mediante este vector retrovírico se expresan de forma eficiente.

Otros dos vectores víricos se utilizan con mucha frecuencia. El *Vaccinia virus*, un virus que contiene un DNA de gran tamaño, se replica



Figura 5.31 Microinyección de DNA. El DNA del plásmido clonado se está microinyectando en el pronúcleo macho de un óvulo fecundado de ratón.

en el citoplasma de las células de mamífero y detiene la síntesis de las proteínas de la célula hospedadora. El *Baculovirus* infecta células de insecto, que crecen fácilmente en cultivo. Las larvas de insecto infectadas por este virus funcionan como eficaces fábricas de proteínas. Mediante ingeniería genética se han desarrollado vectores basados en estos virus, que tienen un genoma de gran tamaño, para expresar de forma eficiente insertos de DNA.

Los animales transgénicos albergan y expresan genes que han sido introducidos en su línea germinal

Los ratones gigantes obtenidos por ingeniería genética son un ejemplo de la expresión de genes foráneos en células de mamífero (Figura 5.32). Los ratones gigantes se produjeron mediante la introducción del gen de la hormona de crecimiento de la rata en un óvulo de ratón fertilizado. La *hormona de crecimiento (somatotropina)* es una proteína de 21 kd que, normalmente, se sintetiza en la hipófisis. Un déficit de esta hormona provoca enanismo y un exceso da lugar al gigantismo. El gen de la hormona de crecimiento de la rata se introdujo en un plásmido, junto al *promotor* de la metalotioneína de ratón (Figura 5.33). Este promotor está situado normalmente en un cromosoma, donde controla la transcripción de la *metalotioneína*, una proteína rica en cisteína, que presenta una elevada afinidad para los metales pesados. La metalotioneína se une a los metales pesados, muchos de los cuales resultan tóxicos para los procesos metabólicos (p. 494), y los retiene. La síntesis hepática de esta proteína protectora se induce por iones de metales pesados como el cadmio. Por tanto, si los ratones contienen el nuevo gen, su expresión puede iniciarse añadiendo cadmio al agua que beben.



Figura 5.32 Ratones transgénicos. La inyección del gen de la hormona de crecimiento en un óvulo de ratón fecundado dio origen a un ratón gigante (a la izquierda), que pesó aproximadamente el doble que un ratón normal de la misma camada (a la derecha). [Cortesía del Dr. Ralph Brinster.]



Figura 5.33 Construcción del gen mixto hormona de crecimiento de la rata—metalotioneína. El gen de la hormona de crecimiento de la rata (mostrado en color amarillo) se insertó en un plásmido cerca del promotor de la metalotioneína, que se activa al añadir metales pesados, como el cadmio.

Se microinyectaron varios cientos de copias del plásmido que contenía el promotor y el gen de la hormona de crecimiento en el pronúcleo masculino de un óvulo fertilizado de ratón que, a continuación, fue implantado en el útero de una hembra de ratón que actuaba como nodriza. Parte de los ratones que nacieron a partir de estos óvulos microinyectados contenían el gen de la hormona de crecimiento de rata, tal y como se demostró por la transferencia Southern de su DNA. Estos *ratones transgénicos*, que contenían múltiples copias (~30 por célula) del gen de la hormona de crecimiento de la rata, crecían mucho más rápidamente que los ratones control. En presencia de cadmio, el nivel de la hormona de crecimiento de estos ratones era 500 veces mayor que en los ratones normales y, al llegar a la madurez, su peso corporal era dos veces mayor de lo normal. El DNA foráneo se había transcripto y se había desprendido correctamente de sus cinco intrones para formar un mRNA funcional. Estos experimentos demuestran fehacientemente que un gen foráneo sometido al control de un nuevo promotor puede integrarse y expresarse eficazmente en células de mamífero.

La desactivación de un gen proporciona claves sobre su función

También es posible comprobar la función de un gen desactivándolo y observando las anomalías resultantes. Se han desarrollado potentes métodos para conseguir *desactivar genes* (o *noquear genes*, en inglés “gene knockout”) en organismos como la le-

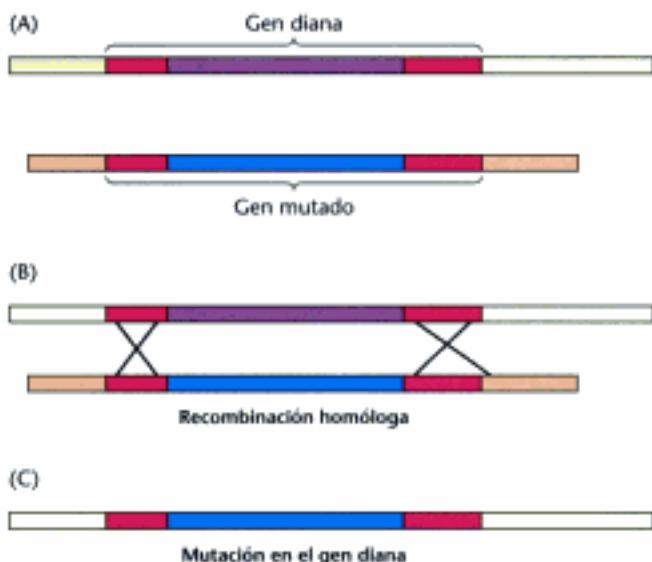


Figura 5.34 Desactivación de genes por recombinación homóloga. (A) Se construye una versión mutada del gen que va a ser desactivado, manteniendo algunas regiones de homología con el gen normal (rojo). Cuando se introduce el gen foráneo mutado en una célula madre embrionaria, (B) tiene lugar la recombinación entre las regiones homólogas y (C) el gen normal (la diana) se reemplaza, por el gen foráneo. La célula se inserta en embriones, y se producen ratones que carecen del gen.

vadura y el ratón. Estos métodos se basan en el proceso de *recombinación homóloga*. Mediante este proceso se produce el intercambio de segmentos de DNA entre regiones con una gran similitud de secuencias. Por tanto, mediante un intercambio de segmentos, el DNA foráneo introducido en una célula se puede desactivar cualquier gen que sea, al menos en parte, homólogo (Figura 5.34). Se puede dirigir este proceso hacia genes específicos si se conoce su secuencia de nucleótidos.

Por ejemplo, la estrategia de desactivar genes se ha aplicado en los genes que codifican las proteínas que regulan los genes (también llamadas *factores de transcripción*) que controlan la diferenciación de células musculares. Cuando se desactivan las dos copias del gen de la proteína reguladora *miogenina*, el animal muere al nacer porque carece de músculo esquelético funcional. La observación microscópica revela que los tejidos a partir de los cuales se forma normalmente el músculo contienen células precursoras que no han llegado a diferenciarse por completo (Figura 5.35). Los ratones heterocigóticos (que contienen un gen de la miogenina normal y otro desactivado) tienen una apariencia normal, lo que indica que el nivel de expresión de este gen no es esencial para su función. Estudios análogos han demostrado la función de muchos otros genes y han permitido generar modelos animales de enfermedades genéticas humanas conocidas.

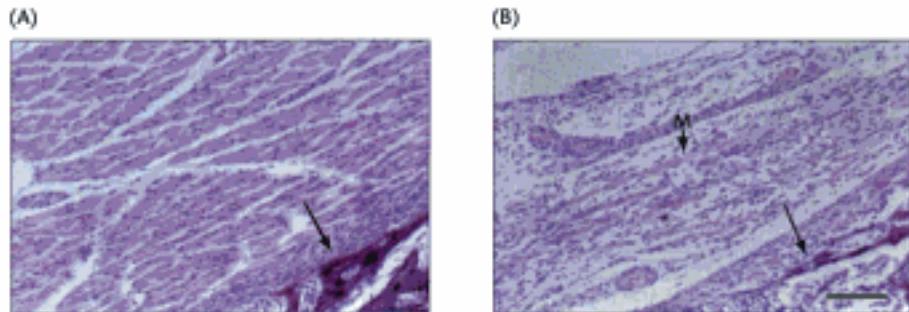


Figura 5.35 Consecuencias de la desactivación de genes. Secciones del músculo de ratones normales (A) y de ratones con genes desactivados (B), tal y como se observan con un microscopio óptico. En los ratones que tienen los dos genes de la miogenina desactivados, los músculos no se desarrollan de forma apropiada. [Tomado de P. Hasty, A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson y W. H. Klein, *Nature* 364(1993):501-506.]

La interferencia por RNA es una herramienta más para interrumpir la expresión de los genes

Una herramienta extremadamente poderosa para interrumpir la expresión génica fue descubierta por casualidad durante el transcurso de unos estudios en los que había que introducir RNA en una célula. Se descubrió que la introducción de una molécula específica de RNA de doble hebra en el interior de una célula suprimía la transcripción de los genes que contenían secuencias representadas en la molécula de RNA de doble hebra. Por tanto, la introducción de una molécula específica de RNA puede interferir con la expresión de un determinado gen.

El mecanismo de *interferencia por RNA* ha sido desentrañado en gran parte (Figura 5.36). Cuando una molécula de RNA de doble hebra se introduce en una célula adecuada, el RNA se escinde en fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud mediante un enzima denominado *Dicer*. Cada fragmento consta de 19 pb de RNA de doble hebra y 2 bases de RNA desemparejado, una a cada extremo 5'. Una vez separadas, cada una de las hebras sencillas de la molécula de RNA, denominada RNA pequeño de interferencia (siRNA), se incorpora a un enzima denominado *complejo silenciador inducido por RNA* (RISC, "RNA-induced silencing complex"). El fragmento de RNA de hebra sencilla que se incorpora al enzima actúa como guía para facilitar la escisión, catalizada por RISC, de aquellas moléculas de mRNA que incluyan fragmentos cuya secuencia sea perfectamente complementaria al siRNA. En consecuencia, los niveles de estas moléculas de mRNA se reducen de forma drástica.

La maquinaria precisa para la interferencia por RNA se encuentra en multitud de células. En algunos organismos, como *C. elegans*, la interferencia por RNA es bastante eficiente. De hecho, la interferencia por RNA se puede inducir de forma sencilla alimentando a *C. elegans* con cepas de *E. coli* que han sido manipuladas por ingeniería genética para producir las moléculas de RNA de doble hebra adecuadas. Aunque en las células de mamífero no es tan eficiente, la interferencia por RNA se ha convertido en una poderosa herramienta de investigación para reducir la expresión de determinados genes. Además, ya están en marcha los ensayos clínicos iniciales para terapias basadas en la interferencia por RNA.

Es posible utilizar plásmidos que producen tumores para introducir nuevos genes en células vegetales

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que suele encontrarse en el suelo, infecta a las plantas e introduce genes foráneos en sus células (Figura 5.37). En el lugar de la infección de la planta se desarrolla una protuberancia de tejido canceroso denominada *agalla de corona*. En estas agallas, las bacterias invasoras metabolizan opinas, un grupo de derivados de aminoácidos. En esencia, el metabolismo de la célula vegetal se desvía para satisfacer el muy particular apetito del intruso. Los *plásmidos inductores de tumores* (plásmidos Ti, del inglés "tumour-inducing plasmids") que alberga *A. tumefaciens* contienen las instrucciones para la transición al estado tumoral

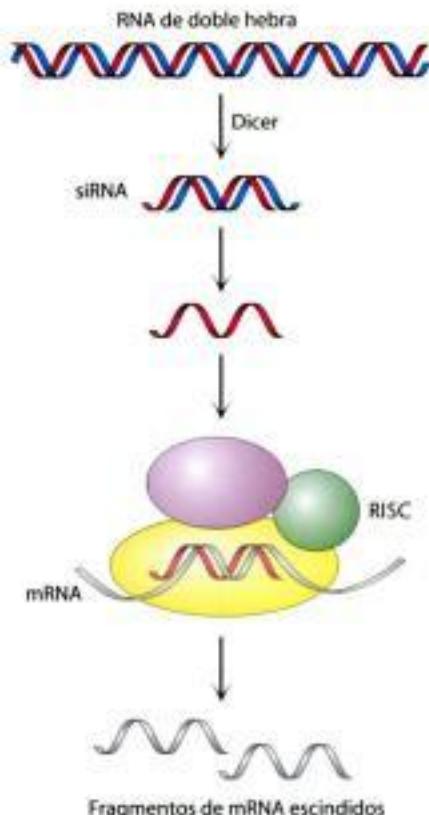


Figura 5.36 Mecanismo de la interferencia por RNA. Para generar los siRNA, el enzima Dicer corta una molécula de RNA de doble hebra en fragmentos de 21 pb. Estos siRNA se incorporan al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) y, una vez allí, los RNA de hebra sencilla provocan la escisión de los mRNA que contienen secuencias complementarias.

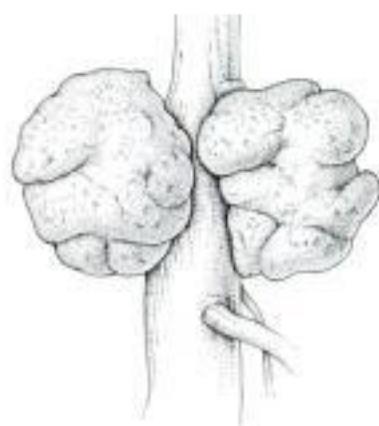


Figura 5.37 Tumores en plantas. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, portadora de un plásmido inductor de tumores (plásmido Ti), provoca la agalla de corona, un tumor vegetal.

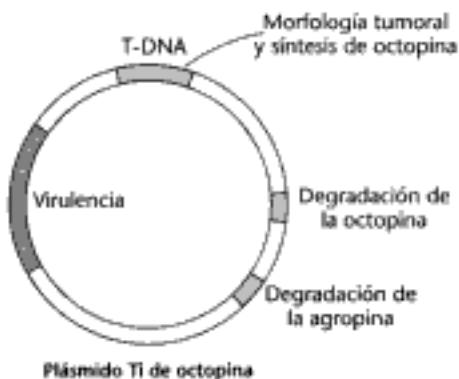


Figura 5.38 Plásmidos Ti. Las agrobacterias que contienen plásmidos Ti pueden introducir genes foráneos en el interior de ciertas células vegetales. [Tomado de M. Chilton, "A vector for introducing new genes into plants", Copyright © 1983 by Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

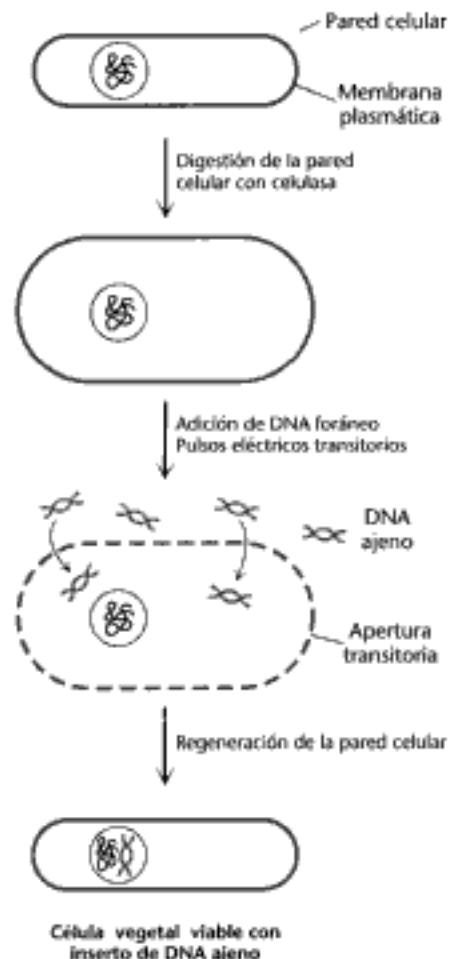


Figura 5.39 Electroporación. Es posible introducir DNA foráneo en células vegetales mediante electroporación, ya que la aplicación de campos eléctricos intensos hace que sus membranas plasmáticas adquieran una permeabilidad transitoria.

y a la síntesis de opinas. Una pequeña fracción del plásmido Ti se integra en el genoma de las células vegetales infectadas; este fragmento de 20 kb se denomina *T-DNA* (DNA transferido; Figura 5.38).

Es posible utilizar derivados del plásmido Ti como vectores para la introducción de genes foráneos en células vegetales. En primer lugar, mediante enzimas de restricción y ligasas, se inserta un fragmento de DNA foráneo en la región T-DNA de un plásmido pequeño. Este plásmido sintético se añade a colonias de *A. tumefaciens* que albergan los plásmidos Ti que se encuentran normalmente en la naturaleza. Por recombinación, se originan plásmidos Ti que contienen el gen foráneo. Estos vectores Ti constituyen una prometedora herramienta para investigar los genomas de células vegetales y para modificar las plantas a fin de incrementar su interés agrícola y el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, no valen para transformar cualquier tipo de plantas. La transferencia del plásmido Ti es efectiva en las dicotiledóneas (plantas de hoja ancha, como la vid) y en unas pocas monocotiledóneas, pero no en los cereales, monocotiledóneas de importante valor comercial.

Se puede introducir DNA foráneo tanto en monocotiledóneas (cereales) como en dicotiledóneas mediante la aplicación campos eléctricos intensos, una técnica conocida como *electroporación* (Figura 5.39). En primer lugar, se elimina la pared celular que rodea a las células vegetales mediante la adición de celulasa; este tratamiento origina *protoplastos*, células vegetales con la membrana plasmática expuesta. A continuación, se aplican pulsos eléctricos a una suspensión de protoplastos y DNA plasmídico. Como los campos eléctricos intensos hacen que las membranas adquieran una permeabilidad transitoria hacia moléculas grandes, las moléculas de DNA plasmídico penetran en las células. A continuación, se deja que se vuelva a formar la pared celular, de modo que las células vegetales vuelven a ser viables. De esta manera se han transformado células de maíz y de zanahoria de forma estable, utilizando un DNA plasmídico que contiene genes para la resistencia a antibióticos. Además, las células transformadas expresan el DNA plasmídico de forma eficiente. La electroporación también es un método eficaz para insertar DNA foráneo en células animales.

La forma más eficaz de transformar células vegetales es mediante la "*pistola de genes*" o *transformación por bombardeo*. Se recubren con DNA perdigones de wolframio de 1 mm de diámetro y estos microproyectiles se disparan sobre las células diana a una velocidad de más de 400 m s⁻¹. A pesar de que parece rudimentaria, esta técnica está demostrando ser la forma más eficaz de transformar plantas y, en particular, importantes especies de cultivo como la soja, el maíz, el trigo y el arroz. La técnica de la pistola de genes ofrece la posibilidad de desarrollar organismos genéticamente modificados (GMOs, "*genetically modified organisms*") con características beneficiosas. Dentro de estas características podrían estar la capacidad para crecer en suelos empobrecidos, la resistencia a variaciones climáticas naturales, la resistencia a plagas y el enriquecimiento nutricional. Estos cultivos podrían ser muy útiles en los países en vías de desarrollo. En estos momentos, el uso de organismos modificados genéticamente es objeto de polémica por el temor a que puedan provocar efectos secundarios imprevistos.

El primer GMO lanzado al mercado fue un tomate que se caracterizaba por un retraso en su maduración, haciéndolo ideal para el transporte. La pectina es un polisacárido que confiere firmeza a los tomates y se destruye de forma natural por medio del enzima *poligalacturonasa*. A medida que se destruye la pectina los tomates se ablandan dificultando así su transporte. Se introdujo un DNA que desactivaba el gen de la poligalacturonasa. Se produjo menos enzima y los tomates permanecían frescos durante más tiempo. Sin embargo, la pérdida de sabor del tomate desbarató su éxito comercial.

La terapia génica en humanos abre nuevos horizontes en medicina

El campo de la *terapia génica* trata de expresar genes específicos en el interior del cuerpo humano de forma que se obtengan resultados beneficiosos. El gen que se quiere expresar puede estar ya presente o puede introducirse a propósito. Por el contrario, la terapia génica puede tratar de modificar genes que contengan cambios en su secuencia que den lugar a efectos perjudiciales. Aún queda por hacer una

tremenda labor de investigación antes de que la terapia génica se aplique en medicina. No obstante, se han logrado avances considerables. Por ejemplo, algunas personas carecen de genes funcionales de la *adenosina desaminasa* y son vulnerables ante las infecciones incluso en un entorno normal, un cuadro clínico denominado *inmunodeficiencia combinada grave* (SCID, "severe combined immunodeficiency"). Mediante vectores de terapia génica basados en los retrovirus, se han introducido los genes funcionales de este enzima. Aunque estos vectores han producido enzimas funcionales y han reducido los síntomas clínicos, aún quedan retos por superar. Algunos de estos retos consisten en aumentar la duración de los efectos y eliminar efectos secundarios indeseados. Las futuras investigaciones prometen convertir la terapia génica en una herramienta importante para la medicina clínica.

Resumen

5.1 La investigación de los genes se basa en unas herramientas básicas

La revolución del DNA recombinante en biología tiene sus raíces en el repertorio de enzimas que actúan sobre los ácidos nucleicos. De todos ellos, los enzimas de restricción constituyen un grupo clave. Estas endonucleasas reconocen determinadas secuencias de bases en la doble hélice del DNA y escinden ambas hebras formando fragmentos específicos de DNA. Estos fragmentos de restricción se pueden separar y visualizar por electroforesis en gel. La distribución de estos fragmentos de restricción en el gel constituye la huella dactilar de una molécula de DNA. Se puede identificar un fragmento de DNA que contenga una determinada secuencia hibridándolo con una sonda de DNA de una hebra que esté marcada (transferencia Southern).

También se han desarrollado técnicas de secuenciación rápida para profundizar en el análisis de moléculas de DNA. Se puede secuenciar DNA mediante una interrupción controlada de la replicación. Los fragmentos así generados se separan por electroforesis en gel y se visualizan bien por autorradiografía (marcando previamente los extremo 5' con ^{32}P), bien mediante marcadores fluorescentes.

Mediante el método automatizado en fase sólida se pueden sintetizar tanto sondas de DNA para las reacciones de hibridación como genes totalmente nuevos. La técnica consiste en la adición secuencial de desoxirribonucleósido 3'-fosforamiditas a una cadena en crecimiento unida a un soporte insoluble. Este método permite sintetizar fácilmente cadenas de DNA de un centenar de nucleótidos. La reacción en cadena de la polimerasa hace posible amplificar enormemente *in vitro* el número de copias de un segmento específico de DNA. La región amplificada viene determinada por la ubicación de un par de cebadores que se añaden al DNA diana junto con una DNA polimerasa termoestable y los desoxirribonucleósidos trifosfato. La exquisita sensibilidad de la PCR la convierte en la técnica a elegir para la detección de marcadores patógenos o cancerígenos, para cartografiar el genotipo o para secuenciar el DNA procedente de fósiles con un antigüedad de muchos miles de años.

5.2 La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado todos los aspectos de la biología

Se pueden construir nuevos genes en el laboratorio, introducirlos en células hospedadoras y expresarlos. Las nuevas moléculas de DNA se construyen uniendo fragmentos que presentan extremos cohesivos complementarios, producidos por medio de la actividad de un enzima de restricción. La DNA ligasa forma enlaces en los lugares donde la cadena de DNA presenta una discontinuidad. Los vectores utilizados para propagar el DNA incluyen plásmidos, el fago λ y los cromosomas artificiales de bacterias y levaduras. Es posible clonar genes específicos a partir de una biblioteca genómica utilizando una sonda de DNA o de RNA. Con un vector apropiado es posible expresar DNA foráneo, una vez in-

sertado en células procarióticas o eucarióticas. Se pueden generar mutaciones específicas *in vitro* para fabricar nuevas proteínas mediante ingeniería genética. Es posible producir una proteína mutante con un único aminoácido cambiado utilizando como cebador para la replicación del DNA un oligonucleotídeo que codifique al nuevo aminoácido. Se pueden diseñar plásmidos de forma que faciliten la inserción de una cassette de DNA que contenga cualquier mutación deseada. Las técnicas basadas en la química de proteínas y de ácidos nucleicos exhiben un alto grado de sinergia. Hoy en día, los investigadores se desplazan del campo de los genes al campo de las proteínas y viceversa con mucha facilidad.

5.3 Se han secuenciado y analizado genomas completos

Las secuencias de multitud de genomas importantes se conocen en su totalidad. Se han secuenciado más de 100 genomas de bacterias y árqueas, entre los que se encuentran algunos organismos modelo básicos y patógenos de importancia. Hoy en día se ha completado la secuenciación del genoma humano abarcándolo prácticamente por entero con gran precisión. Aparentemente, el genoma humano contiene únicamente entre 20 000 y 25 000 genes, un número sustancialmente inferior a las estimaciones previas. La genómica comparativa se ha convertido en una poderosa herramienta para el estudio de genomas individuales y para investigar la evolución. Se pueden analizar los patrones de expresión génica de genomas completos mediante el uso de micromatrices de DNA.

5.4 Los genes eucarióticos se pueden manipular con una precisión considerable

La producción de ratones gigantes mediante la inyección del gen de la hormona de crecimiento de rata en óvulos de ratón fecundados demuestra fehacientemente que las células de mamífero pueden modificarse genéticamente de forma intencionada. Se pueden investigar las funciones de genes concretos mediante su desactivación. Un método para interrumpir la expresión de un gen particular consiste en la interferencia por RNA, que se basa en la introducción de moléculas específicas de RNA de doble hebra en células eucarióticas. Es posible introducir DNA nuevo en células vegetales por medio de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que alberga plásmidos Ti. También se puede introducir DNA en células vegetales aplicando campos eléctricos intensos, que hacen que las células adquieran una permeabilidad transitoria a moléculas muy grandes, o bombardeándolas con micropartículas cubiertas de DNA. La terapia génica abre nuevos horizontes para la medicina clínica, aunque todavía quedan muchos obstáculos que superar.

Términos clave

- enzima de restricción (p. 135)
- palíndromo (p. 136)
- sonda de DNA (p. 137)
- transferencia Southern (p. 137)
- transferencia Northern (p. 137)
- terminación controlada de la replicación (método dídesoxi de Sanger) (p. 138)
- reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. 140)
- vector (p. 142)
- plásmido (p. 142)
- plásmido inductor de tumores (plásmido Ti) extremos cohesivos (p. 143)
- DNA ligasa (p. 143)
- fago lambda (λ) (p. 144)

- cromosoma artificial bacteriano (BAC) (p. 145)
- cromosoma artificial de levadura (YAC) (p. 145)
- biblioteca genómica (p. 146)
- mutagénesis dirigida mediante oligonucleotídeo (p. 147)
- cassette de mutagénesis (p. 148)
- pseudogén (p. 150)
- elemento genético móvil (p. 150)
- elementos intercalados cortos (SINES) (p. 150)
- elementos intercalados largos (LINES) (p. 150)
- transcriptasa inversa (p. 152)
- DNA complementario (cDNA) (p. 152)
- micromatriz de DNA (chip génico) (p. 152)
- biblioteca de cDNA (p. 153)
- vector de expresión (p. 153)
- ratón transgénico (p. 153)
- desactivación génica (noquear genes, "gene knockout") (p. 155)
- interferencia por RNA (p. 157)
- complejo silenciador inducido por RNA (RISC) (p. 157)
- pistolas de genes (transformación por bombardeo) (p. 158)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Berg, P., 1981. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 213:296–303.
- Gilbert, W., 1981. DNA sequencing and gene structure. *Science* 214:1305–1312.
- Sanger, F., 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214:1205–1210.
- Mullis, K. B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262(4):56–65.

Libros sobre tecnología del DNA recombinante

- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. y Zoller, M., 1992. *Recombinant DNA* (2nd ed.). Scientific American Books.
- Grierson, D. (Ed.), 1991. *Plant Genetic Engineering*. Chapman and Hall.
- Mullis, K. B., Ferre, F. y Gibbs, R. A. (Eds.), 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser.
- Russel, D., Sambrook, J. y Russel, D., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. y Moore, D. D. (Eds.), 1999. *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley.
- Birren, B., Green, E. D., Klapholz, S., Myers, R. M., Reskams, J., Riethmann, H. y Hietter, P. (Eds.), 1999. *Genome Analysis* (vols. 1–4). Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Methods in Enzymology*. Academic Press. [En esta serie hay muchos volúmenes que tratan de la tecnología del DNA recombinante.]

Secuenciación y síntesis del DNA

- Hunkapiller, T., Kaiser, R. J., Koop, B. F. y Hood, L., 1991. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254:59–67.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463–5467.
- Maxam, A. M. y Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560–564.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H. y Hood, L. E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674–679.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. y Fodor, S. P. A., 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5022–5026.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G. G., Kerlavage, A. R., Smith, H. O. y Hunkapiller, M., 1998. Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280:1540–1542.

Reacción en cadena de la polimerasa

- Amheim, N. y Erflich, H., 1992. Polimerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131–156.
- Kirby, L. T. (Ed.), 1997. *DNA Fingerprinting: An Introduction*. Stockton Press.
- Eisenstein, B. I., 1990. The polymerase chain reaction: A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 322:178–183.
- Foley, K. P., Leonard, M. W. y Engel, J. D., 1993. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 9:380–386.
- Pálibo, S., 1993. Ancient DNA. *Sci. Am.* 269(5):86–92.
- Hagelberg, E., Gray, L. C. y Jeffreys, A. J., 1991. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352:427–429.
- Lawlor, D. A., Dickel, C. D., Hauswirth, W. W. y Parham, P., 1991. Ancient HLA genes from 7500-years-old archaeological remains. *Nature* 349:785–788.
- Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R. W., Krainitzki, H. y Pálibo, S., 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II for the Neanderthal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5581–5585.
- Orchinnikov, I. V., Götherström, A., Romanova, G. P., Kharkonov, V. M., Liden, K. y Goodwin, W., 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404:490–493.

Secuenciación de genomas

- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931–945.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. y col. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A. y col. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. y col. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562.
- Koonin, E. V. 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:127–136.
- Gilligan, P., Brenner, S. y Venkatesh, B., 2002. Fugu and human sequence comparison identifies novel genes and conserved non-coding sequences. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134:33–44.
- Enard, W. y Pálibo, S., 2004. Comparative primate genomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5:351–378.

Matrices de DNA

- Duggan, D. J., Bistner, J. M., Chen, Y., Meltzer, P. y Trent, J. M., 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21:10–14.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. y Lander, E. S., 1999. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffery, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lanning, P. E., Borresen-Dale, A.-L., Brown, P. O. y Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752.

Introducción de genes en células animales

- Anderson, W. F., 1992. Human gene therapy. *Science* 256:808–813.
- Friedmann, T., 1997. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci. Am.* 277(6):96–101.
- Blaese, R. M., 1997. Gene therapy for cancer. *Sci. Am.* 277(6):111–115.
- Brinster, R. L. y Palmiter, R. D., 1986. Introduction of genes into the germ lines of animals. *Harvey Lect.* 80:1–38.
- Capechi, M. R., 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288–1292.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. y Klein, W. H., 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501–506.
- Parkmann, R., Weinberg, K., Crooks, G., Nolta, J., Kapoor, N. y Kohn, D., 2000. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Annu. Rev. Med.* 51:33–47.

Interferencia por RNA

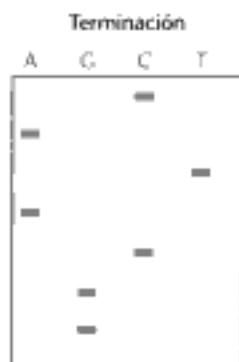
- Novina, C. D. y Sharp, P. A., 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430:161–164.
- Hannon, G. J. y Rossi, J. J., 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431:371–378.
- Meister, G. y Tuschi, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343–349.
- Elbashir, S. M., Harbooth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschi, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494–498.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. y Mello, C. C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Celegans elegans*. *Nature* 391:806–811.

Ingeniería genética de plantas

- Gasser, C. S. y Fraley, R. T., 1992. Transgenic crops. *Sci. Am.* 266(6):62–69.
 Gasser, C. S. y Fraley, R. T., 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244:1293–1299.
 Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. y Fujimoto, H., 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338:274–276.

Problemas

1. Lectura de secuencias. En la ilustración adjunta se muestra un autoradiograma de un gel de secuenciación con cuatro calles de fragmentos de DNA. (a) ¿Cuál es la secuencia de este fragmento de DNA? (b) Supongamos que el método didesoxi de Sanger determina que la secuencia de una hebra molde es 5'-TGCAATGGC-3'. Dibujar la posición de las bandas del gel que nos permitiría llegar a esta conclusión.



2. El molde correcto. La ovoalbúmina es la proteína mayoritaria de la clara de huevo. El gen de la ovoalbúmina de pollo contiene ocho exones separados por siete intrones. Si se quiere producir la proteína en *E. coli*, ¿qué deberíamos utilizar, el DNA genómico de la ovoalbúmina o su cDNA? ¿Por qué?

3. Frecuencia de escisión. El enzima de restricción *Aba*I produce un corte en la secuencia 5'-AGCT-3' y *Nor*I en 5'-GCGGCCGC-3'. Cuando se digiere un DNA de doble hebra, ¿cuál será la distancia promedio entre dos lugares de escisión de cada enzima? Se supone que el DNA contiene proporciones iguales de A, G, C y T.

4. Los cortes correctos. Supongamos que se prepara una biblioteca genómica humana por digestión exhaustiva de DNA humano con el enzima de restricción *Eco*RI. Se generan fragmentos con una longitud media de 4 kb. ¿Es este procedimiento apropiado para clonar genes de gran tamaño? Justificar la respuesta.

5. Una escisión reveladora. La anemia falciforme es consecuencia de una mutación en el gen de la cadena β de la hemoglobina humana. El cambio de GAG a GTG en el mutante elimina un lugar de restricción para el enzima *Msp*II, que reconoce la secuencia diana CCTGAGG. Estos hallazgos constituyen la base de un método de diagnóstico para detectar la presencia del gen de la anemia falciforme. Proponer un procedimiento rápido para distinguir entre el gen normal y el gen mutante. En caso de que la prueba diera resultado positivo, ¿quedaría demostrado que el mutante contiene GTG en vez de GAG?

6. Una cassette con muchas canciones. Supongamos que se ha aislado un enzima que digiere la pasta de papel y que se ha obtenido

- Chilton, M.-D., 1983. A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Am.* 248(6):50–59.
 Hansen, G. y Wright, M. S., 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4:226–231.
 Hammond, J., 1999. Overview: The many uses of transgenic plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:1–20.
 Finer, J. J., Finer, K. R. y Ponappa, T., 1999. Particle bombardment mediated transformation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:60–80.

su cDNA. Se intenta producir un mutante que sea efectivo a altas temperaturas. Por ingeniería genética se ha introducido un par de lugares de restricción únicos que flanquean una región codificadora de 30 pares de bases en el cDNA. Proponer una técnica para generar de forma rápida muchos mutantes diferentes en esta región.

7. Una bendición y una maldición. El poder de la PCR también puede crear problemas. Supongamos que alguien afirma que ha aislado DNA de dinosaurios utilizando PCR. ¿Qué preguntas habría que hacer para determinar si es verdaderamente DNA de dinosaurios?

8. Cuestión de precisión. La rigurosidad (p. 141) de la amplificación por PCR se puede controlar variando la temperatura a la cual tiene lugar la hibridación entre los cebadores y el DNA diana. ¿Cómo se vería afectada la amplificación mediante un cambio de la temperatura de hibridación? Supongamos que tenemos un gen concreto de levadura (el gen A) y que queremos comprobar si tiene un equivalente en humanos. ¿En qué medida nos podría ayudar el control de la rigurosidad de la hibridación?

9. Terra incognita. La PCR se utiliza normalmente para amplificar un DNA que se encuentra entre dos secuencias conocidas. Supongamos que se quiere examinar el DNA situado a ambos lados de una única secuencia conocida. Diseñar una variación del protocolo habitual de PCR que permita amplificar un territorio genómico totalmente nuevo.

10. Una escalera misteriosa. El patrón de un gel en el que se visualizan los productos de una PCR muestra cuatro bandas intensas. Las longitudes de los cuatro fragmentos de DNA se encuentran en una relación de aproximadamente 1:2:3:4. Se corta el gel para extraer la banda más grande y se utiliza para repetir la PCR con los mismos cebadores. De nuevo, se observa en el gel una escalera de cuatro bandas. ¿Qué es lo que revelan estos resultados sobre la estructura de la proteína codificada?

11. Recorrido cromosómico. Proponer un método que permita aislar un fragmento de DNA que, en el genoma, sea adyacente a un fragmento de DNA aislado previamente. Supongamos que se tiene acceso a una biblioteca completa de fragmentos de DNA en vectores BAC pero que aún no se ha determinado la secuencia del genoma que estamos estudiando.

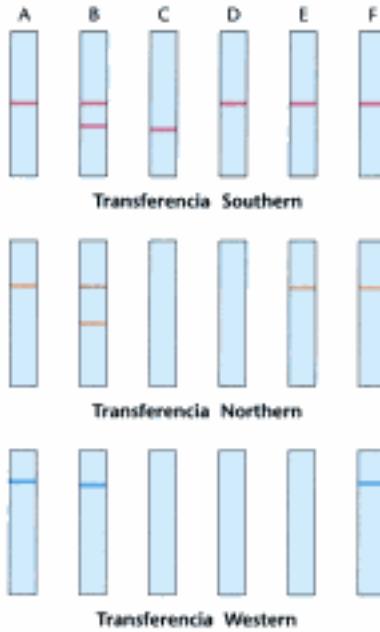
12. El mejor amigo del hombre. ¿Por qué resultaría el análisis genómico de los perros particularmente útil para el estudio de los genes responsables del tamaño corporal y otras características físicas?

Problema de Integración del Capítulo

- 13. Diseño de cebadores.** A menudo, el éxito de un experimento de PCR depende del correcto diseño de los cebadores. Concretamente, la T_m de cada cebador debe ser aproximadamente la misma. ¿Cuál es el fundamento de este requerimiento?

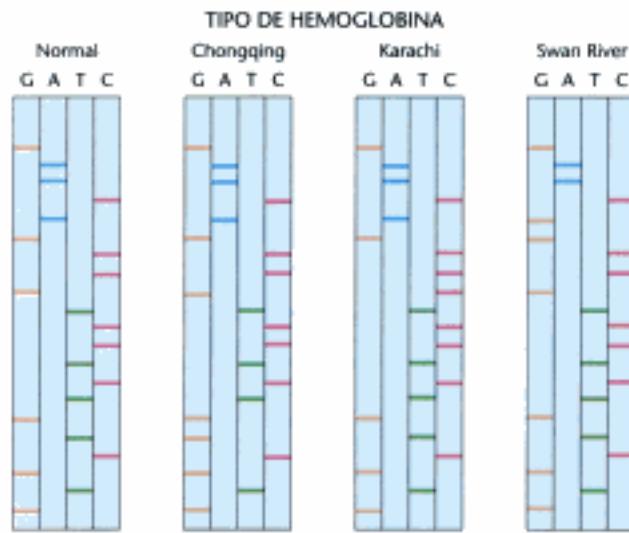
Problema de integración de capítulos y de interpretación de datos

14. *En todas direcciones excepto por el este.* Se ha encontrado que una serie de personas tienen dificultades para eliminar cierto tipo de fármacos de su torrente sanguíneo. Se ha relacionado el problema con un gen X, que codifica un enzima Y. Se hicieron pruebas a seis personas utilizando diversas técnicas de biología molecular. El individuo A es un control normal, el individuo B no presenta síntomas pero alguno de sus hijos tiene el problema metabólico, y los individuos de C a F muestran los síntomas. Se obtuvieron muestras de tejido de cada individuo. Tras la digestión con el enzima de restricción *Hind*III se realizó la transferencia Southern del DNA. También se llevó a cabo la transferencia Northern del mRNA. En ambos tipos de análisis los geles se colocaron en presencia de una sonda obtenida mediante el marcaje del cDNA de X. Por último, para detectar la presencia de la proteína Y se realizó una transferencia Western con un anticuerpo monoclonal unido a un enzima. Los resultados se muestran a continuación. ¿Por qué el individuo B no presenta síntomas? Sugiera posibles defectos en el resto de los individuos.



Problema de interpretación de datos

15. *Diagnóstico basado en el DNA.* En la figura se representan los geles de secuenciación correspondientes a diversas variantes de la cadena α de la hemoglobina humana. ¿Qué tipo de cambio de aminoácido aparece en cada una de las variantes? El primer triplete codifica la valina.



Técnicas animadas

Visite <http://www.whfreeman.com/stryer> para ver animaciones de la secuenciación del DNA por el método de los dideoxínucleótidos, la reacción en cadena de la polimerasa, la síntesis de una matriz de oligonucleótidos, la búsqueda de patrones de expresión génica en una matriz de oligonucleótidos, la clonación en plásmidos, la mutagénesis in vitro de genes clonados y la creación de un ratón transgénico. [Cortesía de Lodish y col., *Molecular Cell Biology*, 5^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2004).]

Investigación de la evolución y la bioinformática

Las relaciones evolutivas se manifiestan en las secuencias de las proteínas. El estrecho parentesco entre los seres humanos y los chimpancés, insinuado por el interés mutuo que demuestran en esta fotografía Jane Goodall y un chimpancé, se revela con claridad en la secuencia de aminoácidos de la mioglobina. La secuencia de la mioglobina humana (en rojo) se diferencia de la del chimpancé (en azul) únicamente en un aminoácido en una proteína de 153 residuos. [(A la derecha) Kennan Ward/Corbis.]



GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDFKHLKSEDEMKAESDLKKHGATVLTALGGIL
GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDFKHLKSEDEMKAESDLKKHGATVLTALGGIL

KKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLHSKHPGDFGADAQGMNKALELFRKDMASNYKELGFOQG
KKKGHHEAEIKPLAQSHATKHKIPVKYLEFISECIIQVLQSHPGDFGADAQGMNKALELFRKDMASNYKELGFOQG

Contenido

- 6.1 Los homólogos descenden de un antepasado común
- 6.2 La homología puede detectarse mediante el análisis estadístico de secuencias alineadas
- 6.3 El estudio de las estructuras tridimensionales potencia nuestro conocimiento de los parentescos evolutivos
- 6.4 Sobre la base de la información de las secuencias se pueden construir los árboles evolutivos
- 6.5 Técnicas modernas hacen posible el estudio experimental de la evolución

A igual que los miembros de una familia humana, los miembros de las familias moleculares presentan con frecuencia aspectos comunes. Tales semejanzas familiares se detectan mucho más fácilmente al comparar las estructuras tridimensionales que representan los caracteres de las moléculas más estrechamente vinculados con sus funciones. Consideremos, por ejemplo, la ribonucleasa bovina que ya fue presentada en el estudio del plegado de las proteínas (Sección 2.6). Por comparación de las estructuras se advierte que la estructura tridimensional de esta proteína es muy similar a la de la ribonucleasa humana (Figura 6.1). Aunque esta similitud se podía esperar, dada la semejanza de sus funciones biológicas, otras similitudes reveladas por la comparación resultan a veces sorprendentes. Así, por ejemplo, la angiogenina, una proteína identificada por su capacidad de estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, también resulta ser estructuralmente semejante a la ribonucleasa; tan similar que resulta evidente que ambas, angiogenina y ribonucleasa, son miembros de la misma familia de proteínas (Figura 6.2). La angiogenina y la ribonucleasa deben haber tenido un antepasado común en alguna etapa anterior de la evolución.

Por desgracia, las estructuras tridimensionales se han logrado determinar sólo en un número reducido de proteínas. Por el contrario, se dispone de las secuencias génicas y las correspondientes secuencias de aminoácidos para un gran número de proteínas, debido en gran medida al enorme poder de clonar DNA y a la perfección de las técnicas de secuenciación. Las relaciones evolutivas también se manifiestan en las secuencias de aminoácidos. Así, por ejemplo, la comparación de estas secuencias entre la ribonucleasa bovina y la angiogenina revela que el 35% de los aminoácidos en las posiciones correspondientes son idénticos. ¿Resulta suficiente este nivel de semejanza para asegurar una relación evolutiva? Si no lo fuese, ¿qué nivel se requeriría? En este capítulo estudiaremos los métodos que se utilizan para comparar las secuencias de aminoácidos y deducir sus posibles relaciones evolutivas.

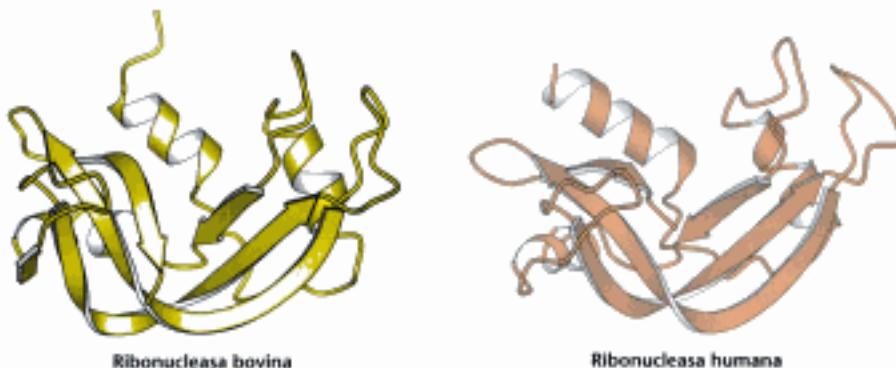


Figura 6.1 Estructura de la ribonucleasa bovina y humana. A la semejanza estructural le sigue a menudo la semejanza funcional. [Tomado de 8RAT.pdb. y 2RNF.pdb.]

Los métodos de comparación de secuencias se han convertido en uno de los instrumentos más poderosos en la bioquímica moderna. Las bases de datos de secuencias pueden sondearse a fin de emparejar una secuencia recién dilucidada e identificar las moléculas con las que está emparentada. Esta información puede ser con frecuencia una fuente informativa decisiva sobre la función y el mecanismo operativo de la molécula recién secuenciada. Cuando se dispone de la estructura tridimensional, se pueden comparar las moléculas para confirmar las relaciones sugeridas por la comparación de secuencias y para revelar otras que no se habían detectado con la secuencia sola.

Al examinar las huellas presentes en las secuencias de proteínas modernas, el bioquímico puede convertirse en un arqueólogo molecular, capaz de averiguar sucesos de pasado evolutivo. Las comparaciones de secuencias pueden desvelar con frecuencia las dos vías de una descendencia evolutiva y determinar las fechas de los hitos evolutivos específicos. Esta información puede utilizarse para trazar mapas evolutivos que describan la evolución de una proteína particular o de un ácido nucleico desde las arqueas y bacterias hasta los eucariotas, incluido el ser humano. La evolución molecular también puede estudiarse de modo experimental. En algunos casos se puede amplificar el DNA procedente de fósiles utilizando métodos de PCR (p. 178) y secuenciarlo, aportando una visión directa del pasado. Además, los investigadores pueden observar la evolución molecular que tiene lugar en el laboratorio, por medio de experimentos basados en la replicación de los ácidos nucleicos. Los resultados de tales estudios resultan reveladores de cómo ha transcurrido la evolución.

6.1 Los homólogos descienden de un antepasado común

La explicación de la evolución bioquímica consiste fundamentalmente en un intento de establecer cómo las proteínas, otras moléculas y las vías metabólicas se han modificado a lo largo del tiempo. La relación principal entre dos entidades es la *homología*; se dice que dos moléculas son *homólogas* si ambas derivan de un antepasado común. Las moléculas homólogas, es decir, los *homólogos*, pueden dividirse en dos clases (Figura 6.3). Los *parálogos* son homólogos presentes en la misma especie. Los parálogos se diferencian, con frecuencia, en sus funciones bioquímicas detalladas. Los *ortólogos* son homólogos presentes en especies diferentes pero con funciones idénticas o semejantes. El conocimiento de la homología entre las moléculas puede desvelar su historia evolutiva a la vez que informar sobre sus funciones; si una proteína recién secuenciada resulta homóloga de otra ya bien conocida, disponemos de una fuerte indicación de cuál puede ser la función bioquímica de la nueva proteína.

¿Cómo podemos afirmar que dos proteínas humanas son parálogas o si una proteína de la levadura es ortóloga de otra humana? Tal como veremos en la Sección 6.2 la homología se manifiesta frecuentemente por una similitud significativa en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, casi siempre proyectada en la estructura tridimensional.

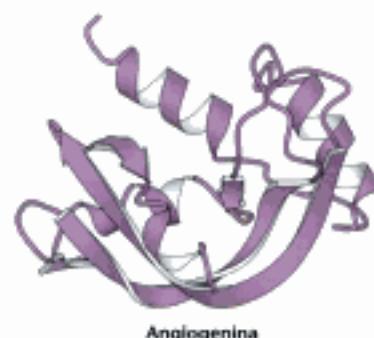


Figura 6.2 Estructura de la angiogenina. La proteína angiogenina, identificada por su capacidad de estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos, es muy semejante a la ribonucleasa. [Tomado de 2ANG.pdb.]

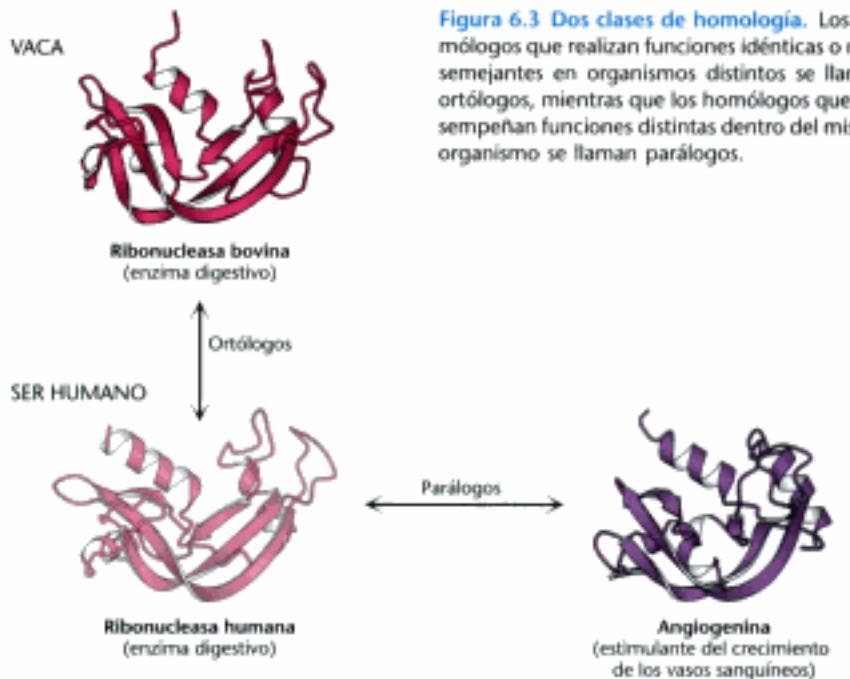


Figura 6.3 Dos clases de homología. Los homólogos que realizan funciones idénticas o muy semejantes en organismos distintos se llaman ortólogos, mientras que los homólogos que desempeñan funciones distintas dentro del mismo organismo se llaman parálogos.

6.2 La homología puede detectarse mediante el análisis estadístico de secuencias alineadas

Una semejanza significativa en las secuencias de dos moléculas implica que ellas deben tener el mismo origen evolutivo y, por consiguiente, la misma estructura tridimensional, la misma función y mecanismo. Aunque, para detectar homología, se pueden comparar las secuencias de los ácidos nucleicos o de las proteínas, la comparación de las secuencias de las proteínas es mucho más efectiva por varias razones, sobre todo porque las proteínas se construyen con 20 aminoácidos distintos, mientras que el RNA y el DNA se construyen solamente con 4 monómeros.

Para ilustrar los métodos de comparación de secuencias, consideremos una clase de proteínas denominadas *globinas*. La mioglobina es una proteína que se une al oxígeno en el músculo, mientras que la hemoglobina es transportadora de oxígeno en la sangre (Capítulo 7). Ambas proteínas cobijan un grupo hemo, la molécula orgánica que contienen el átomo de hierro que se une al oxígeno. Cada molécula de hemoglobina humana consta de cuatro cadenas polipeptídicas que contienen sendos grupos hemo: dos cadenas α idénticas y dos cadenas β también idénticas entre sí. Ahora sólo consideraremos la cadena α : compararemos la semejanza entre la secuencia de aminoácidos de la cadena α humana y la de la mioglobina también humana (Figura 6.4). Para detectar tal similitud, se han desarrollado métodos basados en el *alineamiento de secuencias*.

Hemoglobina humana (cadena α)

```
VLSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEEALERMFILSFPTTKTYFPHFFDLSHG  
SAQVKGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLS  
HCLLVTLAAHLPAEFTPASVHASLDKFLASVSTVLTSKYR
```

Mioglobina humana

```
GLSDGEWQLVLNVWGKVEADI PGHQQEVLIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKS  
EDEMKAESDLKKHGATVLTALGGILKKKGHAEIKPLAQSHATKHKIPVK  
YLEFISECI1QVLQSKHPGDFGADAQGMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
```

Figura 6.4 Secuencia de aminoácidos de la hemoglobina humana (cadena α) y de la mioglobina humana. La hemoglobina se compone de 141 aminoácidos y la mioglobina, de 153. (Se utilizan abreviaturas de una letra para designar los aminoácidos; véase la Tabla 2.2.)

(A)



(B)

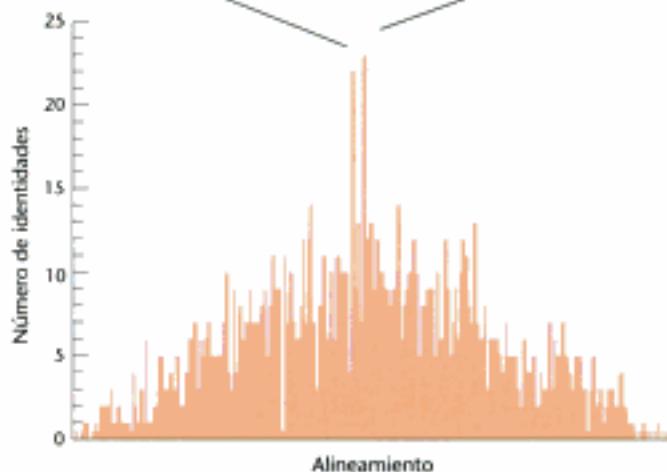
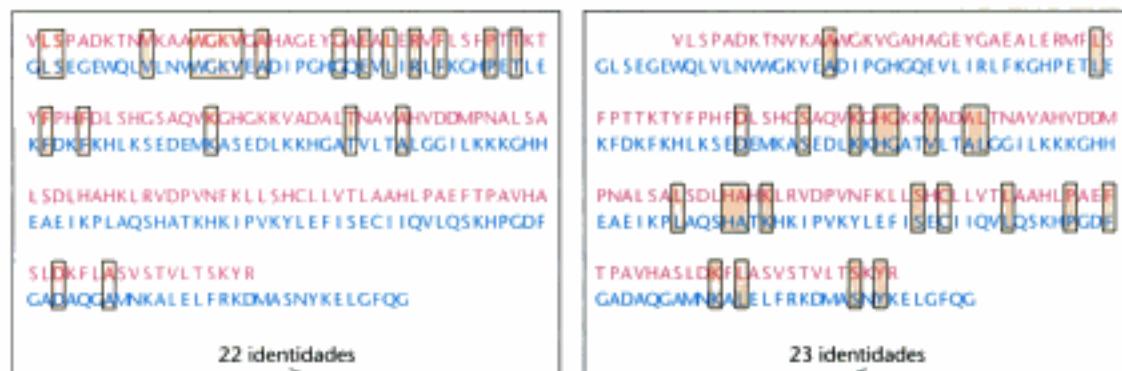


Figura 6.5 Comparación de las secuencias de aminoácidos de la hemoglobina α y de la mioglobina. (A) Se hizo la comparación deslizando la secuencia de una de las dos proteínas sobre la otra, desplazándola un aminoácido cada vez y contando el número de aminoácidos que resultaban idénticos entre ambas. (B) Arriba del gráfico se registra el número de identidades en función del alineamiento y se muestran los dos alineamientos con mayor número de identidades conseguido.

¿Cómo se pueden alinear las dos secuencias? El abordaje más sencillo consiste en comparar todas las yuxtaposiciones posibles de la secuencia de una proteína respecto a la otra, registrando en cada caso el número de residuos idénticos que se alinean entre ambas. Esta comparación puede realizarse por simple deslizamiento de una secuencia sobre la otra, desplazándola un aminoácido cada vez y contando el número de residuos que coinciden (Figura 6.5).

Para la hemoglobina α y la mioglobina, el mejor alineamiento revela 23 identidades de secuencias espaciadas por la parte central de ambas secuencias. Sin embargo, un alineamiento próximo que presenta 22 identidades se considera casi igual de bueno. En este alineamiento, las identidades se concentran hacia el extremo amino-terminal de las secuencias. Estas secuencias podrían alinearse para conseguir un número máximo de identidades entre ambos alineamientos, mediante la introducción



Figura 6.6 Alineamiento con inserción de un hueco. Alineamiento de la hemoglobina α y la mioglobina después de haber insertado un hueco en la secuencia de la hemoglobina α .

de un *hueco* o *brecha* en una de las dos secuencias (Figura 6.6). Tales huecos deben insertarse frecuentemente para compensar los desajustes, por inserciones o delecciones de nucleótidos, que pueden haber ocurrido en el gen de una de las dos moléculas y no en la otra, en el curso de la evolución.

El uso de los huecos aumenta considerablemente la complejidad del alineamiento de secuencias porque, en principio, debe considerarse la inclusión de huecos de tamaños arbitrarios en cualquier parte de cada secuencia. Sin embargo, se han desarrollado métodos para la inserción de huecos en forma automática en el alineamiento de secuencias. Estos métodos utilizan técnicas de calificación para comparar diferentes alineamientos e incluyen penalizaciones a la inclusión de huecos para evitar la inserción de un número no razonable de ellos. He aquí un ejemplo de este sistema de clasificación: a cada identidad entre secuencias alineadas se le asignan + 10 puntos; mientras que a cada hueco introducido, sin tener en cuenta su tamaño, se le asignan -25 puntos. Para el alineamiento mostrado en la Figura 6.6, en la que hay 38 identidades y 1 hueco, se le asigna una calificación de $(38 \times 10 - 1 \times 25 = 355)$. Con todo, hay 38 aminoácidos emparejados en una longitud media de 147 residuos; así pues, las secuencias resultan idénticas en un 25,9%. La siguiente etapa sería preguntar: ¿resulta significativo este porcentaje de identidades?

ESTA ES LA SECUENCIA VERDADERA

Reordenación aleatoria o barajado (shuffled)

LSE DRAAT SERNACUVNCESAEID

Figura 6.7 Generación de una secuencia por barajado (shuffled).

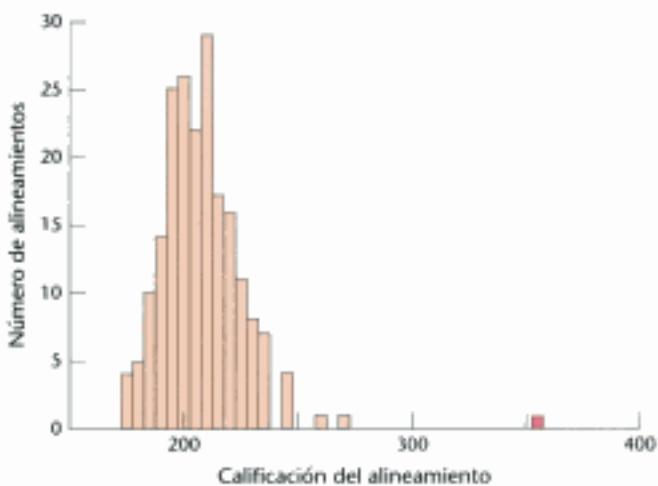


Figura 6.8 Comparación estadística de las calificaciones de alineamiento. Se calculan las calificaciones para muchas secuencias barajadas y se representa el número de secuencias que generan una determinada calificación frente a esa calificación particular. El gráfico resultante es una distribución de las calificaciones de alineamiento que se obtienen al azar. La calificación de alineamiento para la hemoglobina α y la mioglobina (representada en rojo) es claramente mayor que cualquiera de estas calificaciones, lo que sugiere con fuerza que la similitud de las secuencias es significativa.

El significado estadístico de los alineamientos puede valorarse reordenando los componentes al azar

Las similitudes en las secuencias de la Figura 6.5 resultan espectaculares, pero aún cabe la posibilidad de que el agrupamiento de secuencias idénticas haya ocurrido solamente por azar. ¿Podemos valorar la probabilidad de que una serie específica de identidades tenga lugar por azar? Para realizar tal valoración, la secuencia de los aminoácidos de una de las proteínas se “baraja”, es decir, se reorganiza al azar y se repite la técnica del alineamiento (Figura 6.7). Se repite este proceso para conseguir una distribución que muestre, para cada posible calificación, el número de secuencias aleatorias que la obtuvieron.

Cuando se aplica este procedimiento a las secuencias de la mioglobina y la hemoglobina α , aparece con claridad el alineamiento auténtico (Figura 6.8). Esta calificación dista mucho del promedio de las calificaciones por alineamiento basadas en secuencias barajadas. Las probabilidades de que una desviación semejante sea debida solamente al azar son aproximadamente de 1 entre 10^{20} . Así pues, podemos concluir con seguridad que dos secuencias son genuinamente similares; la explicación más sencilla de esta semejanza es que ambas secuencias sean homólogas, es decir, que las dos moléculas sean descendientes de un antepasado común.

Los parentescos evolutivos lejanos pueden detectarse mediante la utilización de matrices de sustitución

El esquema de calificación descrito más arriba únicamente asigna puntos a las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos en las dos secuencias que se comparan. No se concede ningún valor a los emparejamientos que no sean idénticos. Sin embargo, no todas las sustituciones son equivalentes. Algunas *sustituciones* son estructuralmente *conservadoras*, al sustituir un aminoácido por otro similar en tamaño y propiedades químicas. Tales sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden provocar efectos menores en la estructura de las proteínas, de modo que pueden tolerarse sin comprometer su función. En otras sustituciones un aminoácido sustituye a otro completamente distinto. Además, algunas sustituciones de aminoácidos son el resultado de reemplazar un solo nucleótido en la secuencia genética; mientras que otras requieren dos o tres sustituciones de nucleótidos. Las sustituciones conservadoras y de un solo nucleótido son lógicamente más comunes que aquellas sustituciones con efectos más radicales. ¿Cómo podemos ponderar el tipo de sustitución cuando comparamos las se-

cuencias? La respuesta es que necesitamos una medida que refleje tanto la probabilidad de que una sustitución sea conservadora como la probabilidad de que sea radical. La matriz de sustitución de Dayhoff (Figura 6.9) es una colección de tales probabilidades para cada uno de los 20 aminoácidos.

cuencias? Se puede abordar este problema viendo primero las sustituciones que realmente tuvieron lugar en las proteínas emparentadas evolutivamente.

Del examen de las secuencias, debidamente alineadas, pueden deducirse las matrices de sustitución. En estas matrices, una calificación muy positiva corresponde a las sustituciones que tienen lugar con relativa frecuencia, mientras que una calificación muy negativa se adjudica a las sustituciones que sólo tienen lugar rara vez. La matriz de sustitución Blosum-62, ilustrada en la figura 6.9 constituye un buen ejemplo. Las calificaciones más elevadas en esta matriz de sustitución indican que amino-

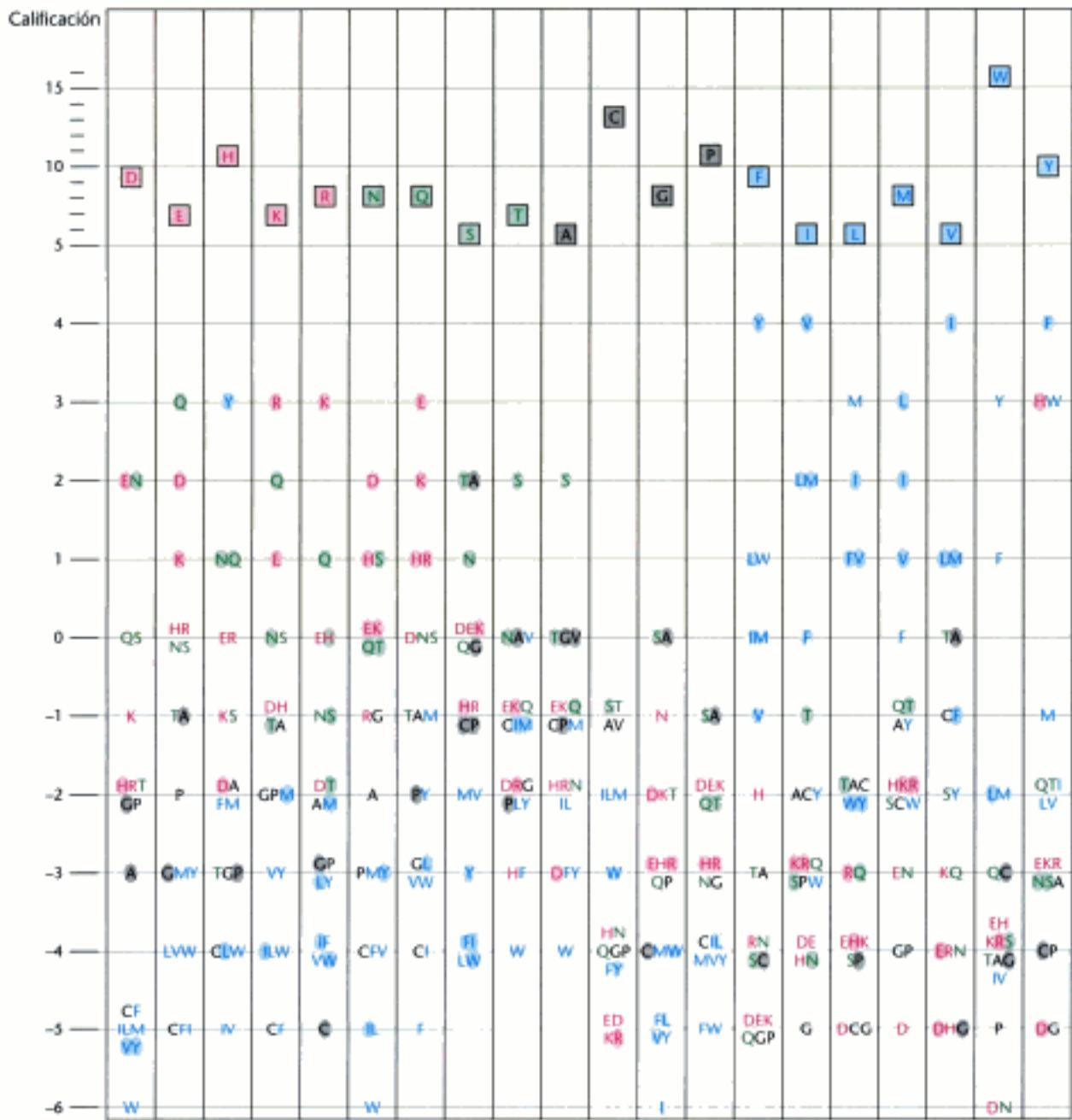


Figura 6.9 Una visión gráfica de la matriz de sustitución Blosum-62. Este esquema calificador se obtuvo examinando las sustituciones que tienen lugar dentro de bloques de secuencias alineadas entre proteínas relacionadas. Los aminoácidos se clasifican en cuatro grupos (cargados, en rojo; polares, en verde; grandes e hidrofóbicos, en azul; los demás, en negro). Se han sombreado las sustituciones que requieren el cambio de un solo nucleótido. Para determinar la calificación de una sustitución, por ejemplo, una Y en vez de una H, se debe buscar la Y en la columna encabezada por una H (enmarcada) en la parte superior y se localiza el número de la izquierda. En este caso, la calificación resultante sería 3.

ácidos, tales como la cisteína (C) y el triptófano (W), tienden a conservarse más que otros, como la serina (S) y la alanina (A). Además, las sustituciones estructuralmente conservadoras, tales como lisina (K) por arginina (R) e isoleucina (I) por valina (V) tienen calificaciones relativamente altas. Cuando se comparan dos secuencias, a cada sustitución se le asigna una calificación basada en esta matriz. Además, la penalización que se asigna a los huecos depende con frecuencia de su tamaño. Así, por ejemplo, la introducción de un hueco disminuye la calificación por alineamiento en 12 puntos y la extensión o longitud de un hueco existente cuesta 2 puntos por cada residuo. Utilizando este sistema de calificación, el alineamiento que se muestra en la figura 6.6 recibe una calificación de 115. En muchas regiones, la mayoría de las sustituciones son conservadoras (definidas como las sustituciones con calificación superior a cero) y relativamente pocas corresponden a tipos muy desfavorables (Figura 6.10).



Figura 6.10 Alineamiento con anotación de las sustituciones conservadoras. Alineamiento de la hemoglobina α y la mioglobina donde se señalan las sustituciones conservadoras con un sombreado amarillo y las identidades en naranja.

Este sistema de calificación es capaz de detectar homologías entre secuencias con menor evidencia en su parentesco y tiene por tanto mayor sensibilidad que el sistema que solamente compara las identidades. Consideremos, por ejemplo, la proteína leghemoglobina, una proteína que retiene el oxígeno, presente en las raíces de ciertas plantas. La secuencia de aminoácidos de la leghemoglobina del altramuz puede alinearse con la mioglobina humana y calificarse, bien utilizando el esquema de calificación simple basado en las identidades de aminoácidos, bien con la matriz de calificación Blosum-62 (ver Figura 6.9). Repitiendo el barajado y las calificaciones correspondientes se obtiene una distribución de calificaciones de alineamiento (Figura 6.11). La calificación basada en las identidades de los aminoácidos sólo indica que la probabilidad de alineamiento entre la mioglobina y la leghemoglobina debida al azar es de 1 entre 20. Así pues, aunque el nivel de semejanza sugiere que existe una relación mutua, queda un 5% de probabilidades de que la semejanza fuese accidental según este análisis. Por el contrario, los que utilizan la matriz de sustitución pueden incorporar los efectos de las sustituciones conservadoras. De esos análisis se deduce que la probabilidad de que el alineamiento sea debido al azar se calcula que es, aproximadamente, de 1 entre 300. Por consiguiente, el análisis realizado mediante la

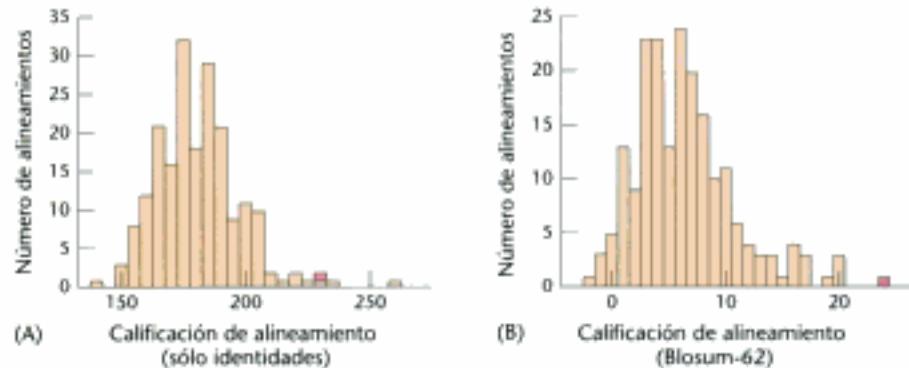
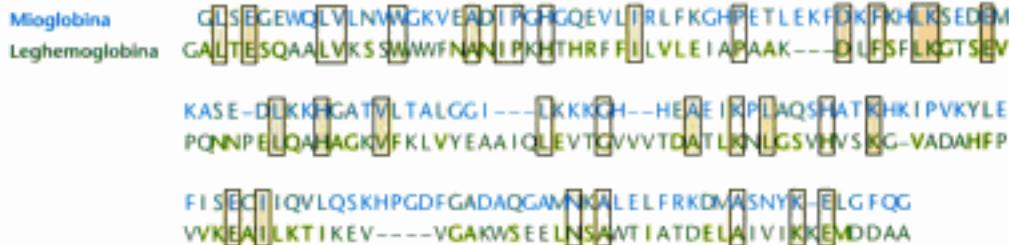


Figura 6.11 Alineamiento comparado de "sólo identidades" frente a "matriz Blosum-62". El barajar y calificar reiteradamente revela los valores significativos para el alineamiento de la mioglobina humana respecto a la leghemoglobina del altramuz mediante el uso de (A) el sistema de calificación simple basado en las identidades, o bien (B) la matriz Blosum-62. Las calificaciones de las secuencias auténticas se representan en rojo. La matriz Blosum-62 aporta mayor valor estadístico.



matriz de sustitución alcanza una conclusión más firme sobre la relación evolutiva entre ambas proteínas (Figura 6.12).

La experiencia con los análisis de secuencia ha llevado a desarrollar unas reglas empíricas muy simples. Para secuencias de más de 100 aminoácidos, las identidades que superan un 25% no pueden ser casi con toda certeza el resultado del azar; tales secuencias son probablemente homólogas. Por el contrario, si dos secuencias presentan identidades menores del 15%, la comparación por sí sola no es adecuada para indicar una similitud estadísticamente significativa. Para secuencias con identidades comprendidas entre el 15% y el 25% se requieren análisis complementarios para establecer la significación estadística del alineamiento. Debemos resaltar que *la falta de un grado aceptable de significación estadística en la similitud de las secuencias no descarta la posible homología*. Las secuencias de muchas proteínas que descienden de un antepasado común pueden haberse diferenciado en tal grado que la relación entre ellas no pueda detectarse solamente a partir de sus secuencias. Tal como veremos, esas proteínas homólogas pueden detectarse mediante el examen de sus estructuras tridimensionales.

Para descubrir secuencias homólogas se pueden utilizar los bancos de datos

Cuando se determina por primera vez la secuencia de una proteína, el compararla con todas las secuencias previamente caracterizadas puede aportar muchísima información sobre sus parentescos evolutivos y, por consiguiente, sobre su estructura y función. De hecho, una comparación exhaustiva de su secuencia con las ya conocidas es casi siempre el primer análisis a realizar sobre esta secuencia recién determinada. Por eso, los métodos de alineamiento de secuencias descritos se utilizan para comparar cada secuencia individual con todos los miembros conocidos de la base de datos.

Los buscadores de secuencias homólogas en bancos de datos muy frecuentemente operan utilizando los recursos disponibles en la página de Internet del Centro Nacional de Información en Biotecnología (www.ncbi.nih.gov). Al procedimiento utilizado se le conoce como *buscador BLAST* ("Basic Local Alignment Search Tool", *Instrumento de búsqueda de alineamientos locales básicos*). La secuencia de aminoácidos a investigar se escribe o se pega dentro del sitio web de confrontación y se ejecuta la búsqueda, casi siempre se contrastan los datos del banco no redundantes de todas las secuencias conocidas. A finales del 2004 estos datos incluían más de dos millones de secuencias. Un buscador BLAST aporta una lista de alineamientos de secuencias, cada una acompañada de una estimación de la probabilidad de que el alineamiento presentado sea debido al azar (Figura 6.13).

En 1995 los investigadores publicaron la primera secuencia completa del genoma de un organismo de vida independiente (no virus); el genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae*. De las 1743 pautas de lectura abierta que se identificaron, 1007 (el 58%) pudieron relacionarse, mediante los métodos de comparación de secuencias, con algunas proteínas de función conocida, que se habían identificado previamente en otros organismos. Otras 347 pautas de lectura abierta se pudieron relacionar con secuencias de la base de datos a las que no se había asignado aún ninguna función ("proteínas hipotéticas"). Las 389 secuencias restantes no encajaban con ninguna secuencia de la base de datos, en aquel momento. De este modo, los investigadores pudieron identificar las funciones probables de más de la mitad de las proteínas que contenía este organismo, únicamente con la utilización de métodos de comparación de secuencias.

Figura 6.12 Alineamiento de la mioglobina humana y la leghemoglobina del altramuz. El uso de la matriz de sustitución Blosum-62 aporta el alineamiento mostrado entre la mioglobina humana y la leghemoglobina del altramuz, advirtiéndose que existen identidades (en naranja) y sustituciones conservadoras (en amarillo). Las secuencias son idénticas en un 23%.

BLASTP 2.2.10 [Oct-19-2004]			
Identificador de la secuencia de búsqueda	Query- gi 12517444 gb AAG58041.1 AE005521_9 ribosephosphate isomerase, constitutive [Escherichia coli O157:H7] (219 letters)		
Identificador de la secuencia homóloga encontrada en la búsqueda	Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples 2,205,431 sequences; 747,548,157 total letters		
Distribution of 268 Blast Hits on the Query Sequence			
Nombre [especie] de la proteína homóloga	Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 42943 emb CRA47309.1 unnamed protein product [E. coli]	427	e-118	
gi 12517444 gb AAG58041.1 ribosephosphate isomerase, const...	427	e-118	
gi 33126317 gb AAK95569.1 ribose 5-phosphate isomerase [H. sapiens]	117	2e-25	
gi 29897136 gb AAP10413.1 Phosphoglycerate mutase [B. cereus]	37	0.35	
gi 33126317 gb AAK95569.1 ribose 5-phosphate isomerase [Homo sapiens]	Length = 237		
Score = 117 bits (294), Expect = 2e-25 Identities = 82/224 (36%), Positives = 118/224 (52%), Gaps = 15/224 (6%)			
Query: 4	DEKKAVGWAALQ-YVQPSTIVGVUTGSTAAHPIDALGTMKQIE---GAVSSSDASTEK 59		
+E KK G AA++ +V+ ++G+G+GST H + + Q + +S ++			
Sbjct: 5	EEAKKLLAGRAAVENHVRNNQVLGIGSGSTIVHAVQRIAERVVKQENLNLCIPTSPQRQL 64		
Query: 60	LKSLGINHVFDLNEVDSLGIYVVDGADEINGHMQMIEGGGAALTREKIIASVAKFICIADA 119		
+ + G+ + DL+ + + +DGAE++ + + +EGGG LT+EKI+A A +FI IAD			
Sbjct: 65	ILQYGLTLSLDLRHPEIDLADGADEVADLNLIEKGOGGCLTQEKKIVAGYASRFIVIADF 124		
Query: 120	SKQVDILG---KFPLPVEVIPMARSARQL-VKLGGRPEYRQG-----VVTONGNVIL 169		
K LG +P-EVIPMA V+R + K GG E R VVTONGN IL			
Sbjct: 125	RKDSEKNLGDQWHEGIPIEVIPMAYVPVSRAVSQKPGGVVELRMAVNKAGPVVTONGNPF 184		
Query: 170	DWHGMEILDPIAMENAINAIPGVVTVGFLPANRGADVALIDGTPDG 213		
+ D + + AI IPGVV GLF N A+ G DG			
Sbjct: 185	DWKFDVRVHKMSEVNNTAIKMIIPGVVDTGLFINN-AERVYPGMQDG 227		

Figura 6.13 Resultados del buscador BLAST. Parte de los resultados de una búsqueda BLAST de las secuencias de proteínas no redundantes (nr) mediante el uso de la secuencia de la ribosa 5-fosfato isomerasa de *E. coli* como problema (también llamada fosfopentosa isomerasa, p. 572 y p. 581). Entre las 268 secuencias encontradas está la secuencia ortóloga de los seres humanos y se muestra el alineamiento entre estas secuencias (en amarillo). El número de secuencias con este nivel de similitud se espera en el banco de datos que sea por azar el 2×10^{-25} , como se ve por el valor E (sombreado en rojo). Debido a que este valor es mucho menor que uno, el alineamiento de secuencias observado resulta altamente significativo.

6.3 El estudio de las estructuras tridimensionales potencia nuestro conocimiento de los parentescos evolutivos

La comparación de las secuencias es un instrumento potente para ampliar nuestro conocimiento sobre las funciones y parentescos entre las proteínas. No obstante, las biomoléculas actúan generalmente como complejas estructuras tridimensionales en vez de hacerlo como polímeros lineales. Las mutaciones tienen lugar a nivel de la secuencia, pero las mutaciones afectan a la función y ésta depende directamente de la estructura terciaria. En consecuencia, para profundizar mejor en las relaciones evolutivas entre las proteínas, debemos examinar sus estructuras tridimensionales, especialmente en conjunción con la información acerca de sus secuencias. Las técnicas de determinación de estructuras se han estudiado en el Capítulo 3.

La estructura terciaria se conserva más que la primaria

Debido a que la estructura tridimensional está asociada mucho más estrechamente a la función de las proteínas, resulta que la estructura terciaria se conserva evolutivamente con más fidelidad que la primaria. Esta conservación resulta evidente en las estructuras terciarias de las globinas (Figura 6.14), que son muy semejantes, aunque la similitud entre la mioglobina humana y la leghemoglobina del altramuz sea tan escasamente detectable a nivel de sus secuencias y entre la hemoglobina humana (cadena α) y aquella leghemoglobina no resulte significativa (15,6% de identidades). Esta similitud estructural establece con firmeza que el armazón que enlaza el grupo hemo y facilita la unión reversible del oxígeno se ha conservado durante un periodo evolutivo muy prolongado.

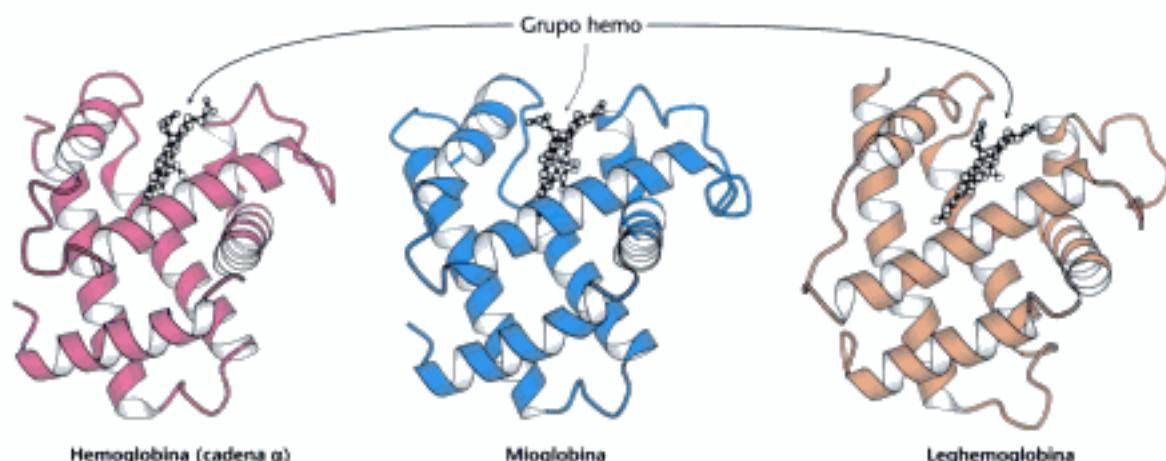


Figura 6.14 Conservación de la estructura tridimensional. Las estructuras terciarias de la hemoglobina humana (cadena α), la mioglobina humana y la leghemoglobina del altramuz se han conservado. Cada grupo hemo contiene un átomo de hierro al cual se une el oxígeno. [Tomado de 1HBB.pdb, 1MBD.pdb y 1GDJ.pdb.]

Cualquiera que advierta la semejanza de las funciones bioquímicas de la hemoglobina, mioglobina y leghemoglobina puede esperar encontrar similitudes estructurales. Sin embargo, en un número creciente de otros casos, la comparación de las estructuras tridimensionales ha desvelado llamativas similitudes entre proteínas de las cuales no se sospechaba que pudiesen estar emparentadas. Un caso típico sería la proteína actina, un componente principal del citoesqueleto (Sección 34.2) y la proteína del choque térmico 70 (Hsp-70), que coadyuva al plegado de las proteínas dentro de las células. Se encontró que estas dos proteínas eran notablemente similares

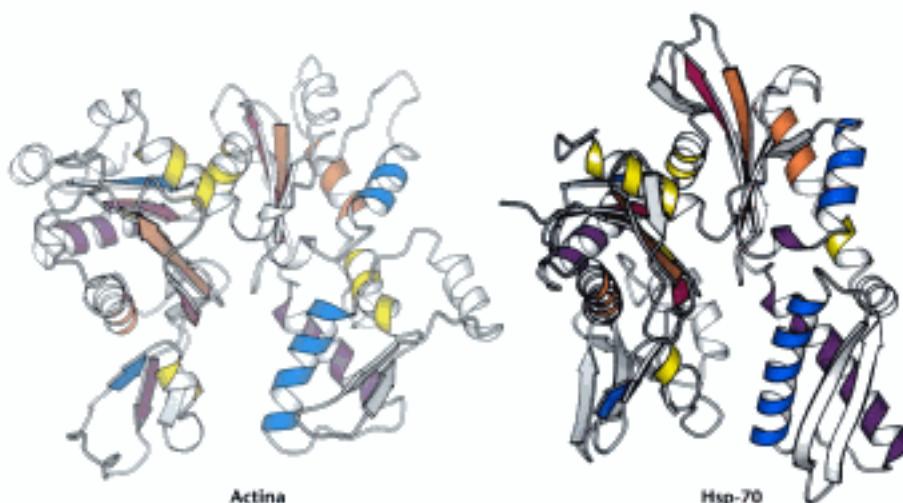


Figura 6.15 Estructuras de la actina y del fragmento mayor de la proteína 70 de choque térmico (Hsp-70). La comparación de los fragmentos coloreados de igual manera en las estructuras secundarias de ambas proteínas revela la completa similitud global en la estructura a pesar de la diferencia en sus actividades bioquímicas. [Tomado de 1ATN.pdb, y 1ATR.pdb.]

en su estructura, a pesar de que sólo son idénticas en un 15,6% de sus secuencias (Figura 6.15). Sobre la base de sus estructuras tridimensionales, la actina y la Hsp-70 son parálogos. Es decir, que los niveles de semejanza estructural sugieren firmemente que, a pesar de sus diferentes funciones fisiológicas en los organismos modernos, ambas proteínas descenden de un antepasado común. A medida que se determinan las estructuras tridimensionales de más proteínas, estos parentescos insospechados se van descubriendo con mayor frecuencia. La investigación de tales parentescos se realiza a menudo mediante los procedimientos basados en búsquedas asistidas por ordenador, que permiten comparar la estructura tridimensional de cualquier proteína con todas las demás estructuras ya conocidas.

El conocimiento de las estructuras tridimensionales puede ayudar a la evaluación de los alineamientos de secuencias

Los métodos de comparación de secuencias descritos hasta ahora tratan del mismo modo todas las posiciones dentro de la secuencia. Sin embargo, el examen de familias de proteínas homólogas para las que al menos se conoce una estructura tridimensional ha revelado que las regiones y residuos críticos para la función de la proteína se conservan con mayor fuerza que los otros residuos. Así, por ejemplo, todos los tipos de globina están unidos a un grupo hemo que contiene un átomo de hierro central. Un residuo de histidina que interacciona directamente con ese hierro (el residuo 64 en la mioglobina humana) se conserva en todas las globinas. Después de haber identificado los residuos clave en secuencias altamente conservadas dentro de una familia de proteínas, podemos, a veces, identificar a otros miembros de la familia aunque el nivel de similitud de las secuencias esté por debajo de la significación estadística. Por consiguiente, la generación de *moldes de secuencias*, es decir, residuos conservados que son estructural y funcionalmente importantes y resultan característicos de una determinada familia de proteínas, puede resultar útil para reconocer a nuevos miembros de la familia que no pudieron ser detectados con otros métodos. Se están desarrollando una serie de otros métodos para la clasificación de secuencias que se apoyan en las estructuras tridimensionales conocidas. Todavía existen métodos para identificar residuos relativamente conservados dentro de una familia de proteínas homólogas, aún sin conocer su estructura tridimensional. Tales métodos utilizan a menudo matrices de sustitución que difieren en cada posición dentro de una familia de secuencias alineadas. Estos métodos resultan ser efectivos para identificar relaciones evolutivas muy distantes.

Al alinear las secuencias consigo mismas se pueden detectar motivos repetidos

Más del 10% de todas las proteínas contienen series de dos o más dominios que son semejantes uno con otro. Los métodos de investigación de secuencias descritos con anterioridad pueden a menudo detectar secuencias repetidas internamente que ya han sido caracterizadas en otras proteínas. Donde las unidades repetidas no se corresponden con dominios identificados previamente, su presencia puede detectarse tratando de alinear una secuencia dada consigo misma. La significación estadística de tales repeticiones puede demostrarse alineando las regiones en cuestión como si estas regiones fuesen secuencias de proteínas separadas. Para la proteína que enlaza con la caja TATA, una proteína clave en el control de la transmisión génica (Sección 29.2), este alineamiento resulta muy significativo: el 30% de los aminoácidos, de los 90 residuos que posee, resultan ser idénticos (Figura 6.16A). La probabilidad estimada de que tal alineamiento fuese fruto del azar es de 1 entre 10^{13} . La determinación de la estructura tridimensional de la proteína que se une a la caja TATA confirmó la presencia de estructuras repetidas; la proteína está formada por dos dominios casi idénticos (Figura 6.16B). La evidencia resulta convincente: el gen que codifica esta proteína evolucionó mediante duplicación de un gen que codificaba un único dominio.

1 MTDQGLEGSNIPVDSLKHPS
 20 GIVPTLONIVSTVNLDCKLDIKAIALQ-ARNAEYNPKRFAAVIMPIIR
 110 FKDFKIONIVGSCDVKFPIRLEGAYSHAFFSMEPELEPGLIYRMK
 66 EPKTTALIFASGKIVCTGAKSEDFSKMAMARKYARIVQKLGFPAK
 157 VPKIVLLIFVSGKIMITGAKMRDETYKAFENIYPVLSEFRKIQQ

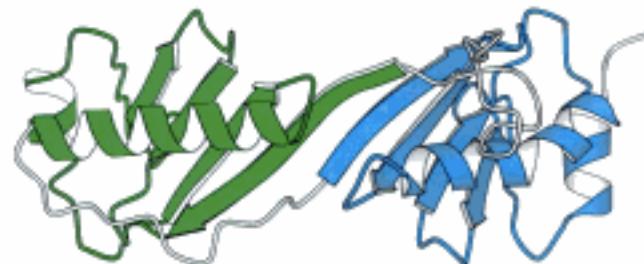


Figura 6.16 Alineamiento de secuencias de las regiones internas. (A) Alineamiento de las secuencias de dos repeticiones de la proteína que se une a la caja TATA. La repetición amino terminal se muestra en verde y la carboxilo terminal, en azul. (B) Estructura de la proteína que se une a la caja TATA. El dominio amino terminal se muestra en verde y el carboxilo terminal, en azul. [Tomado de 1VOK.pdb.]

La evolución convergente ilustra soluciones semejantes para los desafíos bioquímicos

Hasta ahora hemos estudiado proteínas derivadas de antepasados comunes, es decir, que se han diferenciado mediante *evolución divergente*. En otros casos, se han encontrado ejemplos clave de proteínas, estructuralmente semejantes en puntos cruciales, pero que no descienden de un antepasado común. ¿Cómo dos proteínas no emparentadas han podido llegar a parecerse estructuralmente? Dos proteínas que evolucionaron con independencia pueden haber convergido hacia una estructura semejante cuando deben realizar una actividad bioquímica similar. Quizás aquella estructura suponía una solución especialmente eficaz para un problema bioquímico al que se enfrentaba el organismo. El proceso por el cual unas vías evolutivas muy diferentes llegan a la misma solución se denomina *evolución convergente*.

Un ejemplo de evolución convergente se encuentra entre las proteasas de serina. Estos enzimas, que se estudiarán con más detalle en el capítulo 9, escinden los enlaces peptídicos mediante hidrólisis. La Figura 6.17 muestra la estructura de dos centros activos de dos de estos enzimas, es decir, los sitios donde tiene lugar la reacción hidrolítica. Estas estructuras activas son llamativamente similares. En ambos casos están colocados en el espacio, en ordenamientos casi idénticos, una serina, una histidina y un ácido aspártico. Tal como veremos, se da el caso de que la quimotripsina y la subtilisina aplican la misma solución mechanicista al problema de hidrolizar los péptidos. Como primera hipótesis, esta semejanza sugiere que estas proteínas pueden ser homólogas. No obstante, las llamativas diferencias en las estructuras globales de estas proteínas hacen que un parentesco evolutivo resulte extremadamente improbable (Figura 6.18). En efecto, mientras que la quimotripsina está constituida casi por completo por láminas beta, la subtilisina contiene muchas estructuras α -helicoidales. Además, los residuos clave de serina, histidina y ácido aspártico no ocupan posiciones similares ni aparecen en el mismo orden en las dos secuencias. Resulta totalmente improbable que dos proteínas que hubieran evolucionado de un antepasado común pudieran haber retenido las estructuras de sus centros activos tan semejantes mientras que otros aspectos de su estructura hubieran cambiado de forma tan espectacular.

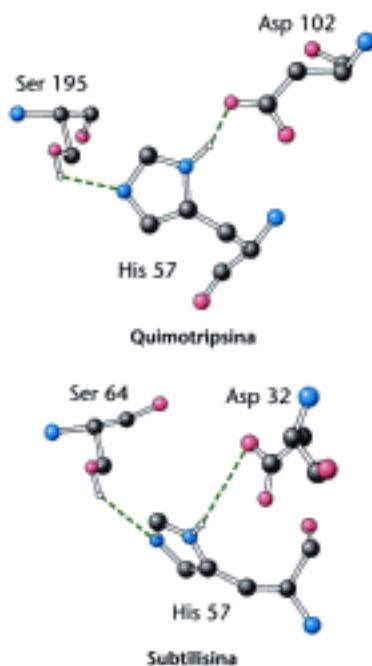
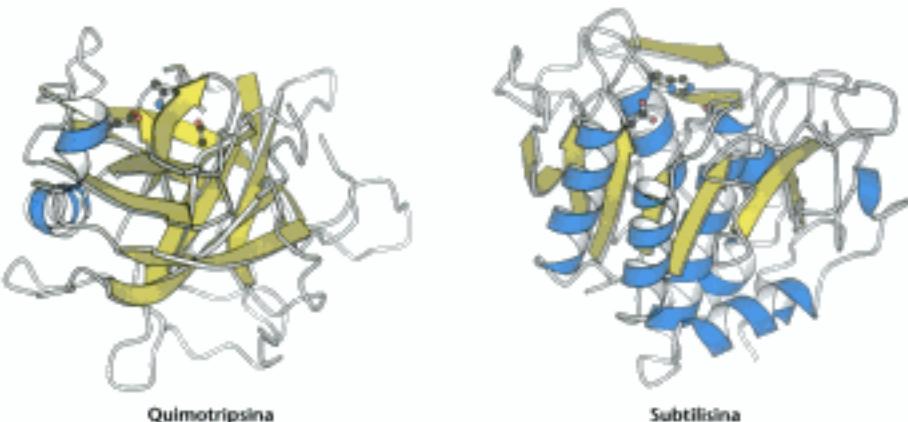


Figura 6.17 Evolución convergente de los centros activos de las proteasas. Las posiciones relativas de los tres residuos clave que se muestran resultan casi idénticas en las serinoproteasas quimotripsina y subtilisina.

 **Figura 6.18 Estructuras de la quimotripsina y de la subtilisina.** Las estructuras globales son completamente diferentes, en gran contraste con los centros activos, que se muestran en lo alto de cada estructura. Las hebras β se representan en amarillo y las hélices α en azul. [Tomado de 1GCT.pdb y 1SUP.pdb.]

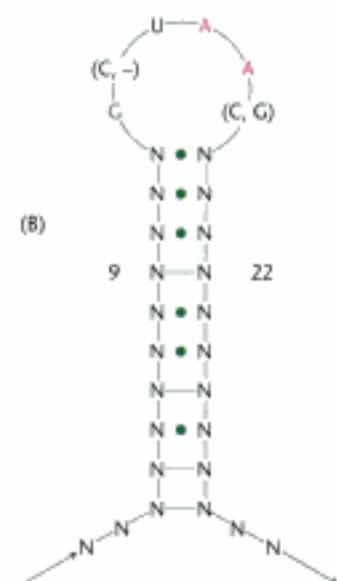


La comparación de las secuencias del RNA puede arrojar nueva luz para penetrar en las estructuras secundarias

La comparación de secuencias homólogas de RNA puede aportar información sobre los parentescos evolutivos de un modo similar al ya descrito. Tales comparaciones aportan información sobre las relaciones evolutivas. Además, estas comparaciones aportan claves sobre la estructura tridimensional del propio RNA. Tal como se anotó en el Capítulo 5, las moléculas de ácidos nucleicos de una sola hebra se enrollan sobre sí mismas para formar estructuras elaboradas estabilizadas por emparejamiento de bases de Watson y Crick y otras interacciones. En una familia de secuencias que forman tales estructuras de bases emparejadas, las secuencias podrán variar pero la capacidad de emparejar las bases se conserva. Consideremos, por ejemplo, una región procedente de una gran molécula de RNA presente en los ribosomas de todos los organismos (Figura 6.19). En la región que se muestra, la secuencia de *E. coli* tiene una guanina (G) en la posición 9 y una citosina (C) en la posición 22, mientras que la secuencia humana tiene uracilo (U) en la posición 9 y adenina (A) en la 22. El examen de las seis secuencias mostradas en la figura 6.19 (y en muchas otras) revela que las bases ubicadas en las posiciones 9 y 22 mantienen la capacidad de formar parejas de Watson y Crick aunque se modifique la identidad de dichas bases. La capacidad de las bases para emparejarse también se conserva en las proximidades de estas posiciones; por ello podemos deducir que dos segmentos con tales mutaciones compensatorias son proclives a formar una doble hélice. Cuando se conocen las secuencias

Figura 6.19 Comparación de secuencias de RNA. (A) Comparación de las secuencias de una parte del RNA ribosomal procedente de diversas especies. (B) Estructura secundaria correspondiente. Los trazos indican las posiciones en las que el emparejamiento de bases de Watson y Crick se ha conservado por completo en todas las secuencias mostradas, mientras que los puntos indican las posiciones en las que tales parejas de bases se han conservado en la mayoría de los casos.

	(A)	
BACTERIA	<i>Escherichia coli</i>	C A C A C G G G G G G U G C U A A C G U C C G U C G U G A A
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A C C A C G G G G G G U G C U A A C G U C C G U C G U G A A
ARCHAEA	<i>Halobacterium halobium</i>	C C G G U G U G U G G G G - U A A G C C U G U G G C A C C G U
	<i>Methanococcus vannielii</i>	G A G G G C A U A C G G G - U A A G C U G U A U G U C C G A
EUKARYA	<i>Homo sapiens</i>	G G G C C A C U U U U U G G - U A A G C A G A A C U G G C G C
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G G G C C A U U U U U G G - U A A G C A G A A C U G G C G A



de varias moléculas de RNA homólogas, este tipo de análisis de las secuencias sugiere, con frecuencia, las estructuras secundarias complejas, así como algunas interacciones adicionales. En el caso de este RNA ribosómico, la determinación subsiguiente de su estructura tridimensional (Sección 30.3) confirmó la estructura secundaria prevista.

6.4 Sobre la base de la información de las secuencias se pueden construir los árboles evolutivos

La observación de que la homología se manifiesta a menudo a través de la similitud en la secuencia sugiere que se pueden deducir las vías evolutivas que relacionan los miembros de una familia mediante el examen de esas similitudes de secuencias. Este abordaje se basa en la noción de que las secuencias más semejantes entre sí han tenido menos tiempo de evolución para separarse que las que presentan mayores divergencias. Este método se puede ilustrar utilizando las secuencias de las globinas de las figuras 6.10 y 6.12, junto con la secuencia de la cadena β de la hemoglobina humana. Estas secuencias se pueden alinear con la limitación adicional de situar las brechas o vacíos, si los hubiere, en las mismas posiciones en todas las proteínas. Estas secuencias alineadas se pueden utilizar para construir un árbol evolutivo en el cual la longitud de las ramas que conectan cada par de proteínas sea proporcional al número de diferencias de aminoácidos entre las secuencias de ambas (Figura 6.20).

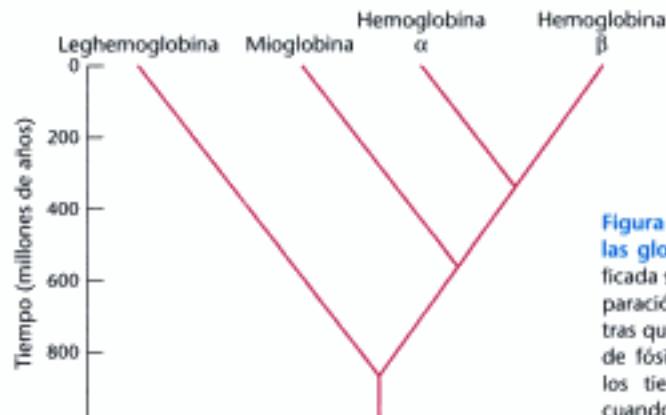


Figura 6.20 Árbol evolutivo de las globinas. La estructura ramificada se dedujo mediante la comparación de las secuencias, mientras que los resultados del estudio de fósiles aportaron la escala de los tiempos totales, mostrando cuando tuvo lugar la divergencia.

Tales comparaciones revelan solamente los tiempos relativos de divergencia: así, por ejemplo, la mioglobina divergió de la hemoglobina hace un tiempo doblemente largo del que hace que la cadena α y β de la hemoglobina divergieron. ¿Cómo se podrían valorar las fechas aproximadas de las duplicaciones de genes y otros sucesos evolutivos? Los árboles evolutivos se pueden calibrar por comparación de los puntos de ramificación deducidos de las secuencias con los tiempos de divergencia determinados mediante el registro fósil. Así, por ejemplo, la duplicación que condujo a las dos cadenas de la hemoglobina parece haber ocurrido hace 350 millones de años. Esta valoración se apoya en la observación de que los peces sin mandíbulas (agnatos) como la lamprea, que divergieron de los peces óseos hace aproximadamente 400 millones de años, contienen una hemoglobina construida con una sola clase de subunidad (Figura 6.21).

Estos métodos pueden aplicarse tanto a moléculas relativamente modernas como a otras muy antiguas, tales como los RNAs ribosómicos que se encuentran en todos los seres vivos. De hecho, han sido los análisis de secuencias de RNA lo que ha llevado a la sugerencia de que las árqueas son un grupo de organismos diferente de las bacterias de las que divergieron en los primeros tiempos de la historia evolutiva.



Figura 6.21 La lamprea. Un pez sin mandíbulas cuyos antepasados divergieron de los peces óseos hace aproximadamente 400 millones de años. La lamprea contiene moléculas de hemoglobina constituidas por un solo tipo de cadenas polipeptídicas. [Brent P. Kent.]

6.5 Técnicas modernas hacen posible el estudio experimental de la evolución

Dos técnicas bioquímicas han hecho posible examinar el curso de la evolución más directamente y no sólo por inducciones simples. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. 140) permite el examen directo de secuencias antiguas de DNA, liberándonos, al menos en ciertos casos, de sólo poder examinar genomas de organismos vivos actuales. La evolución de las moléculas puede investigarse mediante el uso de la *química combinatoria*, el proceso de producir grandes poblaciones de moléculas en bloque y seleccionarlas según una propiedad bioquímica. Este emocionante proceso permite vislumbrar los tipos de moléculas que pudieran haber existido en los primeros tiempos de la evolución.

A veces pueden amplificarse y secuenciarse moléculas muy antiguas de DNA

La enorme estabilidad química del DNA lo convierte en una molécula muy adecuada para su papel de almacén de la información genética. Tan estable resulta esta molécula, que algunas muestras de DNA han sobrevivido durante muchos miles de años cuando estuvieron en condiciones adecuadas. Con el desarrollo de los métodos de PCR, esas antiguas moléculas de DNA pueden a veces ser amplificadas y secuenciadas. Este abordaje se ha aplicado al DNA mitocondrial del fósil de un Neanderthal, de antigüedad calculada entre 30 000 y 100 000 años, encontrado en 1856, en Dusseldorf, Alemania. Los investigadores consiguieron identificar un total de 379 bases de secuencia. La comparación con un cierto número de secuencias del *Homo sapiens* evidenció entre 22 y 36 sustituciones, número considerablemente menor que la media de 55 diferencias existentes entre el hombre moderno y el chimpancé, entre las bases de la región estudiada. Análisis posteriores sugirieron que el antepasado común del hombre moderno y el Neanderthal vivió aproximadamente hace unos 600 mil años. El árbol evolutivo construido con estos y otros datos reveló que el Neanderthal no fue un intermediario entre el chimpancé y el hombre moderno, sino que estaba en una "vía muerta" evolutiva que se extinguío (Figura 6.22).

Nótese que los primeros estudios que describen la secuenciación de DNAs mucho más antiguos, tales como los encontrados en insectos atrapados en ámbar parece que fueron defectuosos; el responsable de las secuencias halladas fue un DNA moderno contaminante. Para secuenciar con garantía el DNA antiguo se requiere suficiente cantidad de DNA para una ampliación fiable y la exclusión rigurosa de todas la fuentes de contaminación.

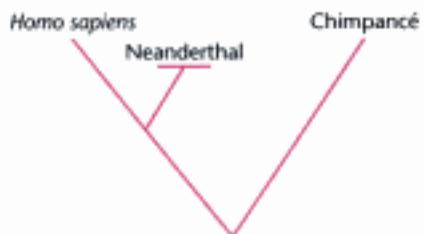
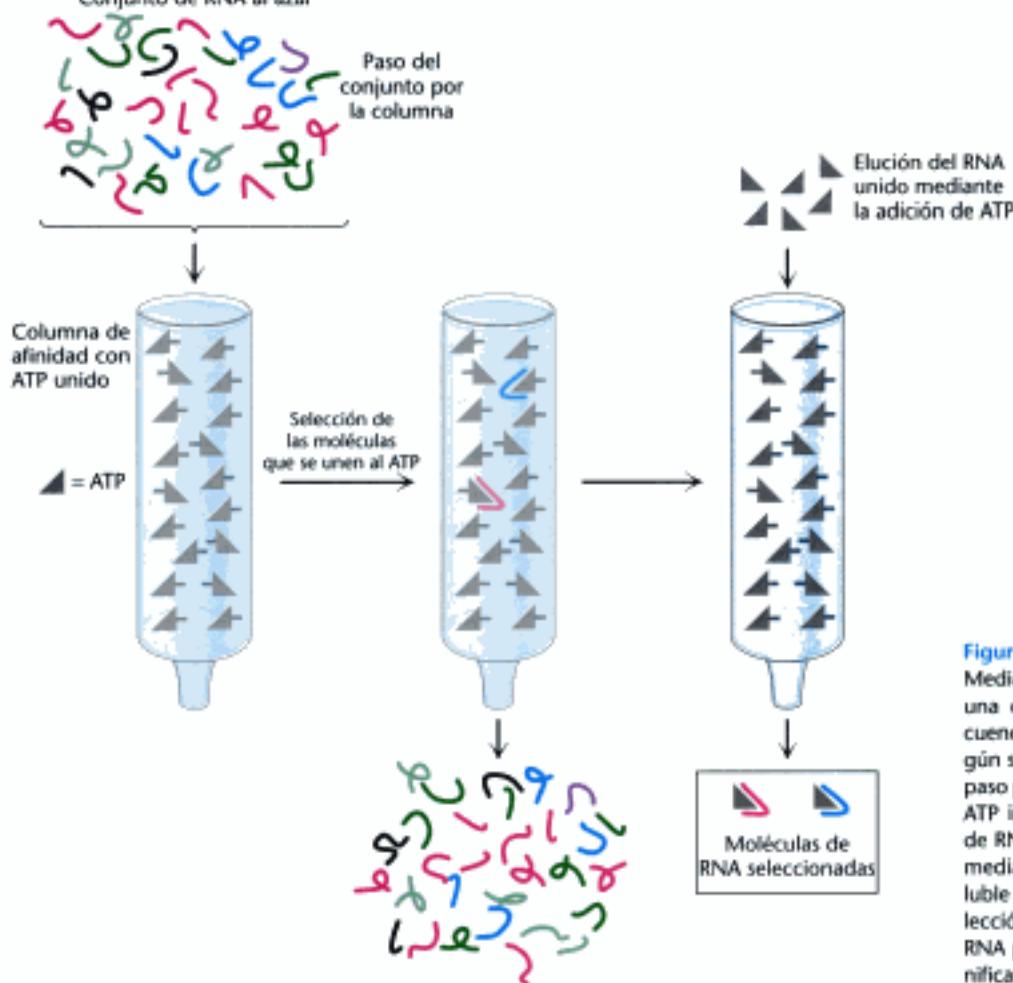


Figura 6.22 Situación del Neanderthal en un árbol evolutivo. La comparación de las secuencias de DNA reveló que el Neanderthal no está en la línea evolutiva que conduce al *Homo sapiens*, sino más bien en una ramificación lateral que después se extinguío.

La evolución molecular puede estudiarse de forma experimental

La evolución requiere tres procesos: (1) la generación de una población diversificada, (2) la selección de miembros basada en algún criterio de adaptación y (3) reproducción para enriquecer la población en mayor número de miembros adaptados. Las moléculas de los ácidos nucleicos *in vitro* son capaces de experimentar los tres procesos en condiciones adecuadas. Los resultados de tales estudios nos capacitan para vislumbrar cómo los procesos evolutivos pudieron haber generado las actividades catalíticas y las capacidades específicas de unión; funciones biológicamente importantes.

En el laboratorio se puede sintetizar una población diversificada de moléculas de ácidos nucleicos mediante el proceso de química combinatoria, el cual produce grandes poblaciones de un tipo de molécula particular, por ejemplo, un ácido nucleico. Se puede generar al azar una población de moléculas de un tamaño determinado, de modo que en la mezcla aparezcan muchas o todas las secuencias posibles. Cuando se ha generado una población inicial, se somete a un proceso de selección y se aislan moléculas específicas con las propiedades de unión o de reactividad que se deseen. Por último, las moléculas que han sobrevivido al proceso de selección se re-

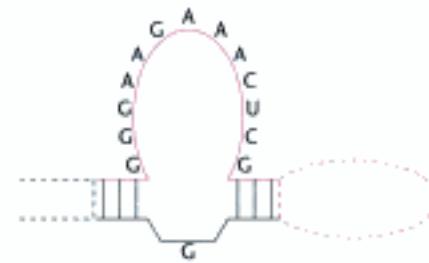
**Figura 6.23 La evolución en el laboratorio.**

Mediante la química combinatoria se sintetiza una colección de moléculas de RNA con secuencias al azar. Este conjunto se selecciona según su capacidad de unirse al ATP, mediante su paso por una columna de afinidad que contiene ATP inmovilizado (Sección 3.1). Las moléculas de RNA unidas al ATP se liberan de la columna mediante un lavado con un exceso de ATP soluble y después se replican. El proceso de selección y replicación se repite varias veces. El RNA producido al final, con una capacidad significativa de unirse al ATP se aísla y caracteriza.

plican mediante la técnica del PCR; los cebadores se dirigen hacia las secuencias específicas incluidas en los extremos de cada miembro de esa población. Los errores que se cometan naturalmente durante el proceso de replicación introducen nuevas variaciones en la población de cada "generación".

A modo de ejemplo de este abordaje, consideremos el experimento encaminado a crear una molécula de RNA capaz de unirse a adenosina trifosfato y a otros nucleótidos relacionados. Tales moléculas que se unen al ATP son interesantes porque podrían haber estado presentes en el primitivo mundo evolutivo antes de la aparición de las proteínas, cuando las moléculas de RNA realizaban las funciones principales. Se creó una población inicial de moléculas de RNA constituidas por 169 nucleótidos; 120 de sus posiciones, ordenadas al azar, contenían mezclas equimolares de adenina, citosina, guanina y uracilo. El conjunto sintético inicial que se utilizó contenía aproximadamente 10^{14} moléculas de RNA. Adviértase que este número representa una fracción muy pequeña del conjunto posible total de secuencias con 120 bases al azar. A partir de este conjunto, se seleccionaron aquellas moléculas que se unían al ATP, el cual se había inmovilizado en una columna cromatográfica (figura 6.23).

El conjunto de moléculas que se unían bien al ATP en la columna de afinidad se reprodujo por transcriptasa inversa hasta DNA, se amplificó mediante PCR y se transcribió de nuevo hasta RNA. La población nueva se sometió a rondas adicionales de selección según su capacidad de unirse al ATP. Después de ocho generaciones, los miembros de la población seleccionada se caracterizaron por secuenciación. Se obtuvieron 17 secuencias distintas, 16 de las cuales podían adoptar la estructura descrita en la Figura 6.24. Cada una de estas moléculas se unía al ATP con afinidad elevada, como se puede observar por sus constantes de disociación menores de 50 μM .

**Figura 6.24 Una estructura secundaria conservada.** La estructura secundaria aquí mostrada es común a las moléculas de RNA seleccionadas por su unión al ATP.

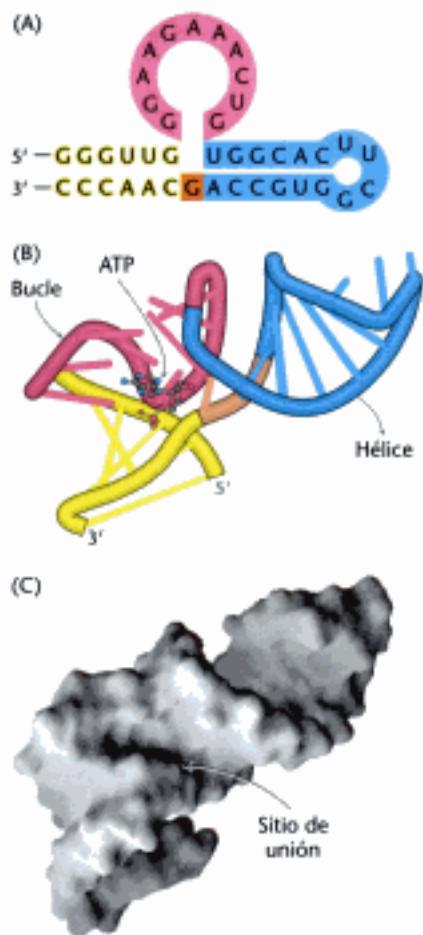


Figura 6.25 Evolución de una molécula de RNA que se une al ATP. (A) patrón de bases emparejadas según Watson y Crick, (B) patrón de plegado y (C) representación de la superficie de una molécula de RNA seleccionada por su unión a nucleótidos de adenosina. El ATP unido se muestra en la parte B y el sitio de unión se revela como una profunda oquedad en la parte C.

La estructura plegada de la región, que se unía al ATP, correspondiente a esos RNAs, se determinó mediante resonancia magnética nuclear (p. 98) (Figura 6.25). Tal como se esperaba, esta molécula de 40 nucleótidos se componía de dos regiones helicoidales, con bases emparejadas de Watson y Crick, separadas por un bucle de 11 nucleótidos. Este bucle se repliega sobre sí mismo de modo complicado para formar una oquedad profunda en la cual puede encajar el anillo de la adenina. De este modo se generó, o más bien evolucionó, una estructura que fue capaz de mostrar una interacción específica.

Resumen

6.1 Los homólogos descienden de un antepasado común

Investigar la evolución bioquímica significa a menudo investigar la homología, o parentesco, entre las moléculas, debido a que las moléculas homólogas, o simplemente homólogos, han evolucionado a partir de un antepasado común. Los parálogos son moléculas homólogas que se encuentran en una misma especie y que han adquirido funciones diferentes a lo largo del tiempo evolutivo. Los ortólogos son moléculas homólogas, halladas en especies diferentes, que desempeñan funciones idénticas o semejantes.

6.2 La homología puede detectarse mediante el análisis estadístico de secuencias alineadas

Las secuencias de las proteínas y los ácidos nucleicos son dos de los primeros lenguajes de la bioquímica. Los métodos de alineamiento de las secuencias son los instrumentos más poderosos en manos del investigador de la evolución. Las secuencias pueden alinearse para conseguir un máximo de similitudes y el significado de este alineamiento admite un tratamiento estadístico. La detección de un alineamiento estadísticamente significativo entre dos secuencias sugiere con firmeza que ambas están emparentadas por evolución divergente a partir de un antepasado común. El uso de matrices de sustitución posibilita la detección de relaciones evolutivas más distantes. Cualquier secuencia puede utilizarse como sonda en un banco de datos de secuencias para identificar las secuencias relacionadas presentes dentro del mismo organismo o en organismos diferentes.

6.3 El estudio de las estructuras tridimensionales potencia nuestro conocimiento de los parentescos evolutivos

El parentesco evolutivo entre varias proteínas puede evidenciarse con mayor profundidad viendo las estructuras tridimensionales conservadas. El análisis de la estructura tridimensional en combinación con el análisis de las secuencias especialmente conservadas ha permitido determinar relaciones evolutivas que no es posible detectar por otros medios. Los métodos de comparación de secuencias pueden también utilizarse para detectar secuencias repetidas de modo imperfecto dentro de la misma proteína, lo que indica la existencia de dominios similares enlazados, uno tras otro.

6.4 Sobre la base de la información de las secuencias se pueden construir los árboles evolutivos

La construcción de un árbol evolutivo basada en la comparación de las secuencias revela los tiempos aproximados para los sucesos de duplicación genética que iniciaron la separación de la mioglobina y la hemoglobina, así como de las subunidades α y β de la hemoglobina. Los árboles evolutivos basados en las secuencias pueden contrastarse con los derivados del registro fósil.

6.5 Técnicas modernas hacen posible el estudio experimental de la evolución

La exploración de la evolución también puede ser una ciencia de laboratorio. En los casos favorables, la amplificación mediante PCR de muestras bien conservadas permite detectar la secuencia de nucleótidos de organismos extinguidos.

dos. Las secuencias así obtenidas permiten confirmar aspectos de árboles evolutivos construidos utilizando otros medios. Los experimentos de evolución molecular realizados en el tubo de ensayo permiten deducir cómo pudieron haberse generado las moléculas de RNA que se unen a ligandos.

Términos clave

homólogo (p. 165)	sustitución conservadora (p. 168)	evolución divergente (p. 175)
parálogo (p. 165)	matriz de sustitución (p. 169)	evolución convergente (p. 175)
óriólogo (p. 165)	buscador BLAST (p. 171)	árbol evolutivo (p. 177)
alineamiento de secuencias (p. 166)	moldes de secuencias (p. 174)	química combinatoria (p. 178)

Lecturas seleccionadas

Libros

Claverie, J.-M. y Notredame, C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley.
 Pevsner, J. 2003. *Bioinformatics and Functional Genomics*. Wiley-Liss.
 Doolittle, R. F. 1987. *Of UFS and ORFS*. University Science Books.

Alineamiento de secuencias

Schaffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. y Altschul, S. F. 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 29:2994-3005.
 Henikoff, S. y Henikoff, J. G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919.
 Johnson, M. S. y Overington, J. P. 1993. A structural basis for sequence comparisons: An evaluation of scoring methodologies. *J. Mol. Biol.* 233:716-738.
 Aravind, L. y Koonin, E. V. 1999. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol.* 287:1023-1040.
 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Comparación de estructuras

Orengo, C. A., Bray, J. E., Buchan, D. W., Harrison, A., Lee, D., Pearl, F. M., Sillito, J., Todd, A. E. y Thornton, J. M. 2002. The CATH protein family database: A resource for structural and functional annotation of genomes. *Proteomics* 2:11-21.
 Bashford, D., Chothia, C. y Lesk, A. M. 1987. Determinants of a protein fold: Unique features of the globin amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 196:199-216.
 Harutyunyan, E. H., Safonova, T. N., Kuranova, I. P., Popov, A. N., Teplyakov, A. V., Ohmolova, G. V., Rusakov, A. A., Vainshtain, B. K., Dodson, G. G., Wilson, J. C., et al., 1995. The structure of deoxy- and oxy-leg-haemoglobin from lupin. *J. Mol. Biol.* 251:104-115.
 Flaherty, K. M., McKay, D. B., Kabsch, W. y Holmes, K. C. 1991. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:5041-5045.
 Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. y Chothia, C. 1995. SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247:536-540.
 Hadley, C. y Jones, D. T. 1999. A systematic comparison of protein structure classification: SCOP, CATH and FSSP. *Structure Fold. Des.* 7:1099-1112.

Detección de dominios

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N. D., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G. H., Mazumder, R., Ni-

kolskaya, A. N., Panchenko, A. R., Rao, B. S., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R. A., Yin, J. J. y Bryant, S. H. 2003. CDD: A curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* 31:383-387.

Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H. y Hol, W. G. 1978. Structure of bovine liver rhodanese E: Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *J. Mol. Biol.* 123:557-594.
 Nikolov, D. B., Hu, S. H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N. H., Roeder, R. G. y Burley, S. K. 1992. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 360:40-46.
 Doolittle, R. F. 1995. The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287-314.
 Heger, A. y Holm, L. 2000. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* 41:224-237.

Árboles evolutivos

Wolf, Y. I., Ruzin, I. B., Grishin, N. V. y Koonin, E. V. 2002. Genome trees and the tree of life. *Trends Genet.* 18:472-479.
 Doolittle, R. F. 1992. Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences. *Protein Sci.* 1:191-200.
 Zukeran, E. y Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8:357-366.

DNA antiguo

Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L. y Hofreiter, M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38:645-679.
 Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stuening, M. y Pääbo, S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans [see comments]. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 90:19-30.
 Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R. W., Krainitzki, H. y Pääbo, S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5581-5585.

Evolución en el laboratorio

Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, M. 1995. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797.
 Wilson, D. S. y Szostak, J. W. 1999. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* 68:611-647.
 Hermann, T. y Patel, D. J. 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287:820-825.

Sitios Web

El Protein Databank (PDB) es el lugar de almacenamiento para las estructuras tridimensionales de las macromoléculas. Normalmente contiene más de 30.000 estructuras. (<http://www.rcsb.org/pdb/>)
 El National Center for Biotechnology Information (NCBI) contiene los bancos de datos de biología molecular y soporte técnico para su análisis. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Problemas

1. ¿Cuál es la calificación? Utilizando el sistema de calificación basado en la identidad (Sección 6.2) calcular la calificación del siguiente alineamiento. ¿Piensa Vd. que la calificación es estadísticamente significativa?

(1) **WYLGKITRMDAEVLLKKPTVRDGHFLVTQCESSPGEF-**
 (2) **WYPGKITRRESERLLLNPENPRGTFLVRESETTKGAY-**
SISVRFGDSVQ—HFKVLRDQNGKYYLWAVK-FN-
CLSVSDFDNAKGLNVKHYKIRKLDGGFYITSRTQFS-
SLNELVAYHRTASVSRTHILLSDMNV
SSLQQLVAYYSKHADGLCHRINTV

2. *Secuencia y estructura.* La comparación de las secuencias alineadas de aminoácidos de dos proteínas, cada una de las cuales tiene 150 residuos, revela que sólo son idénticas en un 8%. Sin embargo, sus estructuras tridimensionales son muy similares. ¿Están estas dos proteínas relacionadas evolutivamente? Explicarlo.

3. *Depende de cómo se cuente.* Considerar los dos alineamientos de secuencias siguientes:

(a) **A-SNLFDIRLIG** (b) **ASNLFDIRLI-G**
GSNDFYEVKIMD **GSNDFYEVKIMD**

¿Qué alineamiento tiene mayor calificación utilizando el sistema basado en la identidad de los aminoácidos (Sección 6.2)? ¿Cuál tendría mayor calificación utilizando la matriz de sustitución Blosum-62 (Figura 6.9)?

4. *Descubrimiento de un nuevo emparejamiento de bases.* Examinar las secuencias del RNA ribosómico de la Figura 6.9. En las secuencias que no contienen parejas de bases de Watson y Crick, ¿qué base tendería a emparejarse con G? Proponer una estructura para este nuevo emparejamiento de bases.

5. *Desbordado por los números.* Supongamos que queremos sintetizar un conjunto de moléculas de RNA que contuvieran las cuatro bases en cada una de las 40 posiciones de los nucleótidos. ¿Cuánto RNA en gramos deberíamos tomar para obtener al menos una sola molécula de cada secuencia posible? El peso molecular medio de un nucleótido es de 330 g mol^{-1} .

6. *La forma sigue a la función.* La estructura tridimensional de las biomoléculas se conserva evolutivamente más que la secuencia. ¿Por qué es así?

7. *Barajando.* Por medio del sistema de calificación basado en la identidad (Sección 6.2) calcular la calificación para el alineamiento de las siguientes secuencias cortas:

(1) **ASNFLDKAGK**
 (2) **ATDYLEKAGK**

Generar una versión barajada de la secuencia 2 reordenando al azar sus 10 aminoácidos. Alinear la secuencia barajada con la secuencia 1 sin introducir huecos y calcular la calificación de alineamiento entre la secuencia 1 y la barajada.

8. *Interpretación de la calificación.* Supongamos que las secuencias de dos proteínas, cada una con 200 aminoácidos, se alinean y se calcula el porcentaje de residuos idénticos. ¿Cómo deberíamos interpretar cada uno de los resultados siguientes con respecto a una posible divergencia de las dos proteínas a partir de un antepasado común? (a) 80%, (b) 50%, (c) 20%, (d) 10%.

9. *Un conjunto de tres.* Las secuencias de tres proteínas (A, B y C) se comparan, una con otra, obteniendo los siguientes niveles de identidad:

	A	B	C
A	100%	65%	15%
B	65%	100%	55%
C	15%	55%	100%

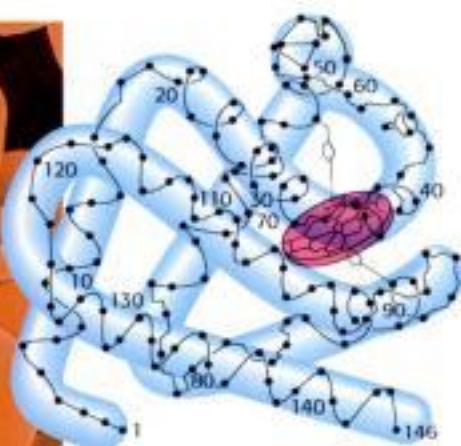
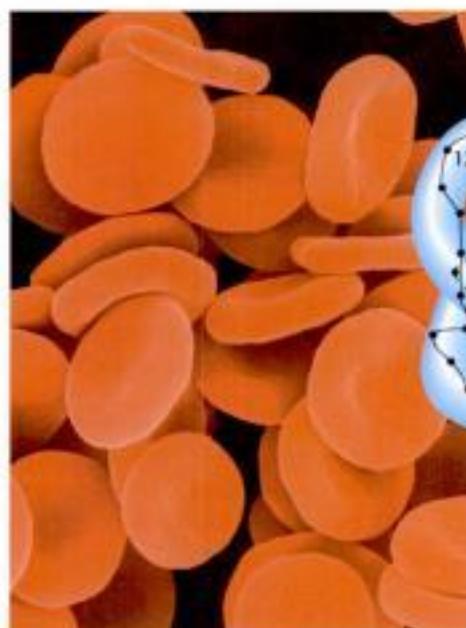
Supongamos que los emparejamientos se distribuyen con relativa uniformidad a lo largo de cada pareja de secuencias alineadas. ¿Cabría esperar que las proteínas A y C tengan estructura tridimensional semejante? Razonarlo.

10. *Alineamiento de RNA.* Se han determinado y alineado las secuencias de unos fragmentos de RNA procedentes de cinco especies diferentes. Proponer una estructura secundaria para estos fragmentos.

(1) UUGGAGAUUCGGUAGAAUCUCCC
 (2) GCGGGGAUUCGACAGAUUCCCCG
 (3) CCCAAGUCCCCGCAGGGACUUAC
 (4) CUCACCUGCCGAUAGGOCAGGUCA
 (5) AAUACCACCCGGUAGGGUGGUUC

11. *Búsqueda de lejos.* Utilizando el sitio web de Información Biotecnológica del Centro Nacional (www.ncbi.nlm.nih.gov) buscar la secuencia del enzima triosa fosfato isomerasa de *E. coli*. Utilizar esta secuencia como cuestión en la búsqueda proteína-proteína BLAST. Dentro de los resultados, comparar el alineamiento con la secuencia de la triosa fosfato isomerasa del ser humano (*Homo sapiens*). ¿Cuántas identidades se observan en el alineamiento?

La hemoglobina: instantánea de una proteína en acción



Cadena beta de la hemoglobina

En el torrente sanguíneo, los glóbulos rojos llevan oxígeno de los pulmones a los tejidos que lo necesitan. La hemoglobina, una proteína integrada por cuatro subunidades, contiene un pigmento capaz de combinarse con el oxígeno, el grupo hemo, que proporciona su color a la sangre, transporta oxígeno y lo libera donde se necesita. La hemoglobina es una de las primeras proteínas de las que se esclareció la estructura; en este boceto se muestra el plegamiento de una subunidad aislada. [A la izquierda, Dr. Dennis Kunkel/Visuals Unlimited.]

La transición de la vida anaeróbica a la aeróbica fue una etapa decisiva en la evolución porque puso de manifiesto una importante reserva energética. En presencia de oxígeno se obtiene quince veces más energía de la glucosa que en su ausencia. En los organismos unicelulares, así como en los muy pequeños, el oxígeno puede absorberse directamente hacia el interior de células metabólicamente activas desde la atmósfera o desde el agua que les rodea. Los vertebrados han desarrollado dos mecanismos principales para proporcionar un adecuado aporte de oxígeno a sus células. El primero consiste en un sistema circulatorio que distribuye el oxígeno a las células por todo el cuerpo. El segundo consiste en la utilización de proteínas capaces de transportarlo y almacenarlo, la hemoglobina y mioglobina. La hemoglobina, que se encuentra en el interior de los hematíes, es una proteína fascinante, capaz de transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos y de devolver el dióxido de carbono y los hidrogeniones a los pulmones. La mioglobina, que se localiza en el músculo, proporciona una reserva de aporte de oxígeno para cuando se necesite.

La comparación de la mioglobina con la hemoglobina aporta datos clave sobre la estructura y función de las proteínas. Estas dos proteínas relacionadas evolutivamente utilizan estructuras casi idénticas para captar oxígeno. Sin embargo, la hemoglobina es un transportador de oxígeno excepcionalmente eficaz, capaz de emplear hasta el 90% de su capacidad potencial para transportar oxígeno eficazmente. En condiciones parecidas, la mioglobina solo emplearía el 7% de su capacidad potencial. ¿A qué se debe

Contenido

- 7.1 La mioglobina y la hemoglobina unen el oxígeno a los átomos de hierro del hemo
- 7.2 La hemoglobina se une al oxígeno de forma cooperativa
- 7.3 El efecto Bohr: los hidrogeniones y el dióxido de carbono estimulan la liberación de oxígeno
- 7.4 Las mutaciones en genes que codifican las subunidades de la hemoglobina pueden producir enfermedades

esta gran diferencia? La mioglobina consta de una única cadena polipeptídica, mientras que la hemoglobina consta de cuatro. Las cuatro cadenas de la hemoglobina captan oxígeno *cooperativamente*, lo que significa que la unión de oxígeno a un centro de una de las cadenas aumenta la probabilidad de que el resto de centros también capten oxígeno. Además, las propiedades de la hemoglobina para unirse al oxígeno están moduladas por los hidrogeniones y por el dióxido de carbono, de tal manera que ambos potencian su capacidad de transportar oxígeno. Tanto la cooperatividad, como la respuesta a los moduladores, son posibles gracias a modificaciones en la estructura cuaternaria que experimenta la proteína cuando se unen diferentes combinaciones de moléculas.

La hemoglobina y la mioglobina han desempeñado importantes papeles en la historia de la bioquímica. Fueron las primeras proteínas en las que se determinó su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X. Además, se propuso inicialmente la posibilidad de que variaciones en la secuencia proteica pudieran producir enfermedades, lo que más tarde se demostró en la anemia falciforme, una enfermedad sanguínea causada por el cambio de un solo aminoácido en una cadena de la hemoglobina. Tanto por derecho propio, como por ser prototipo de otras muchas proteínas que nos encontraremos durante el estudio de la bioquímica, la hemoglobina es una fuente inagotable de conocimientos e intuición.

7.1 La mioglobina y la hemoglobina unen el oxígeno a los átomos de hierro del hemo

La mioglobina de cachalote fue la primera proteína de la que se determinó la estructura tridimensional. Los estudios cristalográficos por rayos X, de los que fue pionero John Kendrew, revelaron la estructura de esta proteína en la década de 1950 (Figura 7.1). La mioglobina consta, en su mayoría, de hélices α conectadas entre sí por giros hasta formar una estructura globular.

La mioglobina puede estar en dos formas: sin oxígeno, denominada *desoximiyoglobina*; o unida a una molécula de oxígeno, denominada *oximiyoglobina*. La capacidad de la mioglobina para unirse al oxígeno, al igual que sucede en la hemoglobina, depende de la presencia de un grupo prostético covalentemente unido denominado *hemo*.

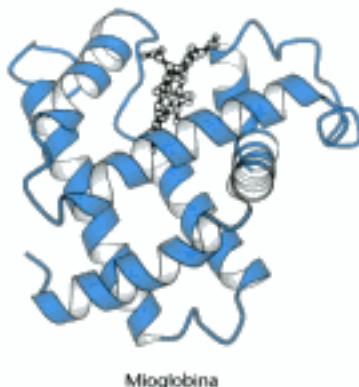
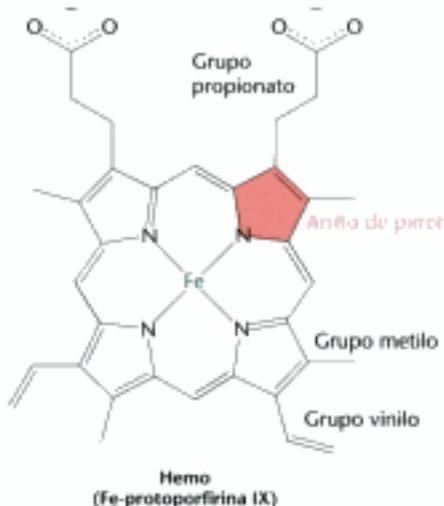


Figura 7.1 Estructura de la mioglobina. Nótese que la mioglobina consta de una única cadena polipeptídica, integrada por α -hélices conectadas por giros, con un lugar de unión al oxígeno. [Tomado de 1MD8.pdb.]



El grupo hemo proporciona su característico color rojo al músculo y a la sangre. Está integrado por un componente orgánico y un átomo de hierro en su centro. El compuesto orgánico, llamado *protoporfirina*, consta a su vez de cuatro anillos pirrolícos unidos mediante puentes meteno formando un anillo tetrapirrólico al que están enlazados cuatro grupos metilo, dos vinilo y dos propionato, como cadenas laterales.

El átomo de hierro está situado en el centro de la protoporfirina, unido a los cuatro nitrógenos de los pirroles. En condiciones normales el hierro está en estado de

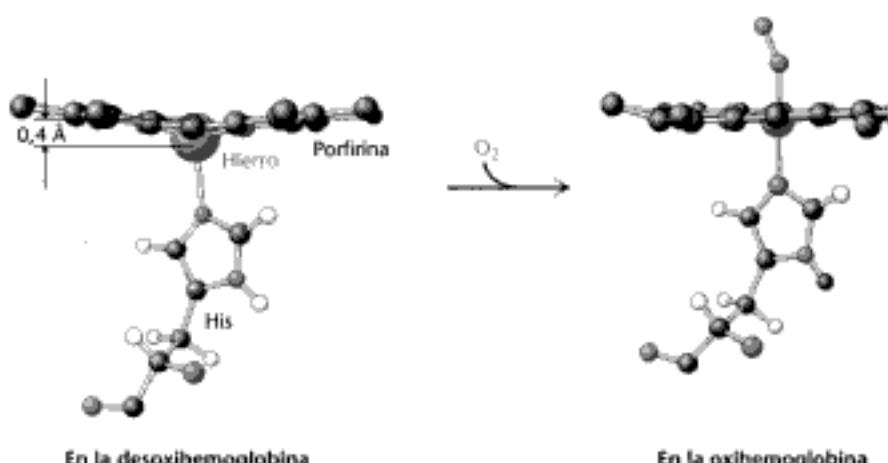


Figura 7.2 Purinas y pirimidinas. La unión del oxígeno cambia la posición del ion de hierro. Este ion está situado un poco fuera del plano de la porfirina en el hemo de la desoximieloglobina (a la izquierda), pero al oxigenarse se desplaza hasta el plano del hemo (a la derecha).

oxidación ferroso (Fe^{2+}). Este ion todavía puede formar dos enlaces adicionales, uno a cada lado del plano del hemo. Los centros de estos enlaces se llaman el quinto y sexto centros de coordinación. En la mioglobina, el quinto centro de coordinación está ocupado por el anillo imidazólico de una histidina de la proteína. A esta histidina se le designa como la *histidina proximal*. En la desoximieloglobina, el sexto centro de coordinación permanece desocupado; esta posición está disponible para unirse al oxígeno. El ion hierro está situado a unos 0.4 Å fuera del plano de la porfirina porque el ion metálico, en esta forma, resulta un poco grande para encajar en el hueco bien definido que hay dentro del anillo porfirínico (Figura 7.2, a la izquierda).

La unión de la molécula de oxígeno en el sexto centro de coordinación del ion hierro reorganiza los electrones de forma importante, de modo que el ion disminuye efectivamente su tamaño y se desplaza hasta el plano de la porfirina (Figura 7.2, a la derecha). Este cambio en la estructura electrónica está acompañado por cambios en las propiedades magnéticas de la mioglobina y hemoglobina, lo que sirve de base para la *formación de imágenes por resonancia magnética funcional* (fMRI, “*functional magnetic resonance imaging*”) que es uno de los métodos más potentes que disponemos para examinar las funciones cerebrales (Sección 32.1). Sorprendentemente, los cambios estructurales que tienen lugar cuando se une el oxígeno ya fueron anticipados por Linus Pauling, apoyándose en medidas magnéticas realizadas en 1936, casi 25 años antes que se esclarecieran las estructuras tridimensionales de la mioglobina y hemoglobina.

La estructura de la mioglobina impide la liberación de especies reactivas de oxígeno

La unión de oxígeno al hierro va acompañada por la transferencia parcial de un electrón del ion ferroso al oxígeno. Por múltiples razones, la estructura se describe mejor como un complejo entre el ion de hierro férrico (Fe^{3+}) y el *anión superóxido* (O_2^-), como se ilustra en la Figura 7.3. Es crucial que el oxígeno, cuando se libera en primer lugar, lo haga como dioxígeno y no como superóxido. En primer lugar, el propio superóxido y otras especies que pueden formarse a partir de él son especies reactivas de oxígeno (p. 517) que pueden dañar a muchas estructuras biológicas. En segundo lugar, la liberación de superóxido deja al ion de hierro en estado férrico. Esta especie, llamada *metamioglobina*, ya no se une al oxígeno. De este modo, se pierde su capacidad potencial de almacenar oxígeno. Algunas propiedades de la mioglobina estabilizan el complejo con oxígeno, de manera que disminuye la posibilidad de que se libere superóxido. En particular, cabe mencionar que el bolsillo de unión de la mioglobina

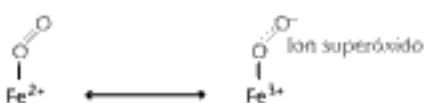


Figura 7.3 Enlace entre el hierro y el oxígeno. La interacción entre el hierro y el oxígeno en la hemoglobina puede describirse como una combinación de estructuras en resonancia, una con Fe^{2+} y dioxígeno y la otra con Fe^{3+} e ion superóxido.

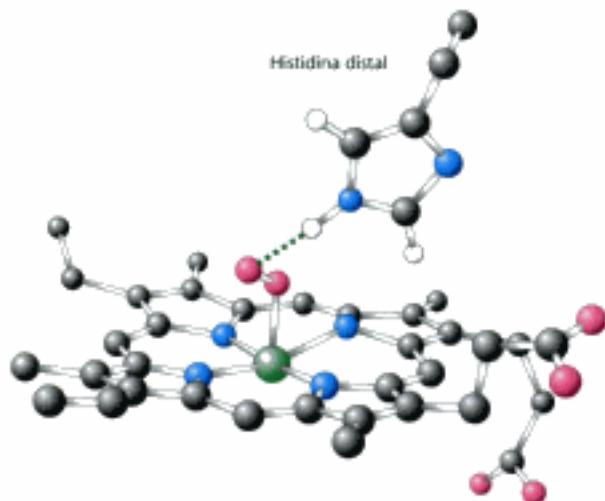


Figura 7.4 Estabilización del oxígeno enlazado. Un puente de hidrógeno (ilustrado con una línea verde de puntos), que se forma entre el residuo de histidina distal y el oxígeno enlazado, contribuye a estabilizar la oxímioglobina.

contiene un residuo de histidina adicional (designado como la *histidina distal*) que forma un puente de hidrógeno con la molécula de oxígeno enlazada (Figura 7.4). El carácter superóxido de las especies de oxígeno enlazadas refuerza esta interacción. De este modo, la componente proteica de la mioglobina controla la reactividad intrínseca del hemo, haciéndolo más adecuado para unir oxígeno de forma reversible.

La hemoglobina humana es un conjunto de cuatro subunidades parecidas a la mioglobina

La estructura tridimensional de la hemoglobina de corazón de equino fue resuelta por Max Perutz poco después de determinarse la estructura de la mioglobina. Desde entonces, se han determinado las estructuras de hemoglobinas de otras fuentes, incluida la humana. Todas las hemoglobinas constan de cuatro cadenas polipeptídicas, dos *cadenas α* y dos *cadenas β* . Cada tipo de cadena presenta una secuencia aminoacídica idéntica, pero son diferentes la de las cadenas α y β (Figura 7.5). Cada una de las subunidades comprende un conjunto de hélices α dispuestas de la misma manera a como se disponen las hélices α en la mioglobina (véase la Figura 6.13 para comparar estas estructuras). La estructura que se repite se denomina *plegamiento de globina*. Compatible con esta semejanza estructural, las secuencias aminoacídicas de las cadenas α y β de la hemoglobina humana se alinean fácilmente con la correspondiente secuencia de la mioglobina de cachalote, encontrándose un 25% y 24% de identidad, respectivamente. Además, se mantiene una buena conservación de residuos clave como son los residuos de las histidinas proximal y distal. Como se observa, las cadenas α y β están relacionadas entre sí y con la mioglobina por evolución divergente (véase la p. 175).

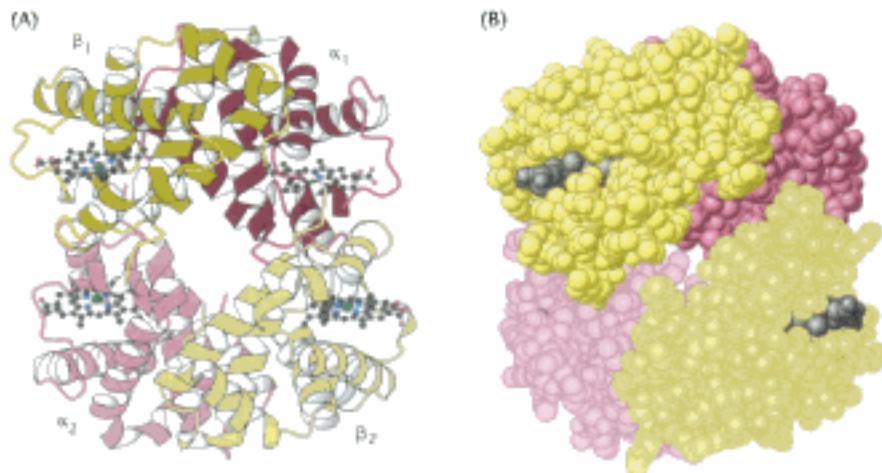


Figura 7.5 Estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. La hemoglobina, compuesta por dos cadenas α y dos β , funciona como una pareja de dímeros $\alpha\beta$. (A) Estructura tridimensional. (B) Modelo espacial. [Tomado de 1A3N.pdb.]

El tetrámero de hemoglobina, denominado *hemoglobina A* (HbA) se describe mejor como una pareja de dímeros $\alpha\beta$ idénticos ($\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$) que se asocian para formar el tetrámero. En la desoxihemoglobina estos dímeros $\alpha\beta$ están unidos por una extensa interfase que incluye, entre otras regiones, los extremos carboxílicos de ambas cadenas. Los grupos hemo quedan bien separados en el tetrámero, de modo que las distancias de hierro a hierro oscilan entre 24 y 40 Å.

7.2 La hemoglobina se une al oxígeno de forma cooperativa

Comparemos ahora las propiedades de ambas proteínas para unirse al oxígeno. Las características para enlazar oxígeno se describen en una *curva de unión al oxígeno*, que es una representación de la *fracción de saturación* frente a la concentración de oxígeno. La fracción de saturación, Y , se define como la fracción de todos los posibles centros de unión que tienen oxígeno unido. El valor de Y varía entre 0 (todos los centros están desocupados) y 1 (todos los centros están ocupados). La concentración de oxígeno se expresa más cómodamente como su presión parcial, pO_2 . Para la mioglobina se obtiene una curva compatible con un simple equilibrio químico (Figura 7.6). Nótese que la fracción de moléculas de mioglobina con oxígeno unido crece bruscamente al aumentar la pO_2 y luego se mantiene constante. La semisaturación (simbolizada como P_{50} para el 50% de saturación) se alcanza a un valor tan bajo como 2 torr (mm de Hg).

A diferencia de lo anterior, la curva de unión de oxígeno para la hemoglobina en los hematies muestra algunas características notables (Figura 7.7). No se parece a una curva de unión simple, como sucedía con la mioglobina, sino a una "S". A estas curvas se les denomina *sigmoideas* debido a su forma de S (*sigma griega*). Nótese que la unión al oxígeno es mucho más débil que en la mioglobina. La semisaturación se alcanza a un mayor valor de $P_{50} = 26$ torr. Obsérvese que esta curva de unión se ha obtenido empleando la hemoglobina en los hematies. En el interior de estas células sanguíneas, la hemoglobina interacciona con el 2,3-bisfosfoglicerato, una molécula que disminuye de forma muy acusada su afinidad por el oxígeno, tema que enseguida se abordará con detalle.

Una curva de unión sigmoidea indica que una proteína posee un comportamiento de unión especial. La forma de la curva pone de manifiesto que la unión de oxígeno a un centro de la molécula de hemoglobina aumenta la probabilidad de que más oxígeno se una a los centros que permanecen desocupados. Recíprocamente, la liberación de oxígeno de uno de los hemos facilita la desocupación de oxígeno de los demás. Este tipo de comportamiento en la unión es *cooperativo* (p. 189), porque las reacciones de unión en los centros individuales en cada molécula de hemoglobina no son independientes unas de otras. Volveremos enseguida a tratar el mecanismo de esta cooperatividad.

¿Cuál es el significado fisiológico de la unión cooperativa de oxígeno a la hemoglobina? El oxígeno debe transportarse por la sangre desde los pulmones, donde la presión parcial de oxígeno es relativamente elevada (unos 100 torr) hasta los tejidos

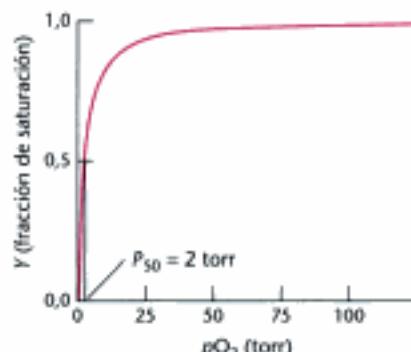


Figura 7.6 Unión de oxígeno a la mioglobina. La mitad de moléculas de mioglobina se han unido al oxígeno a una presión parcial de oxígeno de 2 torr.

Torr

Unidad de presión equivalente a la ejercida por una columna de mercurio de 1 mm de altura a 0°C y gravedad estándar (1 mm de Hg). Así llamada en honor a Evangelista Torricelli (1608-1647), inventor del barómetro de mercurio.

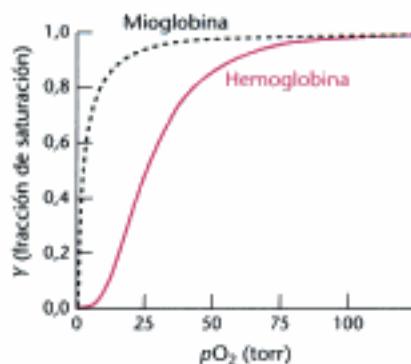


Figura 7.7 Unión de oxígeno a la hemoglobina. Esta curva, obtenida para la hemoglobina de los hematies, tiene forma parecida a una "S", lo que indica que en cada molécula de hemoglobina residen centros distintos que interactúan. Se muestra la curva de unión de la mioglobina mediante una línea negra de puntos para su comparación.

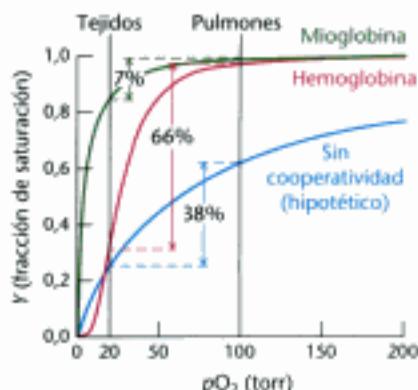


Figura 7.8 La cooperatividad potencia la liberación de oxígeno de la hemoglobina. Debido a la cooperatividad entre los centros de unión para el O_2 , la hemoglobina lleva más O_2 a los tejidos de lo que haría la mioglobina o cualquier proteína no cooperativa, incluso una que tuviera una afinidad óptima por el O_2 .

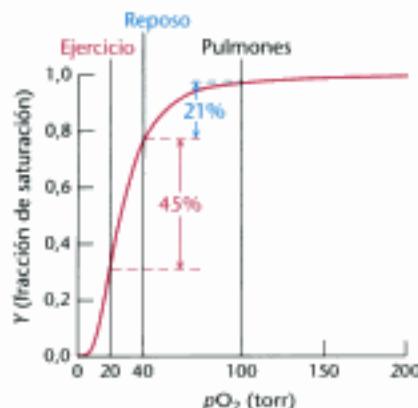


Figura 7.9 Respuesta al ejercicio. La caída en la concentración de oxígeno de 40 torr en los tejidos en reposo a los 20 torr en los tejidos en ejercicio corresponde a la parte más empinada de su curva de unión con oxígeno. En consecuencia, la hemoglobina es muy efectiva proporcionando oxígeno a los tejidos en ejercicio.

metabólicamente activos, donde la presión parcial es mucho menor (habitualmente unos 20 torr). Consideremos cómo el comportamiento cooperativo representado por la curva sigmoidal conlleva un transporte eficaz de oxígeno (Figura 7.8). En los pulmones la hemoglobina se satura casi por completo con oxígeno, siendo ocupados el 98% de los centros de unión para el oxígeno. Cuando la hemoglobina se desplaza a los tejidos y libera el O_2 , el nivel de saturación desciende hasta un 32%. Así pues, un total de $98 - 32 = 66\%$ de los centros potenciales de unión para el oxígeno contribuyen a su transporte. La liberación cooperativa de oxígeno favorece una descarga más completa de oxígeno en los tejidos. Si se empleara mioglobina para transportar oxígeno, esta proteína estaría saturada al 98% en los pulmones pero todavía permanecería un 91% saturada en los tejidos, y por tanto, sólo $98 - 91 = 7\%$ de los centros contribuirían al transporte de oxígeno; la mioglobina se une al oxígeno demasiado fuertemente para ser de utilidad en el transporte de oxígeno. Esta situación podría haber sido mejorada, sin la presencia de cooperatividad, por evolución de un transportador de oxígeno no cooperativo que presentara una afinidad optimizada por el oxígeno. Para esta hipotética proteína, la cantidad máxima de oxígeno que podría transportar desde una región con una pO_2 de 100 torr a otra de 20 torr sería $63 - 25 = 38\%$. Por consiguiente, la unión y liberación cooperativa de oxígeno en la hemoglobina le permite liberar casi 10 veces más oxígeno que la mioglobina y más de 1,7 veces de lo que liberaría una hipotética proteína no cooperativa.

Un examen más detallado de las concentraciones de oxígeno en los tejidos durante el reposo y en ejercicio revela lo efectiva que puede ser la hemoglobina como suministradora de oxígeno (Figura 7.9). En condiciones de reposo, la concentración de oxígeno en el músculo es de unos 40 torr, pero durante el ejercicio, la concentración se reduce a 20 torr. Al pasar de 100 torr en los pulmones a 40 torr en el músculo en reposo, la saturación de la hemoglobina en oxígeno desciende del 98% al 77%, esto es $98 - 77 = 21\%$ del oxígeno se libera al disminuir 60 torr la concentración de oxígeno. Al pasar de 40 torr a 20 torr, la saturación de oxígeno baja del 77% al 32%, lo que corresponde a una liberación del 45% de oxígeno al disminuir 20 torr. De este modo, debido a que el cambio en la concentración de oxígeno del estado de reposo al de ejercicio corresponde a la parte más empinada de la curva de unión de oxígeno, se libera eficazmente oxígeno a los tejidos que lo requieren. En la Sección 7.3 examinaremos otras propiedades de la hemoglobina que aumentan su capacidad de respuesta fisiológica.

La unión del oxígeno modifica ostensiblemente la estructura cuaternaria de la hemoglobina

La unión cooperativa de oxígeno por la hemoglobina requiere que la unión de oxígeno a un centro de la hemoglobina tetramérica influya en las propiedades de unión de los demás centros. Dada la gran distancia existente entre los centros de hierro no pueden darse interacciones directas entre ellos. Por esta razón, para acoplar los centros deben estar funcionando otros mecanismos indirectos. Estos mecanismos están íntimamente relacionados con la estructura cuaternaria de la hemoglobina.

Al unirse el oxígeno, la hemoglobina experimenta cambios importantes en su estructura cuaternaria: los dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ giran unos 15 grados entre sí (Figura 7.10). Los propios dímeros cambian poco, aunque se dan puntuales desplazamientos de la conformación. Así, la interfase entre los dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ es la más afectada por esta transición estructural. Estudios recientes han puesto de manifiesto que los dímeros $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_2$ gozan de mayor libertad para moverse uno respecto del otro en el estado oxigenado que en el desoxigenado.

Frecuentemente, se llama *estado T* (de tenso) a la estructura cuaternaria de la forma desoxi de la hemoglobina, ya que está muy forzada por las interacciones entre subunidades. A la estructura cuaternaria de la forma completamente oxigenada se le llama *estado R* (de relajado). Después de comprobarse que la forma R de la hemoglobina está menos constreñida que la T, los calificativos de tenso y relajado parecen ser muy adecuados. Es importante resaltar que en estado R los centros de unión para oxígeno están libres de tensión y pueden unir oxígeno con mayor afinidad que

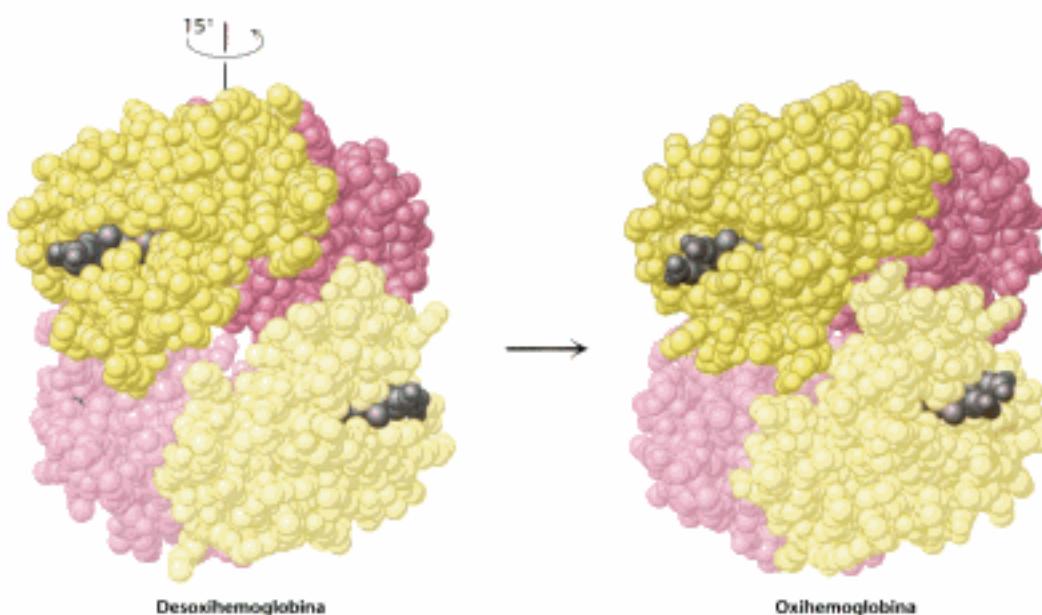


Figura 7.10 Cambios en la estructura cuaternaria de la hemoglobina al unirse oxígeno. Nótese que al oxigenarse, uno de los dímeros $\alpha\beta$ se desplaza del otro girando unos 15°. [Tomado de 1A3N.pdb y de 1LFQ.pdb.]

los centros en estado T. Al desencadenarse en el tetramero de hemoglobina el cambio conformacional del estado T al R, la unión de oxígeno a un centro incrementa la afinidad de unión de los demás centros.

La cooperatividad de la hemoglobina puede explicarse satisfactoriamente por varios modelos

Se han desarrollado dos modelos límite para explicar la unión cooperativa de ligandos a multisubunidades ensambladas como la hemoglobina. En el *modelo concertado*, conocido también como *modelo MWC* después de que lo propusieran Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean Pierre Changeux, el ensamblaje completo puede estar solamente en dos formas: los estados T y R. La unión de ligandos sólo desplaza el equilibrio existente entre esos dos estados (Figura 7.11). De este modo, conforme el tetramero de hemoglobina enlaza cada una de las moléculas de oxígeno, aumenta la probabilidad de que el tetramero permanezca en estado R. Los tetrameros de hemoglobina en forma desoxi, están casi exclusivamente en estado T. Sin embargo, la unión de oxígeno a un centro de la molécula desplaza el equilibrio entre T y R hacia el estado R. Si una molécula adopta la estructura cuaternaria R, la afinidad de sus centros por el oxígeno aumenta. Ahora, otras moléculas adicionales de oxígeno tienen mayor

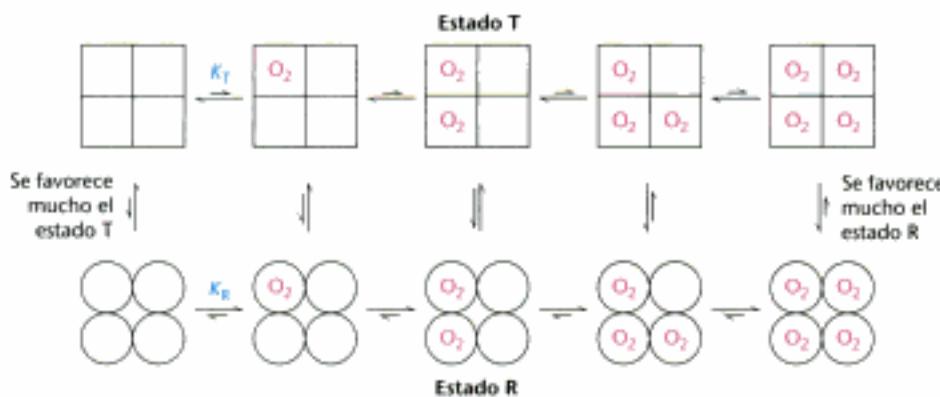


Figura 7.11 El modelo concertado. Todas las moléculas están, bien sea en el estado T o en el estado R. A cada uno de los niveles de saturación por oxígeno, se establecen equilibrios entre ambos estados T y R. El equilibrio se desplaza del estado T, muy favorecido por la ausencia de oxígeno unido, al estado R muy favorecido cuando la molécula está saturada de oxígeno. El estado R tiene mayor afinidad por el oxígeno que el T.

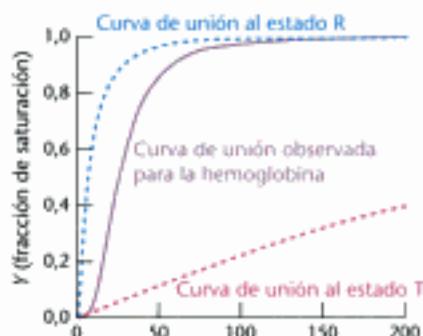


Figura 7.12 Transición del estado T al R. La curva de unión observada para la hemoglobina puede considerarse como una combinación de las curvas que se obtendrían si todas las moléculas permanecieran en estado T, o si todas las moléculas estuvieran en estado R. Se obtiene una curva sigmoidal porque conforme se une oxígeno, las moléculas pasan del estado T al R.

probabilidad de unirse a los tres centros desocupados. Así, la curva de unión es poco empinada a bajas concentraciones de oxígeno, situación en que todas las moléculas de tetrámero están en estado T, pero empieza a empinarse conforme aumenta la fracción de moléculas en estado R y se achata nuevamente cuando se ocupan todos los centros de la molécula en estado R (Figura 7.12). Estos eventos hacen que la curva de unión sigmoidal sea tan importante para el transporte eficiente de oxígeno.

En el modelo concertado, cada tetrámero puede estar en solo dos estados, el T y el R. En un modelo alternativo, el *modelo secuencial*, la unión de un ligando a un centro del ensamblaje aumenta la afinidad de unión de los centros vecinos, sin que se induzca la completa conversión del estado T en R (Figura 7.13).



Figura 7.13 El modelo secuencial. La unión de un ligando cambia la conformación de la subunidad a la que se une. Este cambio conformacional induce cambios en las subunidades vecinas que incrementan su afinidad por el ligando.

¿Qué modelo describe mejor la unión cooperativa del oxígeno a la hemoglobina, el concertado o el secuencial? Ninguno de los dos modelos, tomado en su forma pura, da cuenta exacta de la conducta de la hemoglobina. En su lugar, se requiere un modelo combinado. La conducta de la hemoglobina es concertada en las moléculas con tres centros ya ocupados por el oxígeno y cuya estructura cuaternaria está casi siempre en estado R. El restante centro de unión desocupado, presenta una afinidad por el oxígeno que es más de 20 veces superior a la que tenía la hemoglobina completamente desoxigenada para unirse a su primera molécula de oxígeno. Sin embargo, la conducta no es plenamente concertada, puesto que cuando la hemoglobina se ha unido a oxígeno en solo uno de sus cuatro centros, su estructura cuaternaria permanece mayoritariamente en estado T. Más aún, esta molécula enlaza el oxígeno con una fuerza tres veces superior a como lo hacía la totalmente desoxigenada, lo que solamente concuerda con el modelo secuencial. Estos resultados ponen de manifiesto que los modelos concertado y secuencial representan casos límites idealizados, a los que los sistemas reales pueden逼近arse pero rara vez alcanzar.

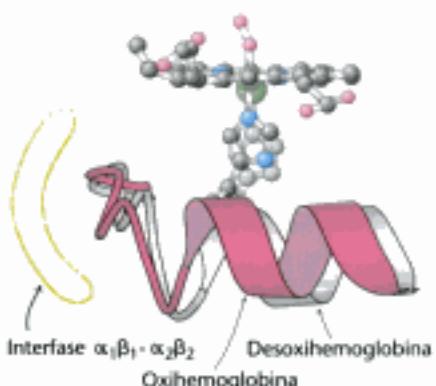


Figura 7.14 Cambios conformacionales en la hemoglobina. Al oxigenarse, el desplazamiento del ion hierro arrastra al residuo de histidina asociado a él hacia el anillo de porfirina. El concomitante desplazamiento de la hélice α , que contiene esta histidina, altera la interfase entre los dímeros $\alpha\beta$, incluyendo otros cambios estructurales. Para su comparación, la estructura de la desoxihemoglobina se representa en gris por detrás de la oxihemoglobina, en color.

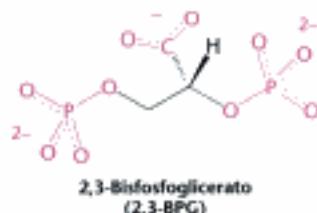
Los cambios estructurales de los grupos hemo se transmiten por la interfase $\alpha_1\beta_1-\alpha_2\beta_2$

Examinemos ahora cómo la unión de oxígeno a un centro puede desplazar el equilibrio entre los estados T y R en el tetrámero de hemoglobina. Como sucede en la mioglobina, la unión de oxígeno provoca que se mueva cada átomo de hierro de la hemoglobina desde fuera hasta dentro del plano de la porfirina. Cuando se desplaza el átomo de hierro, el residuo de histidina unido al quinto centro de coordinación se mueve con él. Este residuo de histidina forma parte de una hélice α , que también se desplaza (Figura 7.14). El extremo carboxílico terminal de esta hélice α está situado en la interfase de los dos dímeros $\alpha\beta$. El cambio de posición del extremo carboxílico terminal de la hélice favorece la transición del estado T al R. En consecuencia, la *transición estructural del ion ferroso de una subunidad se transmite directamente a las demás subunidades*. El reordenamiento de la interfase entre los dímeros suministra una forma de comunicación entre subunidades, permitiendo la unión cooperativa del oxígeno.

La presencia de 2,3-bisfosfoglicerato en los hematíes es decisiva para determinar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno

Para que la hemoglobina funcione con eficacia se requiere que se mantenga estable en el estado T hasta que se haya unido a suficiente oxígeno para convertirse al estado R.

Sin embargo, el estado T de la hemoglobina es muy inestable; si se forzara el equilibrio un poco hacia el estado R se liberaría poco oxígeno en condiciones fisiológicas. Por tanto, se requiere algún mecanismo adicional que estabilice al estado T de forma adecuada. Este mecanismo se descubrió al comparar las propiedades de unión al oxígeno de la hemoglobina dentro de los hematíes con la hemoglobina completamente purificada (Figura 7.15). La hemoglobina pura se une al oxígeno mucho más firmemente que la hemoglobina de los hematíes. Esta importante diferencia se debe a la presencia de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG; también denominado 2,3-difosfoglicerato o 2,3-DPG).



Este compuesto es muy aniónico y está presente en los hematíes aproximadamente a la misma concentración que la hemoglobina ($\sim 2 \text{ mM}$). Sin el 2,3-BPG la hemoglobina sería un transportador de oxígeno muy ineficaz, puesto que sólo liberaría en los tejidos el 8% de su carga.

¿Cómo disminuye el 2,3-BPG la afinidad de la hemoglobina por oxígeno de un modo tan significativo? El examen de la estructura cristalina de la desoxihemoglobina en presencia de 2,3-BPG revela que una sola molécula de este compuesto se sitúa en un bolsillo, que sólo existe en la forma T, situado en el centro del tetramero de hemoglobina (Figura 7.16). Cuando se produce la transición de T a R, este bolsillo se colapsa liberándose el 2,3-BPG. Así pues, para que tenga lugar la transición estructural entre T y R, primero deben romperse los enlaces entre la hemoglobina y el 2,3-BPG. En presencia de 2,3-BPG, deben ocuparse más centros de unión a oxígeno para que se induzca la transición de T a R en la hemoglobina tetramérica y, en consecuencia, la hemoglobina permanece en estado T, el de menor afinidad, hasta que se alcanzan concentraciones de oxígeno más elevadas. Como se ve, la regulación de la hemoglobina por el 2,3-BPG es digna de mención, porque el 2,3-BPG no

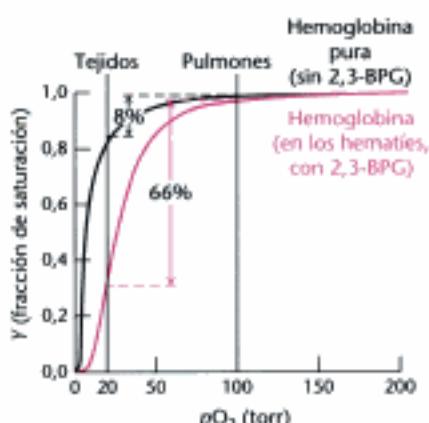


Figura 7.15 Comparación de la unión de oxígeno a la hemoglobina pura y a la hemoglobina en hematíes. La hemoglobina pura se une al oxígeno más firmemente que la hemoglobina de los hematíes. Esta diferencia se debe a la presencia de 2,3-bisfosfoglicerato en los hematíes.

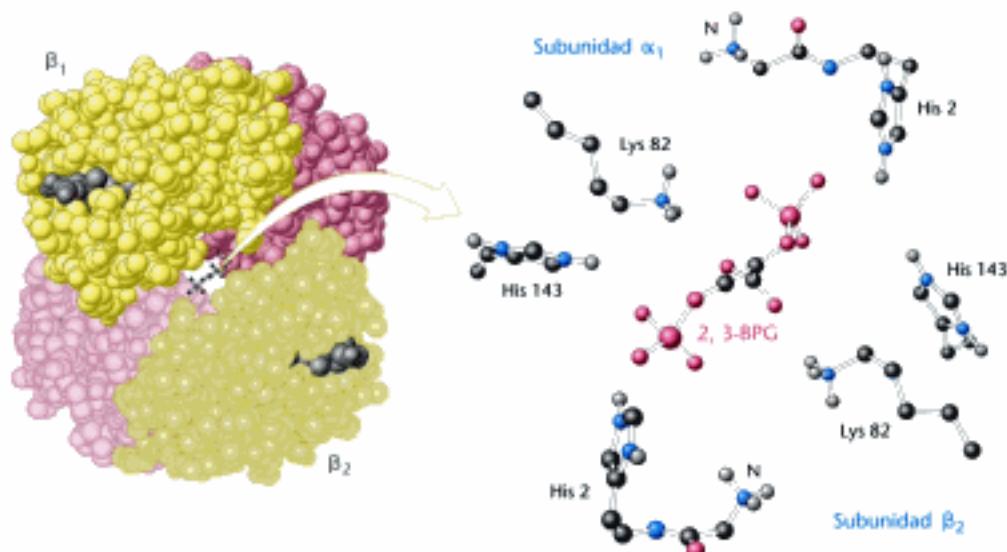


Figura 7.16 Modo de unirse del 2,3-BPG a la desoxihemoglobina humana. El 2,3-BPG se une en la cavidad central de la desoxihemoglobina (a la izquierda). Allí interacciona con tres grupos cargados positivamente de cada cadena β (a la derecha). [Tomado de 1B86.pdb.]

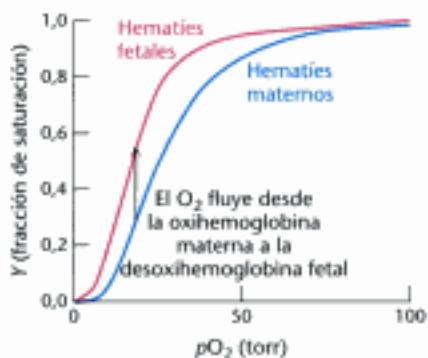


Figura 7.17 Afinidad por el oxígeno de los hematíes fetales. Los hematíes fetales tienen mayor afinidad por el oxígeno que los maternos porque la hemoglobina fetal se une al 2,3-BPG con menos afinidad que la materna.

se parece en nada al oxígeno, molécula con la que la hemoglobina realiza su función primordial. Al 2,3-BPG se le denomina *efector alostérico* (del griego *allo*, "otra", y *stereos*, "estructura"). Es posible que se produzca regulación por una molécula no relacionada con el oxígeno porque el efector alostérico se une a un centro que es completamente distinto al que se une el oxígeno. Nos volveremos a encontrar con los efectos alostéricos cuando veamos la regulación enzimática en el Capítulo 10.

Y La unión del 2,3-BPG a la hemoglobina tiene otras consecuencias fisiológicas trascendentales. El gen de la globina que se expresa en el feto humano es diferente del que se expresa en adultos; los tetrámeros de *hemoglobina fetal* contienen dos cadenas α y dos γ . Las cadenas γ , resultado de otra duplicación génica, son idénticas en un 72% de su secuencia aminoacídica con la de las cadenas β . Un cambio muy notable consiste en la sustitución de la His 143 de la cadena β por una serina, justo en el sitio en que se une el 2,3-BPG. Esta sustitución elimina dos cargas positivas del centro donde se produce esa unión (una de cada cadena) disminuyendo la afinidad de la hemoglobina fetal por el 2,3-BPG. En consecuencia, la afinidad para unirse al oxígeno de la hemoglobina fetal aumenta respecto de la materna (la de adulto) (Figura 7.17). Esta diferencia de afinidad por el oxígeno permite que éste sea transferido con eficacia desde los hematíes maternos a los fetales. Aquí vemos otra vez un ejemplo de cómo una duplicación génica seguida de especialización resuelve un desafío biológico: en este caso el transporte de oxígeno de la madre al feto.

7.3 El efecto Bohr: los hidrogeniones y el dióxido de carbono estimulan la liberación de oxígeno

Hemos visto que la liberación cooperativa de oxígeno potencia el aporte de oxígeno en los tejidos donde hace falta, como lo reflejan sus bajas presiones parciales de oxígeno. Esta capacidad se incrementa por la facultad que tiene la hemoglobina para responder dentro de su ambiente fisiológico a otras señales que indican la necesidad de oxígeno. Los tejidos con metabolismo rápido, tales como el músculo en contracción, generan grandes cantidades de hidrogeniones y dióxido de carbono (pp. 447 y 448). Para que se libere oxígeno donde sea más necesario, la hemoglobina ha evolucionado para liberar oxígeno más fácilmente en respuesta a elevados niveles de estas sustancias. Al igual que el 2,3-BPG, los hidrogeniones y el dióxido de carbono son *efectores alostéricos* de la hemoglobina que se unen a centros de la molécula distintos a los que se une el oxígeno. A la regulación por hidrogeniones y dióxido de carbono se denomina *efecto Bohr*, en reconocimiento a Christian Bohr, quien describió este fenómeno en 1904.

La afinidad de la hemoglobina por oxígeno disminuye cuando el pH desciende del valor 7,4 (Figura 7.18). Por esta razón, cuando la hemoglobina se desplaza a una zona de pH menor, aumenta su tendencia a liberar oxígeno. Así, por ejemplo, el transporte desde los pulmones, con un pH de 7,4 y una presión parcial de oxígeno de 100 torr, hasta el músculo activo, con un pH de 7,2 y una presión parcial de 20 torr, da como resultado una liberación de oxígeno que alcanza el 77% de su capacidad total de transporte. Recordemos que, si no hubiese cambio alguno de pH, la liberación de oxígeno sólo alcanzaría un 66%. Diversos estudios estructurales y químicos han aportado abundante información sobre las bases químicas del efecto Bohr. Como mínimo, dos tipos de grupos químicos son responsables de este efecto: los amino terminales de las cadenas α y los cadenas laterales de las histidinas $\beta 146$ y $\alpha 122$, cuyos valores de pK_a son próximos a pH 7. Consideremos la histidina $\beta 146$, residuo situado en el extremo carboxilo terminal de la cadena β . En la desoxihemoglobina el grupo carboxilato terminal de la $\beta 146$ forma un puente salino con un residuo de lisina de la subunidad α o del otro dímero $\alpha\beta$. Esta interacción bloquea la cadena lateral de la histidina $\beta 146$ en una posición que le permite participar en un puente salino con el grupo cargado negativamente del aspartato 94 de la misma cadena, siempre que esté protonado el grupo imidazol de la histidina (Figura 7.19).

Los demás grupos también intervienen en la formación de puentes salinos en el estado T. La formación de estos puentes salinos estabiliza el estado T, a la vez que favorece la tendencia a liberar oxígeno. Así, por ejemplo, a pH alto la cadena late-

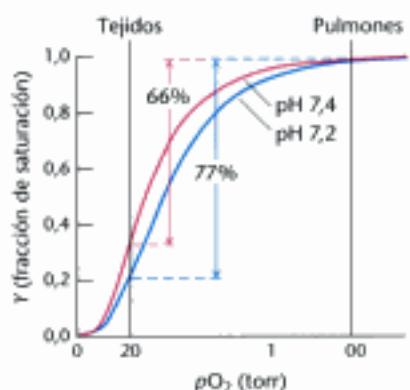


Figura 7.18 Efecto del pH en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Al bajar el pH desde 7,4 (curva en rojo) hasta 7,2 (curva en azul) aumenta la liberación de O₂ de la oxihemoglobina.

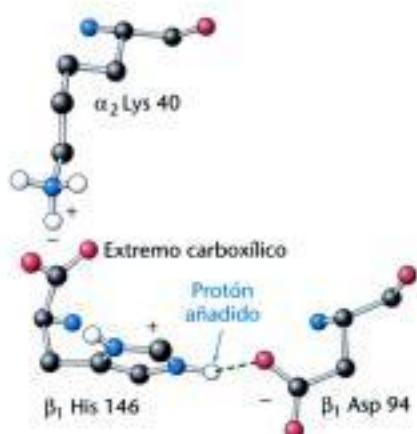


Figura 7.19 Bases químicas del efecto Bohr. En la desoxihemoglobina aquí representada, tres residuos de aminoácidos forman dos puentes salinos que estabilizan la estructura cuaternaria en estado T. La formación de uno de estos puentes depende de la presencia de un protón añadido a la histidina β 146. En la desoxihemoglobina, la proximidad de la carga negativa del aspartato β 94 favorece la protonación de la histidina. Obsérvese que el puente salino entre la histidina β 146 y el aspartato β 94 está estabilizado por un puente de hidrógeno (línea de puntos verde).

ral de la histidina β 146 no está protonada, y entonces no se forma el puente salino. No obstante, cuando el pH desciende, la cadena lateral de la histidina β 146 se protona, se forma el puente salino con el aspartato β 94 y se estabiliza el estado T.

El dióxido de carbono, una molécula neutra, atraviesa la membrana del hematíe al interior celular. Este transporte también se ve facilitado por los transportadores de membrana, incluidas las proteínas responsables de los grupos Rh sanguíneos. El dióxido de carbono estimula la liberación de oxígeno por dos mecanismos. En primer lugar, la presencia de altas concentraciones de dióxido de carbono conduce a una caída del pH en el interior del hematíe (Figura 7.20).

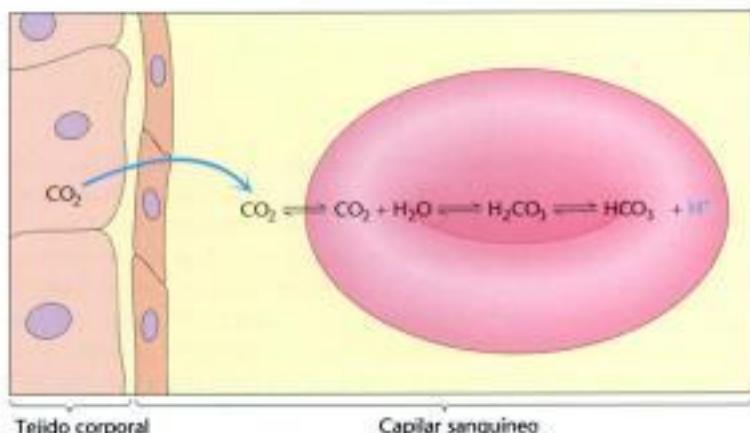


Figura 7.20 Dióxido de carbono y pH. En los tejidos, el dióxido de carbono difunde al interior de los hematíes. En su interior, el dióxido de carbono reacciona con el agua para formar ácido carbónico mediante una reacción catalizada por el enzima anhidrasa carbónica. El ácido carbónico se disocia para dar HCO_3^- y H^+ , lo que origina una caída del pH en el interior del hematíe.

El dióxido de carbono reacciona con el agua para formar ácido carbónico, H_2CO_3 . Esta reacción está acelerada por la *anhidrasa carbónica*, un enzima abundante en los hematíes y que se estudiará en detalle en el Capítulo 9. El ácido carbónico es un ácido fuerte con un pK_a de 3,5. Por tanto, una vez que se forma, se disocia para dar un ion bicarbonato, HCO_3^- , y un H^+ , lo que origina una caída del pH. Esta disminución del pH estabiliza el estado T por el mecanismo estudiado anteriormente.

El segundo mecanismo consiste en una interacción química directa entre el dióxido de carbono y la hemoglobina que estimula la liberación de oxígeno. El efecto del dióxido de carbono en la afinidad del oxígeno se pone de manifiesto al comparar las curvas de unión de oxígeno en ausencia y presencia de dióxido de carbono a pH constante (Figura 7.21). En presencia de dióxido de carbono a una presión parcial de 40 torr y un valor de pH de 7,2, el total de oxígeno liberado se acerca al 90% de su capacidad máxima de transporte.

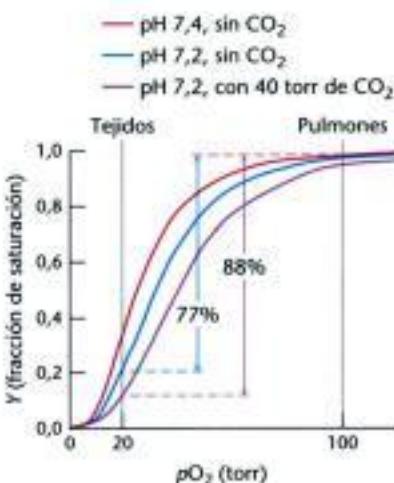
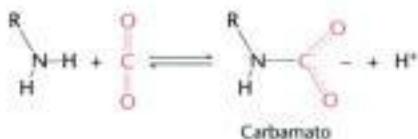


Figura 7.21 Efecto del dióxido de carbono. La presencia de dióxido de carbono disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, prevaleciendo su efecto incluso al debido a la disminución del pH, lo que conlleva, si cabe, a un transporte de oxígeno aún más efectivo de los tejidos a los pulmones.

El dióxido de carbono estabiliza la desoxihemoglobina al reaccionar con los grupos amino terminales formando grupos carbamato, que están cargados negativamente, en contraste con las cargas neutras o positivas de los grupos amino libres.



Los grupos amino terminales permanecen en la interfase entre los dímeros $\alpha\beta$, y estos grupos carbamato cargados negativamente participan en las interacciones que se establecen por puentes salinos y que estabilizan el estado T, favoreciendo la liberación de oxígeno. Este proceso también constituye un mecanismo para transportar el dióxido de carbono, pero sólo justificaría un 14% del transporte total de dióxido de carbono.

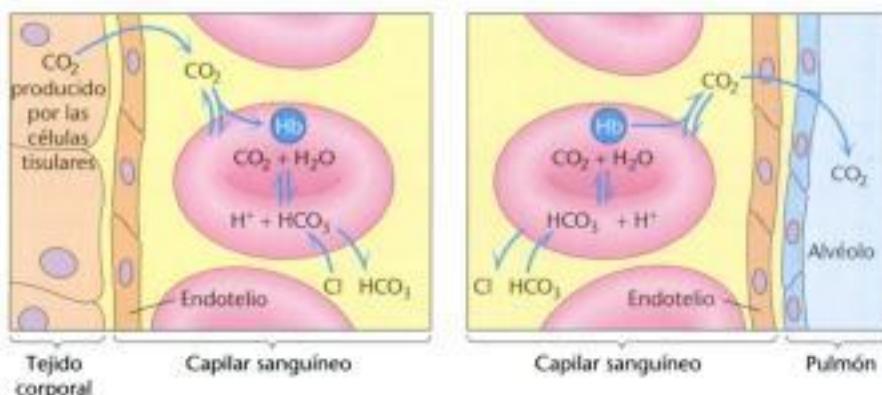


Figura 7.22 Transporte de CO_2 de los tejidos a los pulmones. La mayor parte del dióxido de carbono se transporta a los pulmones en forma de HCO_3^- formado en los hematíes y luego liberado al plasma sanguíneo. Una menor cantidad se transporta unido a la hemoglobina en forma de carbamato.



Figura 7.23 Hematíes falciformes. La micrografía muestra un hematíe falciforme junto a otros normales. [Eye of Science/Photo Researchers.]

La mayor parte del dióxido de carbono liberado por los hematíes se transporta a los pulmones en forma de HCO_3^- formado a partir de la hidratación del dióxido de carbono en el interior del hematíe (Figura 7.22). Gran cantidad del HCO_3^- formado abandona la célula a través de una proteína transportadora de membrana específica que intercambia HCO_3^- de un lado de la membrana por Cl^- de otro lado. En consecuencia, la concentración de HCO_3^- en el suero aumenta. Por este mecanismo, se transporta en forma de HCO_3^- una elevada concentración de dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones. En los pulmones este proceso se invierte: el HCO_3^- se convierte nuevamente en dióxido de carbono y se exhala. De este modo, el dióxido de carbono generado por los tejidos en actividad contribuye a disminuir el pH intracelular de los hematíes y, por tanto, a liberar oxígeno, convirtiéndose en una forma que puede transportarse en el suero y liberarse en los pulmones.

7.4 Las mutaciones en genes que codifican las subunidades de la hemoglobina pueden producir enfermedades

En los tiempos actuales, sobretodo después de completarse la secuenciación del genoma humano, es frecuente pensar en variaciones de la secuencia proteica codificadas genéticamente como factores responsables de determinadas enfermedades. La idea de que las enfermedades puedan ser debidas a defectos moleculares fue ya propuesta por Linus Pauling en 1949 (4 años antes de que Watson y Crick propusieran su modelo para el DNA bicatenario) para explicar la enfermedad de la sangre conocida como *anemia falciforme*. El nombre de la enfermedad se debe a la anormal forma de hoz que muestran los hematíes privados de oxígeno y que se detectan en gente que padece esta enfermedad (Figura 7.23). Pauling propuso que la enfermedad falciforme debía estar originada por una variación específica en la secuencia amino-

acídica de una cadena de hemoglobina. Hoy en día sabemos que es correcta esa atrevida hipótesis. De hecho, alrededor de un 7% de la población mundial son portadores de alguna deficiencia en la hemoglobina causada por una variación en su secuencia aminoácida. Antes de terminar este capítulo, nos centraremos en dos de las enfermedades más importantes de este tipo: la anemia falciforme y la talasemia.

La anemia falciforme es el resultado de la agregación de moléculas de desoxihemoglobina mutadas

La gente poseedora de hematíes falciformes sufre varios síntomas peligrosos. El análisis del contenido de estos hematíes revela que las moléculas de hemoglobina han formado grandes agregados fibrosos (Figura 7.24). Estas fibras se extienden a través de los hematíes deformándolos, de manera que pueden taponar los finos capilares e impedir el flujo sanguíneo. Como resultado, aparece una dolorosa hinchazón en las extremidades y un mayor riesgo de apoplejía o de infección bacteriana (debido a una circulación defectuosa). Además, los hematíes falciformes no permanecen en circulación tanto tiempo como los normales, lo que origina anemia.

¿Cuál es el defecto molecular asociado a la anemia falciforme? Empleando técnicas cromatográficas, Vernon Ingram demostró en 1956 que la anomalía responsable es la sustitución de un solo aminoácido de la cadena β de la hemoglobina, es decir, la sustitución de un residuo de glutamato en posición 6 por uno de valina. A la forma mutada se la denomina *hemoglobina S* (HbS) (S por "sickle": hoz). La gente que padece anemia falciforme tiene mutados ambos alelos del gen que codifica la cadena β de la hemoglobina (HbB). La sustitución que se da en la HbS disminuye de forma importante la solubilidad de la desoxihemoglobina, aunque no afecta mucho a las propiedades de la oxihemoglobina.

El examen de la estructura de la hemoglobina S muestra que el nuevo residuo de valina se sitúa sobre la superficie de la molécula en el estado T (Figura 7.25). Para que se inicie el proceso de agregación, este nuevo parche adhesivo debe interaccionar con otro parche adhesivo (hidrofóbico) integrado por la Phe 85 y Val 88 de la cadena β de una molécula vecina. Un análisis más detallado indica que una sola fibra de hemoglobina S se forma a partir de 14 cadenas de moléculas de hemoglobina unidas por múltiples interconexiones. ¿Por qué no se forman esos agregados cuando la hemoglobina S está oxigenada? La hemoglobina S oxigenada está en estado R, y los residuos Phe 85 y Val 88 de la cadena β están muy embebidos dentro del ensamblaje de la hemoglobina. Sin una pareja con quien interactuar, el residuo superficial de Val en posición 6 es benigno.

Aproximadamente, 1 de cada 100 africanos occidentales padece anemia falciforme. Dadas las frecuentemente devastadoras consecuencias de la enfermedad, ¿por qué la mutación HbS es tan prevalente en África y en otras zonas? Recuérdese que en la población que padece anemia falciforme están mutadas ambas copias del gen HbB. La población con una copia del gen HbB y otra del HbS está relativamente inafectada. Se dice que poseen el *rasgo falciforme* porque pueden transmitir el gen



Figura 7.24 Fibras de hemoglobina de una célula falciforme. La micrografia electrónica muestra un hematite falciforme roto del que emergen las fibras de hemoglobina. [Cortesía del Dr. Robert Josephs y del Dr. Thomas E. Willems, Universidad de Chicago.]

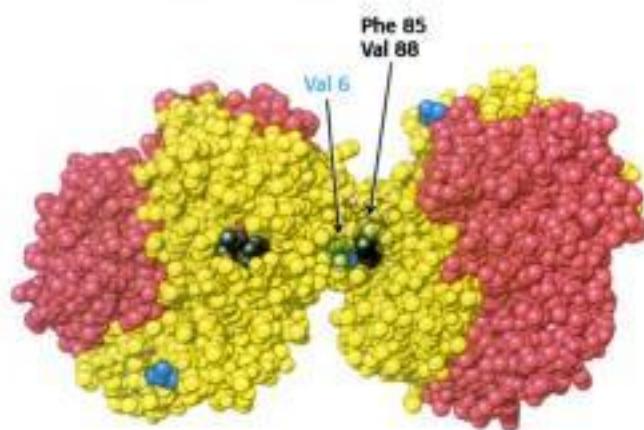


Figura 7.25 Hemoglobina S desoxigenada. La interacción entre la Val 6 (en azul) sobre una cadena β de una molécula de hemoglobina y un parche adhesivo integrado por la Phe 85 y Val 88 (en gris) sobre una cadena β de otra molécula de hemoglobina desoxigenada conduce a la agregación de la hemoglobina. Los residuos expuestos de Val 6 de otras cadenas participan en otras interacciones del mismo tipo en las fibras de hemoglobina S. [Tomado de 2HBS.pdb.]

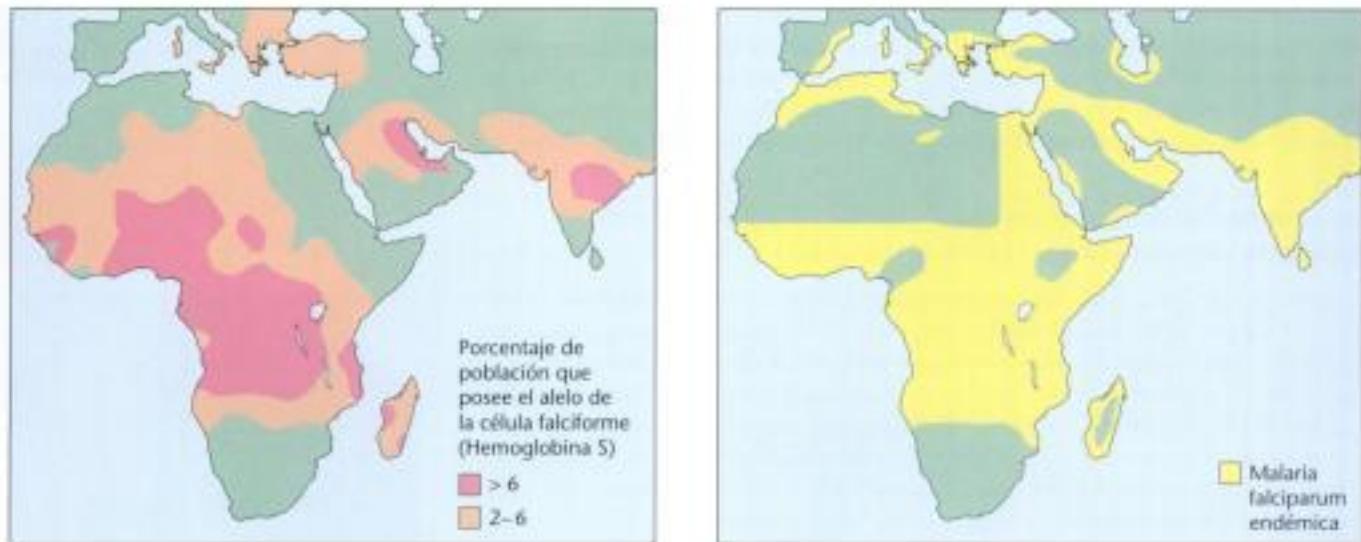


Figura 7.26. El rasgo falciforme y la malaria.

Se observa una correlación significativa entre las zonas con una elevada frecuencia del alelo HbS y las zonas con alta prevalencia de la malaria.

HbS a sus descendientes. Sin embargo, la población que posee el *rasgo falciforme* es resistente a la *malaria*, una enfermedad transmitida por un parásito, el *Plasmodium falciparum*, que vive en el interior de los hematíes durante una etapa de su ciclo vital. El terrible efecto de la malaria en la salud y en la probabilidad de reproducción en zonas donde la malaria ha sido históricamente endémica ha favorecido a la población poseedora del rasgo falciforme, aumentando la prevalencia del alelo HbS (Figura 7.26).

La talasemia se origina por un desequilibrio en la producción de las cadenas de hemoglobina

 La anemia falciforme se origina por sustitución de un solo aminoácido específico en una cadena de hemoglobina. La *talasemia*, otra enfermedad hereditaria prevalente de la hemoglobina, se origina por la pérdida o disminución significativa de una sola *cadena* de la hemoglobina. Esto da como resultado unos niveles bajos de hemoglobina funcional y una menor producción de hematíes, que puede luego originar anemia, fatiga, palidez y disfunciones del bazo e hígado. La talasemia comprende un conjunto de enfermedades relacionadas. Así, en la talasemia α , no se produce en suficiente cantidad la cadena α de la hemoglobina. En consecuencia, se forman tetrámeros de hemoglobina que solo contienen cadenas β . Estos tetrámeros, a los que se denomina *hemoglobina H* (HbH), son capaces de unir oxígeno con alta afinidad pero sin cooperatividad. En consecuencia, es deficiente la liberación de oxígeno en los tejidos. En la talasemia β , no se produce en suficiente cantidad la cadena β de la hemoglobina. En ausencia de cadenas β , las cadenas α forman agregados insolubles que precipitan en el interior de los hematíes inmaduros. La pérdida de hematíes origina anemia. La forma más grave de talasemia β se conoce como *talasemia mayor* o *anemia de Cooley*.

Tanto la talasemia α como la β están asociadas a muchas variaciones genéticas diferentes que se manifiestan en un amplio espectro de cuadros clínicos graves. Las formas más graves de talasemia α son habitualmente mortales poco antes o después del nacimiento. Sin embargo, esas formas son relativamente poco frecuentes. Un examen del repertorio de genes para la hemoglobina presentes en el genoma humano nos da la explicación. Normalmente, los humanos no tenemos dos sino cuatro alelos para la cadena α , ordenados de tal modo que una pareja de genes está localizada justo al lado de la otra, en uno de los extremos del cromosoma 16. De este modo, la pérdida completa de la expresión de la cadena α requiere la alteración de cuatro alelos. La talasemia β es mucho más frecuente porque normalmente solo tenemos dos alelos para la cadena β , uno en cada copia del cromosoma 11.

Se impide la acumulación de cadenas α libres de hemoglobina

La presencia de cuatro genes que expresan la cadena α , comparada con los dos para la cadena β , sugiere que la cadena α se sintetizaría en exceso (simplemente suponiendo que fuese parecida la producción de cada gen). Si esta suposición es correcta, ¿por qué no precipita el exceso de cadenas α ? Un descubrimiento reciente nos muestra un mecanismo para mantener las cadenas α en disolución. Los hematíes producen una proteína de 11 kd, denominada *proteína estabilizadora de la hemoglobina α* (AHSP, “ α -hemoglobin stabilizing protein”) que se une específicamente a los monómeros de cadenas α . Este complejo es soluble. La estructura cristalina de un complejo formado entre la AHSP y la hemoglobina α revela que la AHSP se une a la hemoglobina α en el mismo sitio en que lo hace la hemoglobina β (Figura 7.27). La AHSP se une a la cadena α tanto esté ésta oxigenada como desoxigenada. En el complejo con oxígeno unido, al átomo de hierro se une la histidina distal, en lugar de la proximal.

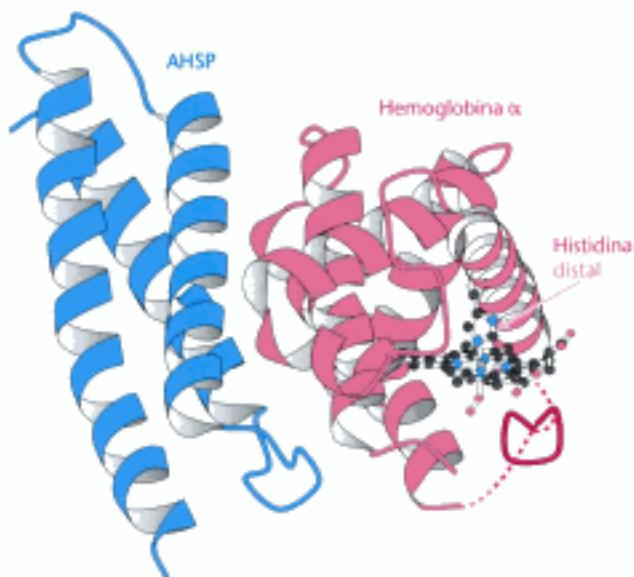


Figura 7.27 Estabilización de la hemoglobina α sin asociar. Se muestra la estructura del complejo entre la AHSP y la hemoglobina. En el complejo, el átomo de hierro está unido al oxígeno y a la histidina distal. Nótese que la AHSP se une a la misma zona de la hemoglobina α como lo hace la hemoglobina β . [Tomado de 1YO1.pdb.]

La AHSP se emplea para unirse a la hemoglobina α conforme se sintetiza. Cuando se produce la hemoglobina β , ésta desplaza a la AHSP porque el dímero hemoglobina α -hemoglobina β es más estable que el complejo hemoglobina α -AHSP. De este modo, la AHSP evita la acumulación y precipitación de las cadenas de hemoglobina α sin asociar. Actualmente, se están realizando estudios para determinar si las mutaciones en el gen que codifica la AHSP tienen algún papel modulando la gravedad de la talasemia β .

En el genoma humano están codificadas globinas suplementarias

¿Contiene el genoma humano haploide otros genes para la globina distintos del gen para la mioglobina, los dos genes para hemoglobina α y uno para hemoglobina β ? Con anterioridad, hemos visto que la hemoglobina fetal contiene la cadena γ en lugar de la β . Muchos otros genes codifican otras subunidades de hemoglobina que se expresan durante el desarrollo, tales como las cadenas δ , ϵ y ζ .

Un examen reciente de la secuencia del genoma humano ha puesto de manifiesto la existencia de dos globinas adicionales. Ambas proteínas son monoméricas y son más parecidas a la mioglobina que a la hemoglobina. La primera, la *neuroglobina*, se expresa mayoritariamente en el cerebro y a niveles espectaculares en la retina. Se cree que la neuroglobina puede desempeñar su función protegiendo los tejidos neuronales de la hipoxia (insuficiencia de oxígeno). La segunda, la *citoglobina*, se expresa homogéneamente por todo el cuerpo. Estudios estructurales y espectroscópi-



cos indican que, tanto en la neuroglobina como en la citoglobina, las histidinas proximal y distal están coordinadas con el átomo de hierro en la forma desoxi; la histidina distal se desplaza al unirse el oxígeno. Las funciones de estos miembros de la familia de las globinas se esclarecerán por completo en estudios venideros.

Resumen

7.1 La mioglobina y la hemoglobina unen el oxígeno a los átomos de hierro del grupo hemo

La mioglobina es una proteína estructurada principalmente en hélice α que tiene el hemo como grupo prostético. El hemo está formado por la protoporfirina, un componente orgánico con cuatro anillos pirrólicos unidos, y un ion de hierro en su centro en estado Fe^{2+} . En la mioglobina, el ion hierro está coordinado con la cadena lateral de un residuo de histidina. Uno de los átomos de oxígeno del O_2 se une a un centro de coordinación libre del hierro. Debido a la transferencia parcial de electrones desde el hierro al oxígeno, al unirse oxígeno, el hierro se desplaza al plano de la porfirina. La hemoglobina consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas α y dos β . Cada una de estas cadenas es similar a la mioglobina en su secuencia aminoacídica y se pliega en una estructura tridimensional parecida. El tetrámero de hemoglobina se describe mejor como una pareja de dímeros $\alpha\beta$.

7.2 La hemoglobina se une al oxígeno de forma cooperativa

La curva de unión de oxígeno para la mioglobina pone de manifiesto que el proceso de unión es de un simple equilibrio. La mioglobina se semisatura de oxígeno a una concentración de oxígeno de unos 2 torr. La curva de unión de oxígeno para la hemoglobina tiene forma de "S" (es sigmoidea), lo que indica que la unión de oxígeno es cooperativa. La unión de oxígeno a un centro del tetrámero de hemoglobina afecta la afinidad para unirse al oxígeno de los demás centros desocupados. La unión y liberación cooperativa de oxígeno aumenta de forma significativa la eficacia del transporte de oxígeno. El porcentaje de capacidad potencial para transportar oxígeno de los pulmones (a una presión parcial de oxígeno de 100 torr) a los tejidos (a una presión parcial de oxígeno de 20 torr) es del 66%. Este valor es muy superior al 7%, valor que se hubiera obtenido empleando la mioglobina como transportador de oxígeno.

La estructura cuaternaria de la hemoglobina cambia al unirse oxígeno. Se alude a la estructura de la desoxihemoglobina como estado T, y a la de la oxihemoglobina como estado R. Durante la transición entre los estados T y R, los dos dímeros $\alpha\beta$ giran unos 15 grados uno respecto del otro. La unión cooperativa puede explicarse potencialmente por los modelos concertado y secuencial. En el modelo concertado, cada hemoglobina adopta el estado T o el R; el equilibrio entre estos dos estados depende del número de centros de unión ocupados por el oxígeno. Los modelos secuenciales permiten estructuras intermedias. Los cambios estructurales en los centros del hierro en respuesta a la unión de oxígeno se transmiten a la interfase entre los dímeros $\alpha\beta$, lo que afecta al equilibrio entre T y R.

Los hematíes contienen 2,3-bisfosfoglicerato a concentraciones análogas a las de hemoglobina. El 2,3-BPG se une firmemente al estado T pero no al R, estabilizando el estado T y disminuyendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. La hemoglobina fetal se une al oxígeno más firmemente que la del adulto, debido a su unión más débil al 2,3-BPG. Esta diferencia permite la transferencia del oxígeno desde la sangre materna a la fetal.

7.3 El efecto Bohr: los hidrogeniones y el dióxido de carbono estimulan la liberación de oxígeno

Las propiedades de la hemoglobina para unirse al oxígeno están muy afectadas por el pH y por la presencia de dióxido de carbono, un fenómeno conocido

como efecto Bohr. Al incrementarse la concentración de hidrogeniones (es decir, al disminuir el pH) disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, debido a la protonación del amino terminal y ciertos residuos de histidina. Los residuos protonados facilitan la estabilización del estado T. Concentraciones elevadas de dióxido de carbono también disminuyen la afinidad de la hemoglobina para el oxígeno por dos mecanismos. Primero, el dióxido de carbono se convierte en ácido carbónico, que disminuye la afinidad de la hemoglobina por oxígeno al bajar el pH dentro del hematíe. Segundo, el dióxido de carbono se incorpora al amino terminal de la hemoglobina para formar carbamatos. Estos grupos cargados negativamente estabilizan la desoxihemoglobina mediante interacciones iónicas. Debido a que los hidrogeniones y el dióxido de carbono se producen en tejidos de metabolismo rápido, el efecto Bohr ayuda a liberar oxígeno en los sitios donde más se necesita.

7.4 Las mutaciones en genes que codifican las subunidades de la hemoglobina pueden producir enfermedades

La enfermedad de las células falciformes se debe a una mutación en la cadena β de la hemoglobina que sustituye un residuo de glutamato por uno de valina. Como resultado, se forma un parche adhesivo en la superficie de la desoxihemoglobina (en estado T) lo que conlleva a la formación de polímeros fibrosos. Estas fibras deforman los hematíes hasta que adquieren forma de hoz. La enfermedad de las células falciformes es la primera enfermedad asociada a cambios en la secuencia aminoacídica de una proteína. Las talasemias son enfermedades causadas por la deficitaria producción de las cadenas α o β de la hemoglobina. Se sintetizan tetrameros de hemoglobina que contienen un solo tipo de cadena de hemoglobina. Estas moléculas de hemoglobina se caracterizan por presentar escasa solubilidad y una pobre liberación de oxígeno, lo que origina la destrucción de los hematíes durante su desarrollo. Los precursores de los hematíes producen normalmente un ligero exceso de cadenas α de hemoglobina respecto de cadenas β . Para evitar la agregación del exceso de cadenas α , producen una proteína estabilizadora de la globina α , que se une específicamente a los monómeros de cadenas α formando complejos solubles.

APÉNDICE: Los modelos para la unión pueden formularse en términos cuantitativos: La representación de Hill y el modelo concertado

La representación de Hill

Una manera útil de describir procesos en los que se da unión cooperativa, como en la hemoglobina, fue desarrollada en 1913 por Archibald Hill. Consideremos el hipotético equilibrio que se da entre una proteína X cuando se une a su ligando S:



donde n es una variable que puede adoptar valores tanto enteros como fraccionales. El parámetro n es una medida del grado de cooperatividad en la unión de ligando, aunque no tiene ningún significado especial ya que la ecuación 1 no representa ningún proceso físico real. Si suponemos que X = hemoglobina y S = O₂, el valor máximo de n es 4. Se emplearía este valor de $n = 4$ si fuera totalmente cooperativa la unión de oxígeno por hemoglobina. Si la unión de oxígeno fuera totalmente no cooperativa, entonces n valdría 1.

El análisis del equilibrio indicado en la ecuación 1 proporciona las siguientes expresiones para la fracción de saturación, Y:

$$Y = \frac{[S]^n}{[S]^n + [S_{50}]^n}$$

donde [S₅₀] es la concentración de S a la que X está semisaturada. Para la hemoglobina esta expresión se convierte en:

$$Y = \frac{pO_2^n}{pO_2^n + P_{50}^n}$$

donde P₅₀ es la presión parcial de oxígeno a la que la hemoglobina está semisaturada. Esta expresión puede reordenarse para dar:

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{pO_2^n}{P_{50}^n}$$

que tomando logaritmos puede expresarse como:

$$\log\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = \log\left(\frac{pO_2^n}{P_{50}^n}\right) = n \log(pO_2) - n \log(P_{50})$$

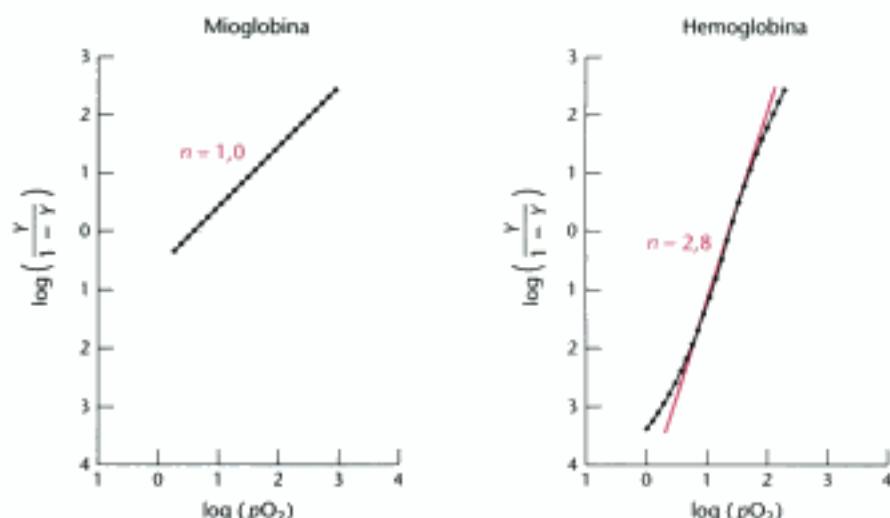


Figura 7.28 Representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina.

Esta ecuación predice que una representación de: $\log(Y/(1 - Y))$ frente $\log(P_{SO})$, llamada *representación de Hill*, proporcionará una recta de pendiente n .

En la Figura 7.28 se muestran las representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina. Para la mioglobina, la representación de Hill da una recta de pendiente unidad. Para la hemoglobina, la representación de Hill no es completamente recta porque el equilibrio en el que se basa esta representación no es del todo correcto. Sin embargo, la curva obtenida es casi recta en el centro con una pendiente de 2,8. Esta pendiente, a menudo denominada *coeficiente de Hill*, es una medida de la cooperatividad que presenta la unión de oxígeno. La utilidad de la representación de Hill radica en que proporciona una estimación cuantitativa del grado de cooperatividad en la unión a partir de un planteamiento sencillo. Empleando la ecuación de Hill y dando valores al coeficiente de Hill, se puede simular una curva de unión que se acerca mucho a la obtenida experimentalmente para la hemoglobina (Figura 7.29):

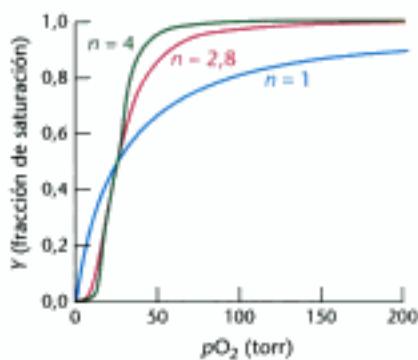


Figura 7.29 Curvas teóricas de unión a oxígeno empleando diferentes coeficientes de Hill. La curva obtenida para $n = 2,8$ se parece mucho a la curva obtenida para la hemoglobina.

El modelo concertado

El modelo concertado puede formularse de forma cuantitativa. Para ello, solamente se requieren cuatro parámetros: (1) el número de centros de unión (que se supone son equivalentes entre sí) de la proteína, (2) el cociente de las concentraciones de los estados T y R en ausencia de ligandos unidos, (3) la afinidad de los centros de la proteína para unir ligando en estado R, y (4) una medida de cuánto más firmemente unen ligando las subunidades proteicas en estado R en comparación con las subunidades en estado T. El número de centros de unión, n , se puede conocer habitualmente de otros datos. Así, para la hemoglobina, $n = 4$. El cociente entre las concentraciones de los estados T y R en ausencia de ligandos es una constante que se define como:

$$L = [T_0]/[R_0]$$

Donde el subíndice indica el número de ligandos unidos (en este caso cero). La afinidad de las subunidades en estado R se define por su constante de disociación, K_R , para la unión de un ligando a un único centro en estado R. De forma análoga, la constante de disociación para la unión de un ligando a un único centro en estado T es K_T . Podemos definir el cociente entre esas dos constantes de disociación como:

$$c = K_R/K_T$$

Esta relación es una medida de cuánto más firme una subunidad proteica en estado R se une a un ligando en comparación con la subunidad en estado T. Nótese que $c < 1$, ya que K_R y K_T son constantes de disociación y una unión más sólida corresponde a una menor constante de disociación.

¿Cuál es la relación entre las concentraciones de la proteína en sus estados T y R cuando tienen un solo ligando unido en ambos estados? La constante de disociación para un único centro en estado R es K_R . Si una proteína tiene n centros, dispone de n posibles centros desocupados para unir el primer ligando. El factor estadístico favorece la unión de ligando en comparación con una proteína que sólo posea un centro. Así, $[R_1] = n[R_0][S]/K_R$. Del mismo modo, $[T_1] = n[T_0][S]/K_T$. De este modo:

$$[T_1]/[R_1] = \frac{n[T_0][S]/K_T}{n[R_0][S]/K_R} = \frac{[T_0]}{[R_0](K_R/K_T)} = cL$$

Para los estudios de saturación con i ligandos unidos, un análisis similar proporciona la expresión, $[T_i]/[R_i] = c^i L$. Esto es, el cociente de las concentraciones de los estados T y R se reduce a un factor de c para cada ligando que se une.

Definamos ahora una escala conveniente para expresar la concentración de S:

$$\alpha = [S]/K_R$$

Esta definición es útil porque es el cociente entre la concentración de S y la constante de disociación que determina la magnitud de la unión. Empleando esta definición, vemos que:

$$[R_1] = \frac{n[R_0][S]}{K_R} = n[R_0]\alpha$$

Similarmente,

$$[T_1] = \frac{n[T_0][S]}{K_T} = ncL[R_0]\alpha$$

¿Cuál es la concentración de moléculas en estado R con dos ligandos unidos? Una vez más, debemos tener en cuenta el factor estadístico, es decir, el número de formas por las que se puede unir un ligando a una molécula con un centro ya ocupado. El número de formas será $n - 1$. Sin embargo, como no importa qué ligando es el "primero" y cuál el "segundo", debemos dividir por un factor de 2. De este modo,

$$\begin{aligned}[R_2] &= \frac{\binom{n-1}{2}[R_1][S]}{K_R} \\ &= \binom{n-1}{2}[R_1]\alpha \\ &= \binom{n-1}{2}(n[R_0]\alpha)\alpha \\ &= n\binom{n-1}{2}[R_0]\alpha^2\end{aligned}$$

Podemos obtener ecuaciones similares a las anteriores para el caso en que i ligandos se hayan unido a los estados T.

También podemos calcular ahora la fracción de saturación, Y . Esta es la concentración total de centros ocupados por ligandos dividida por la concentración total de centros de unión potenciales. Así,

$$Y = \frac{([R_1] + [T_1]) + 2([R_2] + [T_2]) + \dots + n([R_n] + [T_n])}{n([R_0] + [T_0] + [R_1] + [T_1] + \dots + [R_n] + [T_n])}$$

Sustituyendo en la ecuación anterior obtenemos:

$$\begin{aligned}n[R_0]\alpha + nc[T_0]\alpha + 2(n(n-1)/2)[R_1]\alpha^2 \\ Y = \frac{2(n(n-1)/2)c^2[T_0]\alpha^2 + \dots + n[R_n]\alpha^n + nc^n[T_n]\alpha^n}{n[R_0] + n[T_0] + n[R_1]\alpha + nc[T_1]\alpha + \dots \\ + [R_n]\alpha^n + c^n[T_n]\alpha^n}\end{aligned}$$

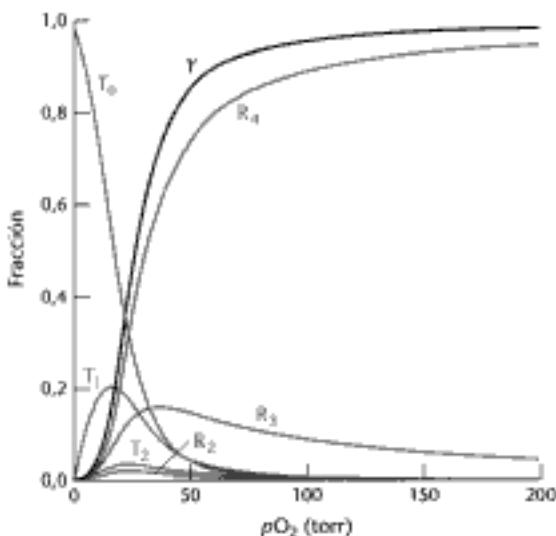


Figura 7.30 Simulación de la unión de oxígeno empleando el modelo concertado. Se ha representado la fracción de saturación (Y) en función de la pO_2 , empleándose los valores $L = 9000$, $c = 0,014$ y $K_R = 2,5$ torr. Se muestra la fracción de moléculas en estado T con ninguna, una y dos moléculas de oxígeno unidas (T_0 , T_1 y T_2) y la fracción de moléculas en estado R con dos, tres y cuatro moléculas de oxígeno unidas (R_2 , R_3 y R_4). No se representan las fracciones de moléculas en los demás estados por ser demasiado pequeñas.

Sustituyendo que $[T_0] = L[R_0]$ y sumando estas series se obtiene:

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+c\alpha)^n}$$

Ahora podemos emplear esta ecuación para ajustar los datos experimentales de la hemoglobina variando los valores de L , c y K_R (con $n = 4$). Se consigue un excelente ajuste poniendo que $L = 9000$, $c = 0,014$ y $K_R = 2,5$ torr (Figura 7.30).

Además de la fracción de saturación, también se muestran las concentraciones de las especies T_0 , T_1 , T_2 , R_2 , R_3 y R_4 . La concentración de las demás especies es muy baja. La suma de concentraciones es la diferencia más significativa entre el análisis empleando la ecuación de Hill y éste del modelo concertado. La ecuación de Hill proporciona solamente la fracción de saturación, mientras que el análisis empleando el modelo concertado nos da las concentraciones de todas las especies. En el caso que nos ocupa, este análisis proporciona la esperada relación entre las proteínas en estados T y R para cada etapa de saturación. Este cociente varía desde 9000 a 126, a 1,76, a 0,025 y a 0,00035, cuando se han unido ninguna, una, dos, tres y cuatro moléculas de oxígeno a la hemoglobina, respectivamente. Este cociente es una medida cuantitativa de la población de moléculas de hemoglobina que experimentan la transición del estado T al R.

El modelo secuencial también puede formularse de forma cuantitativa. Sin embargo, su formulación implica muchos más parámetros y, a menudo, diferentes conjuntos de valores de los parámetros proporcionan ajustes muy parecidos a los datos experimentales.

Términos clave

- hemo (p. 184)
 protoporfirina (p. 184)
 histidina proximal (p. 185)
 formación de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI) (p. 185)
 anión superóxido (p. 185)
 metamioglobina (p. 185)
 histidina distal (p. 186)
 cadena α (p. 186)
 cadena β (p. 186)
 plegamiento de globina (p. 186)
 dímero $\alpha\beta$ (p. 187)
 curva de unión a oxígeno (p. 187)
- fracción de saturación (p. 187)
 presión parcial (p. 187)
 sigmaideas (p. 187)
 cooperatividad (p. 187)
 estado T (p. 188)
 estado R (p. 188)
 modelo concertado (modelo MWC) (p. 189)
 modelo secuencial (p. 190)
 2,3-bisfosfoglicerato (p. 191)
 hemoglobina fetal (p. 192)
 efecto Bohr (p. 192)
 anhidrasa carbónica (p. 193)
 carbamato (p. 194)
- anemia falciforme (p. 194)
 hemoglobina S (p. 195)
 malaria (p. 196)
 talasemia (p. 196)
 hemoglobina H (p. 196)
 talasemia mayor (anemia de Cooley) (p. 196)
 proteína estabilizadora de hemoglobina α (p. 197)
 neuroglobina (p. 197)
 citoglobina (p. 197)
 representación de Hill (p. 200)
 coeficiente de Hill (p. 200)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Perutz, M. F. 1978. Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239(6):92-125.
 Perutz, M. F. 1980. Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 208:135-162.
 Kilmartin, J. V. 1976. Interaction of haemoglobin with protons, CO₂, and 2,3-diphosphoglycerate. *Brit. Med. Bull.* 32:209-222.

Estructura

- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H. y Phillips, D. C. 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662-666.
 Shaanan, B. 1983. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171:31-59.
 Frier, J. A. y Perutz, M. F. 1977. Structure of human foetal deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 112:97-112.
 Perutz, M. F. 1969. Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect.* 63:213-261.
 Perutz, M. F. 1962. Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature* 194:914-917.

Interacción de la hemoglobina con efectores alostéricos

- Benesch, R. y Beesch, R. E. 1969. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 221:618-622.
 Fang, T. Y., Zou, M., Simplicianu, V., Ho, N. T. y Ho, C. 1999. Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of β 143 histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult hemoglobin. *Biochemistry* 38:13423-13432.
 Amone, A. 1992. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* 237:146-149.

Modelos para la cooperatividad

- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J.-P. 1965. On the nature of allosteric interactions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118.
 Koshland, D. I., Jr., Nemethy, G. y Filmer, D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365-385.
 Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D. y Daugherty, M. A. 1992. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255:54-63.

Anemia falciforme y talasemia

- Herrick, J. B. 1910. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch. Intern. Med.* 6:517-521.
 Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. y Wells, L. C. 1949. Sickle cell anemia: A molecular disease. *Science* 110:543-548.
 Ingram, V. M. 1957. Gene mutation in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180:326-328.
 Eaton, W. A. y Hofrichter, J. 1990. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv. Prot. Chem.* 40:63-279.
 Weatherall, D. J. 2001. Phenotype genotype relationships in monogenic disease: Lessons from the thalassemias. *Nat. Rev. Genet.* 2:245-255.

Proteínas de unión a globinas y otras globinas

- Kihm, A. J., Kong, Y., Hong, W., Russell, J. E., Rouda, S., Adachi, K., Simon, M. C., Blobel, G. A. y Weiss, M. J. 2002. An abundant erythroid protein that stabilizes free α -haemoglobin. *Nature* 417:758-763.
 Feng, L., Zhou, S., Gu, L., Gell, D. A., Mackay, J. P., Weiss, M. J., Gow, A. J. y Shi, Y. 2005. Structure of oxidized α -haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature* 435:697-701.
 Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C. y Hankeln, T. 2004. Neuroglobin and cytoglobin: Genes, proteins and evolution. *JUBMB Life* 56:703-707.
 Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A. y Burmester, T. 2005. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* 99:110-119.
 Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. y Hankeln, T. 2002. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* 19:416-421.
 Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L. y He, F. 2002. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:1411-9.

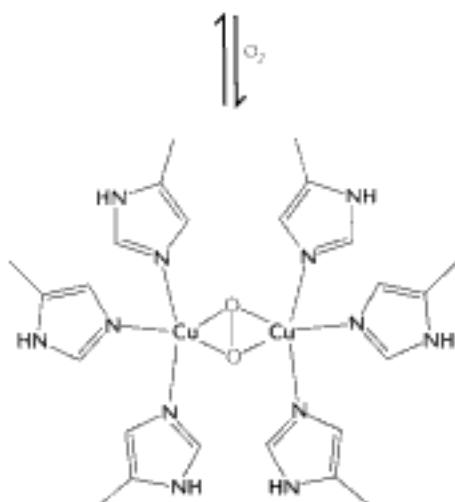
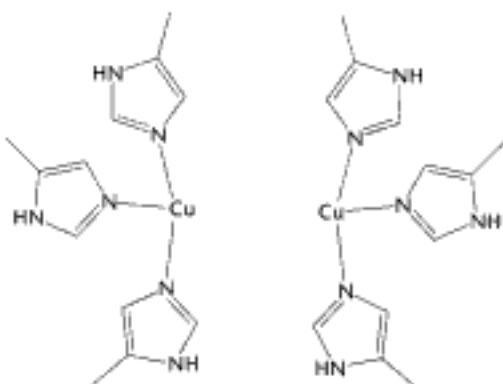
Problemas

1. *Rastreo de la biosfera.* La mioglobina de cachalote fue la primera proteína en la que se determinó su estructura. Proponer una explicación a la observación de que el músculo de cachalote es una fuente rica en esta proteína.

2. *Transporte de carga.* Supóngase que uno está escalando una elevada montaña y que la presión parcial de oxígeno en la atmósfera se reduce a 75 torr. Calcular el porcentaje en la capacidad para transportar oxígeno que se utilizará, suponiendo que el pH tanto de los tejidos como de los pulmones es de 7,4 y que la concentración de oxígeno en los tejidos es de 20 torr.

3. *Adaptación a las grandes altitudes.* Después de permanecer uno o más días a elevada altitud (soportando una presión parcial de oxígeno de 75 torr), la concentración de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) aumenta en los hematies. ¿Qué efecto tendrá un incremento en la concentración de 2,3-BPG en la curva de unión de oxígeno a la hemoglobina? Proponer una explicación a por qué esta adaptación será beneficiosa para sentirse bien a elevada altitud.

4. *Comeré langosta.* Los artrópodos, como la langosta, tienen transportadores de oxígeno completamente distintos a la hemoglobina. Sus centros de unión para el oxígeno no tienen hemo, sino que en su lugar tienen dos iones cobre (I). Más abajo, se muestran los cambios estructurales que acompañan la unión de oxígeno. ¿Cómo podrían utilizarse estos cambios para facilitar la unión cooperativa de oxígeno?

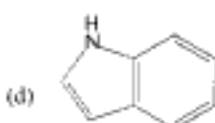
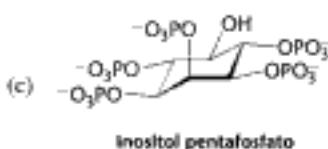
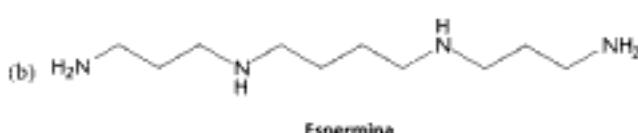
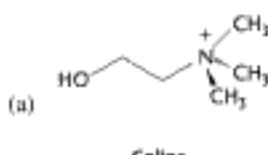


5. *Una desconexión.* Empleando mutagénesis puntual dirigida se ha preparado hemoglobina en la que los residuos de histidina proximal de las subunidades α y β han sido sustituidos por glicina. El anillo imidazólico del residuo de histidina puede reemplazarse añadiendo imidazol libre en disolución. ¿Se puede esperar que la hemoglobina modificada presente cooperatividad para unir oxígeno? Justificar la respuesta.



imidazol

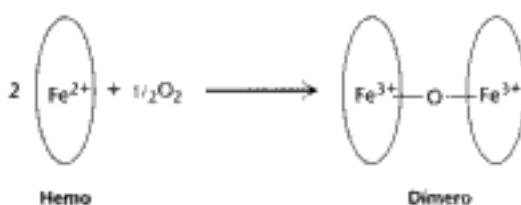
6. *Sustitución afortunada.* Los hematies de algunas aves no contienen 2,3-bisfosfoglicerato, pero en su lugar tienen alguno de los compuestos señalados más abajo con las letras a-d, que desempeñaría un papel parecido. ¿Qué compuesto piensa que, probablemente, es el que realizaría esa función? Explicarlo brevemente.



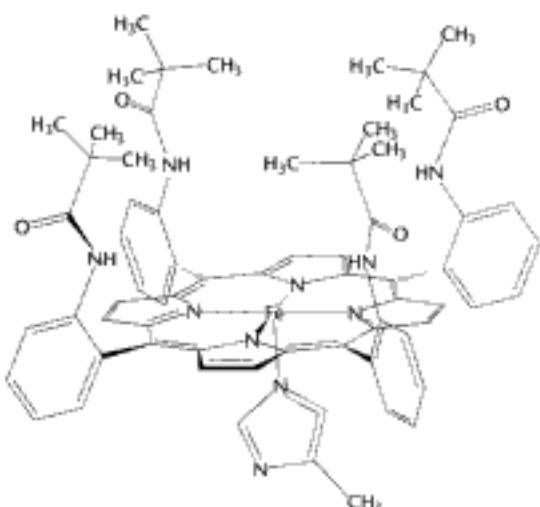
7. *Curvas teóricas.* (a) Empleando la ecuación de Hill, representar la curva de unión de oxígeno para una hipotética hemoglobina que tiene dos subunidades, empleando los valores $n = 1.8$ y $P_{50} = 10$ torr. (b) Repetir la representación empleando el modelo concertado con $n = 2$, $L = 1000$, $c = 0.01$ y $K_R = 1$ torr.

8. *Efecto parasitario.* Cuando *P. falciparum* vive en el interior del hematíe, el metabolismo de este parásito tiende a liberar ácido. ¿Qué probable efecto producirá la presencia de ácido en la capacidad de transporte de oxígeno de los hematies? ¿Y en la posibilidad de que esas células adoptasen forma de hoz?

9. *Porfirina vallada.* Cuando se expone un hemo libre al oxígeno, se forman rápida e irreversiblemente especies dímericas que están unidas por puentes de oxígeno (oxo).



Los químicos han diseñado y sintetizado un derivado de un hemo especial basado en una porfirina "vallada" que une oxígeno reversiblemente sin que se formen dímeros.



Proponer el fundamento para ese diseño y dar una explicación de cómo se une el oxígeno reversiblemente.

Problema de interpretación de datos

10. *Unión de oxígeno primitiva.* Las lampreas son organismos primitivos cuyos antepasados divergieron de los antepasados de peces y mamíferos aproximadamente hace 400 millones de años. La sangre de la lamprea contiene una hemoglobina relacionada con la de mamífero. Sin embargo, la hemoglobina de lamprea es monomérica en el estado oxigenado. Los datos obtenidos para la unión de oxígeno a la hemoglobina de lamprea son los siguientes:

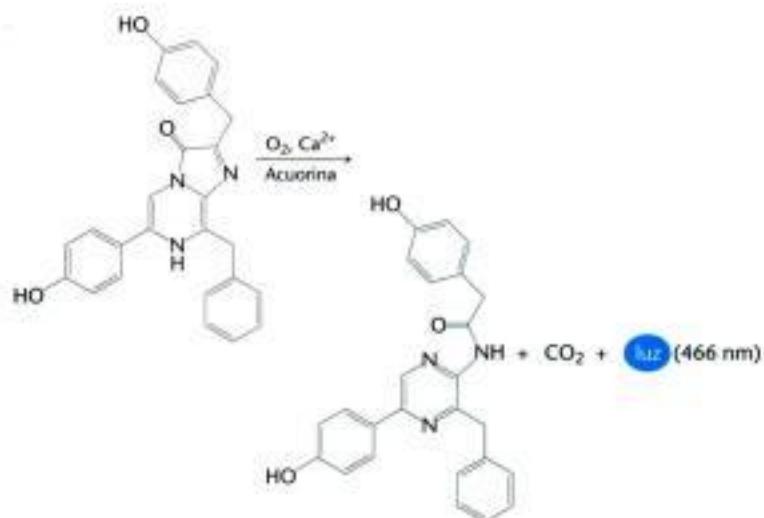
pO_2	γ	pO_2	γ	pO_2	γ
0,1	0,0060	2,0	0,112	50,0	0,889
0,2	0,0124	3,0	0,170	60,0	0,905
0,3	0,0190	4,0	0,227	70,0	0,917
0,4	0,0245	5,0	0,283	80,0	0,927
0,5	0,0307	7,5	0,420	90,0	0,935
0,6	0,0380	10,0	0,500	100	0,941
0,7	0,0430	15,0	0,640	150	0,960
0,8	0,0481	20,0	0,721	200	0,970
0,9	0,0530	30,0	0,812		
1,0	0,591	40,0	0,865		

(a) Representar estos datos para obtener una curva de unión de oxígeno. ¿A qué presión parcial de oxígeno se semisatura esta hemoglobina? De acuerdo con el aspecto de la curva obtenida, ¿parece cooperativa la unión del oxígeno?

(b) Hacer una representación de Hill con estos datos. ¿Muestra la representación de Hill algún indicio de existencia de cooperatividad? ¿Cuánto vale el coeficiente de Hill?

(c) Estudios posteriores han revelado que la hemoglobina de lamprea forma oligómeros, sobretodo dímeros, en el estado desoxigenado. Proponer un modelo para explicar la cooperatividad observada en la unión de oxígeno a la hemoglobina de lamprea.

Enzimas: conceptos básicos y cinética



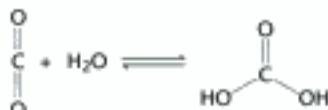
La actividad de un enzima es responsable de la luz difusa de la medusa luminiscente de la izquierda. El enzima acuorina cataliza la oxidación de un compuesto por oxígeno en presencia de calcio, para liberar CO_2 y luz. [(Izquierda) Fred Bavendam/Peter Arnold.]

Los *enzimas*, catalizadores de los sistemas biológicos, son moléculas de gran interés que determinan la pauta de las transformaciones químicas. También intervienen en la transformación de una forma de energía a otra. Las características más sobresalientes de los enzimas son su poder *catalítico* y su *especificidad*. La catálisis tiene lugar en un centro específico del enzima llamado *centro activo*. *Casi todos los enzimas conocidos son proteínas*. Sin embargo, las proteínas no tienen el monopolio absoluto de la catálisis; el descubrimiento de moléculas de RNA catalíticamente activas proporciona una evidencia concluyente de que el RNA fue un biocatalizador primitivo en la evolución.

Las proteínas son una clase de macromoléculas muy eficaces en catalizar una gran diversidad de reacciones químicas, debido a su capacidad para *unirse específicamente a un gran número de moléculas*. Utilizando el repertorio completo de fuerzas intermoleculares, los enzimas acercan los sustratos hasta lograr una orientación óptima, siendo éste el preludio para establecer o romper enlaces químicos. En esencia, catalizan las reacciones mediante la estabilización de los estados de transición que son las especies químicas de energía más alta generadas con las reacciones. Con esta estabilización selectiva de un estado de transición, un enzima determina cuál de las distintas reacciones químicas potenciales va a tener lugar.

Contenido

- 8.1 Los enzimas son catalizadores eficaces y muy específicos
- 8.2 La energía libre es una función termodinámica útil para la comprensión de los enzimas
- 8.3 Los enzimas aceleran las reacciones facilitando la formación del estado de transición
- 8.4 El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchos enzimas
- 8.5 Los enzimas pueden inhibirse mediante moléculas específicas

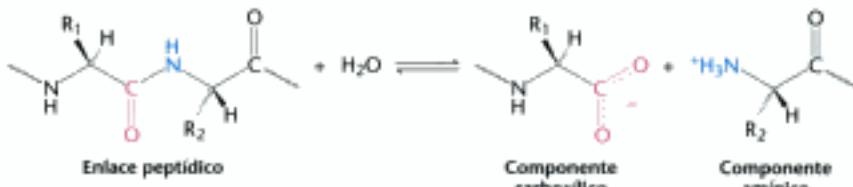


8.1 Los enzimas son catalizadores eficaces y muy específicos

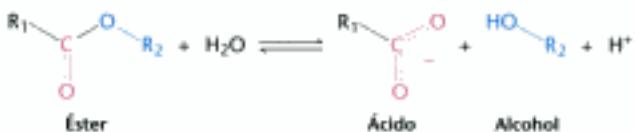
Los enzimas aceleran las reacciones multiplicando su velocidad por un millón de veces e incluso más (Tabla 8.1). De hecho, la mayoría de las reacciones en los sistemas biológicos no tiene lugar a velocidades perceptibles en ausencia de enzimas. Incluso una reacción tan sencilla como la hidratación del dióxido de carbono se cataliza por un enzima denominado anhidrasa carbónica (Sección 9.2) En su ausencia, la transferencia de CO_2 desde los tejidos a la sangre y desde ésta al aire alveolar sería incompleta. La anhidrasa carbónica es uno de los enzimas más rápidos que se conocen. Cada molécula enzimática puede hidratar 10^6 moléculas de CO_2 por segundo. Esta reacción catalizada es 10^7 veces más rápida que la misma reacción no catalizada. Consideraremos el mecanismo de la catálisis de la anhidrasa carbónica en el capítulo 9.

Los enzimas son altamente específicos, tanto en la reacción que catalizan como en la selección de las sustancias reaccionantes, denominadas *sustratos*. Un enzima cataliza normalmente una sola reacción química o un grupo de reacciones estrechamente relacionadas. En contraposición con las reacciones no catalizadas, en las reacciones catalizadas por enzimas son raras las reacciones colaterales que conducen a la formación de productos secundarios.

Consideremos como ejemplo los *enzimas proteolíticos*. La reacción catalizada *in vivo* por estos enzimas es la hidrólisis de un enlace peptídico o *proteólisis*.



La mayoría de los enzimas proteolíticos también catalizan *in vivo* una reacción diferente pero relacionada, es decir, la hidrólisis de un enlace éster. Estas reacciones son monitorizadas más fácilmente que la proteolisis y son útiles, por lo tanto, en la investigación experimental de estos enzimas (p. 244).



Los enzimas proteolíticos varían marcadamente en su grado de especificidad por el sustrato. La papaina, que se encuentra en plantas de la papaya, es totalmente inespecífica: puede romper cualquier enlace peptídico sin tener en cuenta la naturaleza

TABLA 8.1 Incremento de la velocidad de reacción de algunos enzimas

Enzima	Vida media no enzimática	Velocidad no catalizada ($k_{un} \text{ s}^{-1}$)	Velocidad catalizada ($k_{cat} \text{ s}^{-1}$)	Incremento de velocidad ($k_{cat} \text{ s}^{-1}/k_{un} \text{ s}^{-1}$)
OMP descarboxilasa	78 000 000 años	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$
Nucleasa de estafilococos	130 000 años	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
AMP nucleosidasa	69 000 años	$1,0 \times 10^{-11}$	60	$6,0 \times 10^{12}$
Carboxipeptidasa A	7,3 años	$3,0 \times 10^{-9}$	578	$1,9 \times 10^{11}$
Cetoesteróide isomerasa	7 semanas	$1,7 \times 10^{-7}$	66 000	$3,9 \times 10^{11}$
Triosa fosfatoisomerasa	1,9 días	$4,3 \times 10^{-6}$	4 300	$1,0 \times 10^9$
Corísmato mutasa	7,4 horas	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$
Anhidrasa carbónica	5 segundos	$1,3 \times 10^{-1}$	1×10^6	$7,7 \times 10^6$

Abreviaturas: OMP, orotidina monofosfato; AMP, adenosina monofosfato.

Fuente: A. Radzicka y R. Wolfsonen. *Science* 267 (1995):90-93.

de las cadenas laterales adyacentes al mismo. Esta carencia de especificidad justifica su utilización en salsas para reblanquecer la carne. La tripsina, un enzima digestivo, es completamente específica: rompe enlaces peptídicos únicamente por el lado carboxílico de los residuos de lisina y de arginina (Figura 8.1A). La trombina, un enzima que participa en la coagulación sanguínea, es todavía más específica que la tripsina (p. 293). Cataliza la hidrólisis de los enlaces Arg-Gly sólo en secuencias peptídicas determinadas (Figura 8.1B).

La DNA polimerasa I, un enzima dirigido por molde (Sección 28.3), es otro catalizador altamente específico. Añade nucleótidos en la hebra de DNA que está siendo sintetizada con una secuencia determinada por la secuencia de nucleótidos de la otra hebra de DNA que sirve como molde. La DNA polimerasa I es notablemente precisa en la realización de las instrucciones dadas por el molde. Se inserta un nucleótido equivocado en la nueva hebra de DNA con una frecuencia menor de una vez cada mil inserciones. *La especificidad de un enzima se debe a la interacción precisa del sustrato con el enzima. Esta precisión es el resultado de la compleja estructura tridimensional de la proteína enzimática.*

Muchos enzimas requieren cofactores para su actividad

La actividad catalítica de muchos enzimas depende de la presencia de pequeñas moléculas llamadas *cofactores*, aunque su papel concreto varía con el cofactor y el enzima. Generalmente, estos cofactores son capaces de llevar a cabo reacciones químicas que no pueden realizarse por el conjunto de los veinte aminoácidos diferentes existentes en los enzimas. Así un enzima sin su cofactor se denomina *apoenzima*; el enzima completo activo catalíticamente se llama *holoenzima*.



Los cofactores se subdividen en dos grupos: (1) metales y (2) moléculas orgánicas pequeñas llamadas *coenzimas* (Tabla 8.2). Con frecuencia derivados de las vitaminas, estos coenzimas pueden estar unidos al enzima fuerte o débilmente. Si la unión es muy fuerte se denominan *grupos prostéticos*. Los coenzimas asociados débilmente son más bien cosustratos, ya que se enlazan al enzima y son liberados de él como lo hacen los sustratos y los productos. La utilización del mismo coenzima por distintos enzimas y su origen a partir de las vitaminas, diferencian a los coenzimas de los sustratos normales. Los enzimas que utilizan el mismo coenzima tienen normalmente similares mecanismos de reacción. En el capítulo 9 examinaremos la importancia de los metales en la actividad enzimática y, a través del libro, veremos cómo los coenzimas y sus enzimas asociados funcionan en su contexto bioquímico. Un estudio más detallado de las vitaminas puede encontrarse en la página 423.

Los enzimas interconvierten diferentes formas de energía

En muchas reacciones bioquímicas, la energía de las sustancias reaccionantes se convierte en una forma de energía diferente con una eficiencia muy elevada. Por ejemplo, en la fotosíntesis, la energía lumínica se convierte en energía química de enlace. En las mitocondrias, la energía libre contenida en moléculas pequeñas derivadas de los alimentos se convierte primero en la energía libre de un gradiente de iones y luego en otra "moneda de cambio", la energía libre de la adenosina trifosfato (ATP). Los enzimas utilizan la energía química de enlace del ATP en formas muy diferentes, incluyendo posteriores transformaciones de energía. Por ejemplo, en la contracción muscular, la energía del ATP se convierte, gracias a la miosina, en energía mecánica (Capítulo 34). Las membranas de las células y los



Figura 8.1 Especificidad enzimática. (A) La tripsina rompe por el lado carboxílico de los residuos de arginina y lisina, mientras que (B) la trombina rompe los enlaces Arg-Gly solamente en secuencias determinadas.

TABLA 8.2 Cofactores de enzimas

Cofactor	Enzima
Coenzima	
Tiamina pirofosfato	Pinuvato deshidrogenasa
Flavina adenina nucleótido	Monoamino oxidasa
Nicotinamida adenina dinucleótido	Lactato deshidrogenasa
Piridoxal fosfato	Glucógeno fosforilasa
Coenzima A (CoA)	Acetil-CoA carboxilasa
Biotina	Pinuvato carboxilasa
5'-Desoxiadenosil-cobalamina	Metilmaloni-l-mutasa
Tetrahidrofolato	Timidilato sintasa
Metal	
Zn ²⁺	Anhidrasa carbónica
Zn ²⁺	Carboxipeptidasa
Mg ²⁺	EcoRV
Mg ²⁺	Hexoquinasa
Ni ²⁺	Ureasa
Mo	Nitrato reductasa
Se	Glutatión peroxidasa
Mn ²⁺	Superóxido dismutasa
K ⁺	Propionil-CoA carboxilasa

orgánulos tienen bombas que se pueden considerar como enzimas que transportan más bien que alteran químicamente a los sustratos y que utilizan ATP para transportar moléculas e iones a través de la membrana (Capítulo 13). Los gradientes químico y eléctrico que resultan de la distribución desigual de estas moléculas e iones son en sí mismos formas de energía que pueden utilizarse con diferentes propósitos, como por ejemplo el envío de impulsos nerviosos.

Todavía no se conocen exactamente los mecanismos moleculares de estos enzimas que transforman energía. En posteriores capítulos veremos cómo éstos conducen la conversión de la energía de una forma a otra mediante ciclos unidireccionales de etapas discretas (unión, transformación química y liberación).

8.2 La energía libre es una función termodinámica útil para la comprensión de los enzimas

Algunos de los principios de la termodinámica se presentaron en el Capítulo 1, especialmente la idea de *energía libre (G)*. Para comprender completamente como funcionan los enzimas, necesitamos considerar dos propiedades termodinámicas de la reacción: (1) La diferencia de energía libre (ΔG) entre los productos y los reactantes y (2) la energía que se requiere para iniciar la conversión de los reactantes en productos. La primera determina si la reacción será espontánea, mientras que la segunda determina la velocidad de la reacción. Los enzimas influyen solamente en esta última. Consideraremos en primer lugar los principios de la termodinámica así como su aplicación a los enzimas.

Los cambios de energía libre proporcionan información sobre la espontaneidad, pero no sobre la velocidad de una reacción

Tal como se expresó en la página 12, el cambio de energía libre de una reacción (ΔG) nos dice si la reacción puede transcurrir de forma espontánea:

1. *Una reacción puede tener lugar espontáneamente sólo si ΔG es negativo.* Se dice que dichas reacciones son *exergónicas*.
2. Un sistema está en equilibrio y no tiene lugar un cambio neto si ΔG es cero.
3. Una reacción no puede transcurrir espontáneamente si ΔG es positivo. Se requiere un aporte de energía libre para permitir tal reacción. Estas reacciones se llaman *endergónicas*.
4. El ΔG de una reacción sólo depende de la energía libre de los productos (el estado final) menos la de los reactantes (el estado inicial). *El ΔG de una reacción es independiente del camino (o mecanismo molecular) de la transformación.* El mecanismo de la reacción no tiene efecto sobre el ΔG . Por ejemplo, el ΔG para la oxidación de glucosa a CO_2 y H_2O es el mismo si transcurre por combustión o por una serie de etapas catalizadas enzimáticamente en una célula.
5. *El ΔG no proporciona información sobre la velocidad de la reacción.* Un ΔG negativo indica que una reacción *puede* transcurrir espontáneamente, pero no significa que se pueda llevar a cabo a velocidad apreciable. Como se verá en breve (Sección 8.3), la velocidad de una reacción depende de la *energía libre de activación (ΔG^\ddagger)*, que no está relacionada con el ΔG de la reacción.

El cambio de energía libre estándar de una reacción está relacionado con la constante de equilibrio

Como en cualquier otra reacción, para conocer si una reacción enzimática es espontánea o requiere de una entrada de energía, necesitamos poder determinar ΔG . Para

determinar este importante parámetro termodinámico, necesitamos tener en cuenta la naturaleza de los reactantes y de los productos de reacción, así como sus concentraciones.

Consideremos la reacción



El ΔG de esta reacción viene dado por:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (1)$$

donde ΔG° es el *cambio de energía libre estándar*, R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y $[A]$, $[B]$, $[C]$ y $[D]$ son las concentraciones molares (las actividades, para ser más precisos) de los reactantes. ΔG° es el cambio de energía libre para esta reacción en condiciones estándar; es decir, cuando cada uno de los reactantes A, B, C y D están presentes a una concentración de 1,0 M (para un gas, el estado estándar se toma normalmente como 1 atmósfera). Así, el ΔG de una reacción depende de la naturaleza de los reactantes (incluida en el término ΔG° de la ecuación 1) y de sus concentraciones (expresadas en el término logarítmico de la ecuación 1).

Se ha adoptado un convenio para simplificar los cálculos de energía libre para las reacciones bioquímicas. El estado estándar se define a pH 7. Consecuentemente, cuando el H^+ es un reactante, su actividad tiene el valor 1 (que corresponde a pH 7) en las ecuaciones (1) y (4) (abajo). También se considera que en estas ecuaciones la actividad del agua es 1. El *cambio de energía libre estándar a pH 7*, designado con el símbolo $\Delta G^\circ'$, es el que se utiliza en este libro. Como unidades de energía se utilizarán el *kilojulio* (kJ) y la *kilocaloría* (kcal). El kilojulio es equivalente a 0,239 kilocalorías.

Puede derivarse con facilidad la relación entre la energía libre estándar y la constante de equilibrio de una reacción. Esta ecuación es importante ya que manifiesta la relación energética entre los productos y los reactantes en términos de concentraciones. En el equilibrio, $\Delta G = 0$. La ecuación (1) se convierte en

$$0 = \Delta G^\circ' + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (2)$$

y por lo tanto

$$\Delta G^\circ' = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (3)$$

La constante de equilibrio en condiciones estándar, K'_{eq} , se define como

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (4)$$

Sustituyendo la ecuación (4) en la ecuación (3) se obtiene

$$\Delta G^\circ' = -RT \ln K'_{eq} \quad (5)$$

$$\Delta G^\circ' = -2,303RT \log_{10} K'_{eq} \quad (6)$$

que puede reordenarse para dar

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^\circ'/2,303RT} \quad (7)$$

Unidades de energía

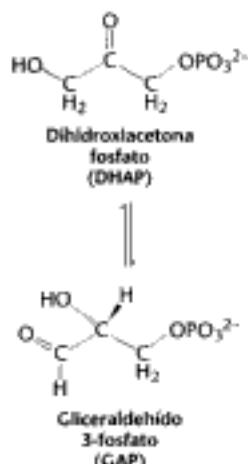
Un *kilojulio* (kJ) es igual a 1000 J.

Un *júlio* (J) es la cantidad de energía necesaria para aplicar la fuerza de 1 newton a lo largo de 1 m de distancia.

Una *kilocaloría* (kcal) es igual a 1000 cal.

Una *caloría* (cal) es la cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura de 1 gramo de agua de 14,5 °C a 15,5 °C.

$$1\text{ kJ} = 0,239 \text{ kcal}$$



Sustituyendo $R = 8,315 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $T = 298 \text{ K}$ (25°C) se obtiene

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^\circ / 5,69} \quad (8)$$

dónde ΔG° está expresado en kJ mol^{-1} debido a la elección de las unidades para R en la ecuación (7). Así, la energía libre estándar y la constante de equilibrio de una reacción están relacionadas por una expresión sencilla. Por ejemplo, una constante de equilibrio de 10 corresponde a un cambio de energía libre estándar de $-5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$) a 25°C (tabla 8.3). Observe que cada vez que la constante de equilibrio cambia en un factor de 10, la ΔG° varía en $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Vamos a calcular, como ejemplo, ΔG° y ΔG para la isomerización de la dihidroxacetona fosfato (DHAP) en gliceraldehido 3-fosfato (GAP). Esta reacción transcurre en la glicolisis (p. 438). En el equilibrio, la relación entre GAP y DHAP es 0,0475 a 25°C (298 K) y pH 7. Por tanto, $K'_{eq} = 0,0475$. El cambio de energía libre estándar para esta reacción se calcula a partir de la ecuación (6):

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -2,303RT \log_{10} K'_{eq} \\ &= -2,303 \times 1,987 \times 10^{-3} \times 298 \times \log_{10}(0,0475) \\ &= +7,53 \text{ kJ mol}^{-1} (+1,80 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

En estas condiciones, la reacción es endergónica. DHAP no se convertirá espontáneamente en GAP.

Calculemos ahora el ΔG para esta reacción cuando la concentración inicial de DHAP es $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ y la concentración inicial de GAP es $3 \times 10^{-6} \text{ M}$. Sustituyendo estos valores en la ecuación (1) obtenemos:

$$\begin{aligned}\Delta G &= 7,53 \text{ kJ mol}^{-1} + 2,303 RT \log_{10} \frac{3 \times 10^{-6} \text{ M}}{2 \times 10^{-4} \text{ M}} \\ &= 7,53 \text{ kJ mol}^{-1} - 10,42 \text{ kJ mol}^{-1} \\ &= -2,89 \text{ kJ mol}^{-1} (-0,69 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Este valor negativo para el ΔG indica que la isomerización de DHAP en GAP es exergónica y puede transcurrir espontáneamente cuando estas especies se encuentran a las concentraciones indicadas anteriormente. Nótese que el ΔG para esta reacción es negativo aunque ΔG° sea positivo. Es importante subrayar que el ΔG para una reacción puede ser mayor, menor o igual que ΔG° según las concentraciones de los reactantes y de los productos. El criterio de espontaneidad para una reacción es ΔG , no ΔG° . Este punto es importante ya que las reacciones que no son espontáneas según su ΔG° pueden volverse espontáneas ajustando las concentraciones de los reactantes y de los productos. Este principio es la base del acoplamiento entre las reacciones para formar las vías metabólicas (Capítulo 15).

Los enzimas modifican sólo la velocidad de reacción y no alteran el equilibrio de la reacción

Como los enzimas son magníficos catalizadores, existe la tentación de atribuirles poderes que no tienen. Un enzima no puede modificar las leyes de la Termodinámica y por lo tanto no puede alterar el equilibrio de una reacción química. Consideraremos la reacción de conversión del sustrato S en el producto P catalizada por un enzima. En la Figura 8.2 se representa la velocidad de formación de producto en función del tiempo, en la presencia y en la ausencia del enzima. Obsérvese que la cantidad de producto formado es el mismo tanto si el enzima está presente como si no lo está;

TABLA 8.3 Relación entre ΔG° y K'_{eq} (a 25°C)

K'_{eq}	ΔG°	
	kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}
10^{-5}	28,53	6,82
10^{-4}	22,84	5,46
10^{-3}	17,11	4,09
10^{-2}	11,42	2,73
10^{-1}	5,69	1,36
1	0	0
10	25,69	21,36
10^2	211,42	22,73
10^3	217,11	24,09
10^4	222,84	25,46
10^5	228,53	26,82

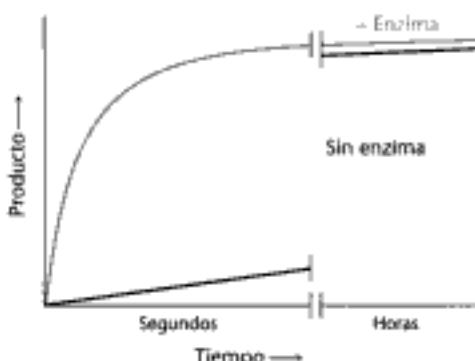


Figura 8.2 Los enzimas aceleran la velocidad de una reacción. En presencia de un enzima se alcanza el mismo punto de equilibrio, pero de manera mucho más rápida.

sin embargo, la cantidad de producto formado en segundos estando el enzima presente, puede llevar horas (o siglos, ver Tabla 8.1) para generarse si el enzima está ausente.

¿Por qué la velocidad de formación de producto se estabiliza con el tiempo? La reacción ha alcanzado el equilibrio. El sustrato S se convierte en producto P, mientras que P se convierte en S a una velocidad de tal manera que la cantidad de P presente permanece invariable.

Abora estudiaremos el equilibrio de una manera más cuantitativa. Supongamos que en ausencia de enzima, la constante de velocidad hacia adelante (k_F) para la interconversión de S en P es 10^{-4} s^{-1} y la constante de velocidad inversa (k_R) para la interconversión de P en S es 10^{-6} . La constante de equilibrio K viene dada por la relación entre estas constantes de velocidad:

$$\begin{aligned} S &\xrightleftharpoons[10^{-6} \text{ s}^{-1}]{10^{-4} \text{ s}^{-1}} P \\ K = \frac{[P]}{[S]} &= \frac{k_F}{k_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100 \end{aligned}$$

La concentración de P en el equilibrio es 100 veces la de S, haya o no enzima presente. Sin embargo, se tardaría un tiempo considerable en conseguir este equilibrio sin enzima, mientras que cuando el enzima apropiado (ver Tabla 8.1) está presente, el equilibrio se obtiene rápidamente. Así pues, *los enzimas aceleran la consecución del equilibrio, pero no varían su posición. La posición del equilibrio es una función que depende sólo de la diferencia de energía libre entre los reactantes y los productos.*

8.3 Los enzimas aceleran las reacciones facilitando la formación del estado de transición

La diferencia de energía libre entre reactantes y productos explica el equilibrio de la reacción, pero los enzimas aceleran el alcance de dicho equilibrio. ¿Cómo se puede explicar el aumento de la velocidad en términos termodinámicos? Para ello, no tenemos que tener en cuenta los puntos finales de la reacción sino la vía química que existe entre los puntos finales.

Una reacción química que transforma el sustrato S en producto P transcurre a través de un estado de transición X^\ddagger que tiene mayor energía libre que S o P.





Figura 8.3 Los enzimas disminuyen la energía de activación. Los enzimas aceleran las reacciones porque hacen decrecer ΔG^\ddagger , la energía libre de activación.

La doble cruz indica el estado de transición. El estado de transición es una estructura molecular transitoria que ya no es el sustrato pero que todavía no es el producto. El estado de transición es de las especies menos estables y más raramente ocupadas a lo largo del proceso de reacción, ya que es la que tiene la energía libre mayor. La diferencia en la energía libre entre el estado de transición y el sustrato se denomina *energía libre de Gibbs* o, simplemente, *energía de activación* y se simboliza por ΔG^\ddagger (Figura 8.3).

$$\Delta G^\ddagger = G_{X^\ddagger} - G_S$$

Observe que la energía de activación, o ΔG^\ddagger , no forma parte del cálculo final de ΔG para la reacción, ya que el aporte de energía necesaria para alcanzar el estado de transición es devuelto cuando del estado de transición se pasa al producto. La barrera de energía de activación sugiere inmediatamente cómo los enzimas aumentan la velocidad de reacción sin modificar la ΔG de la reacción. Los enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación o, en otras palabras, *los enzimas facilitan la formación del estado de transición*.

Un enfoque para comprender cómo los enzimas aumentan la velocidad de la reacción consiste en suponer que el estado de transición (X^\ddagger) y el sustrato (S) están en equilibrio.



donde K^\ddagger es la constante de equilibrio para la formación de X^\ddagger y v es la velocidad de formación del producto a partir de X^\ddagger . La velocidad de la reacción, v , es proporcional a la concentración de X^\ddagger .

$$v \propto [X^\ddagger]$$

ya que sólo X^\ddagger puede convertirse en producto. La concentración de X^\ddagger está relacionada con la diferencia de energía entre X^\ddagger y S, ya que se supone que estas dos especies químicas que están en equilibrio; cuanto mayor sea la diferencia entre estos dos estados, menor será la cantidad de X^\ddagger . De esta manera, la velocidad de la reacción global V depende de ΔG^\ddagger . Concretamente

$$V = v [X^\ddagger] = \frac{kT}{h} [S] e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

En esta ecuación, k es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck. El valor de kT/h a 25 °C es $6,6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Supongamos que la energía libre de activación es $28,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($6,82 \text{ kcal mol}^{-1}$). Como se muestra en la Tabla 8.3, esta diferencia en la energía libre se genera cuando la relación $[X^\ddagger]/[S]$ es 10^{-5} . Si para simplificar suponemos que $[S] = 1 \text{ M}$, la velocidad de reacción V es $62,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Si ΔG^\ddagger disminuyese a $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$), la relación $[X^\ddagger]/[S]$ sería de 10^{-4} y la velocidad de la reacción resultaría ser $6,2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Una disminución de $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ de ΔG^\ddagger proporciona una V 10 veces más rápida. Una disminución relativamente pequeña en ΔG^\ddagger (del 20% en esta reacción particular) tiene como resultado un aumento de la V mucho mayor.

Así, comprendemos la clave de cómo funcionan los enzimas: *los enzimas aceleran las reacciones mediante la disminución de ΔG^\ddagger* . La combinación del sustrato y el enzima crea una nueva vía de reacción cuya energía del estado de transición es menor que en la reacción en ausencia del enzima (ver Figura 8.3). La reducción en la energía de activación significa que un mayor número de moléculas tienen la energía necesaria para alcanzar el estado de transición. La disminución en la barrera de activación es análoga a la reducción de la altura del listón en el salto de altura; un mayor número de atletas podrán rebasarlo. La esencia de la catálisis es la estabilización específica del estado de transición.

"Creo que los enzimas son moléculas estructuralmente complementarias a los complejos activados de las reacciones que catalizan, es decir, a la configuración molecular intermedia entre las sustancias reactantes y los productos de la reacción de estos procesos catalizados. La atracción de la molécula enzimática por el complejo activado conllevaría una disminución en su energía y, por consiguiente, una disminución en la energía de activación de la reacción y un aumento en la velocidad de reacción."

LINUS PAULING
Nature 161 (1948): 797

La primera etapa de la catálisis enzimática es la formación de un complejo enzima-sustrato

213

8.3 El estado de transición

La mayor parte de la capacidad catalítica de los enzimas procede de yuxtaponer sus sustratos en orientaciones favorables dentro de los complejos *enzima-sustrato* (ES) para facilitar la formación de los estados de transición. Los sustratos quedan unidos a una región específica del enzima denominada *centro activo*. La mayoría de los enzimas son muy selectivos en su unión a los sustratos. Ciertamente, la capacidad catalítica de los enzimas depende en gran parte de la especificidad de la unión.

¿Cuáles son las evidencias de que se forman los complejos enzima-sustrato?

1. La primera pista fue la observación de que, a una concentración constante de enzima, la velocidad de la reacción aumenta con la concentración del sustrato hasta que se alcanza una velocidad máxima (Figura 8.4). Por el contrario, las reacciones no catalizadas no muestran este efecto de saturación. *El hecho de que una reacción catalizada por un enzima tenga una velocidad máxima sugiere la formación de un complejo enzima-sustrato (ES) discreto.* A una concentración de sustrato suficientemente alta, todos los centros catalíticos están ocupados por él y, por tanto, la velocidad de reacción no puede aumentar. Esta es la evidencia más general, aunque indirecta, de la existencia de los complejos ES.
2. La *cristalografía por rayos X* ha proporcionado imágenes de alta resolución de sustratos y análogos de sustratos unidos a los centros activos de muchos enzimas (Figura 8.5). En el Capítulo 9 estudiaremos con detalle algunos de estos complejos. Además, los estudios de rayos X realizados a baja temperatura (para disminuir las velocidades de reacción) están suministrando información acerca de los complejos enzima-sustrato y sus reacciones posteriores. Una nueva técnica, la *cristalografía de resolución en el tiempo*, depende de la cristalización de un análogo del sustrato sensible a la luz (fotolábil) con el enzima. La exposición a un pulso de luz convierte al análogo del sustrato en sustrato luminoso y mediante un sincrotrón se obtienen imágenes del complejo enzima-sustrato en una fracción de segundo, a partir del escáner del cristal con un haz de rayos X policromático intenso.

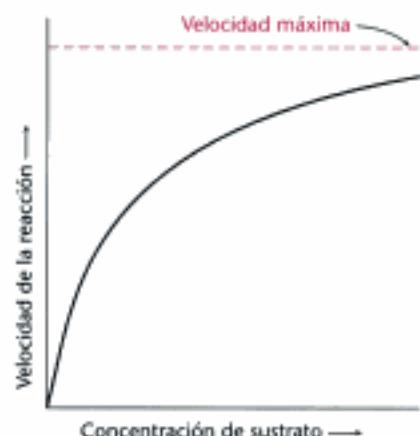


Figura 8.4 La velocidad de una reacción catalizada por un enzima es función de la concentración del sustrato. Una reacción enzimática alcanza una velocidad máxima.

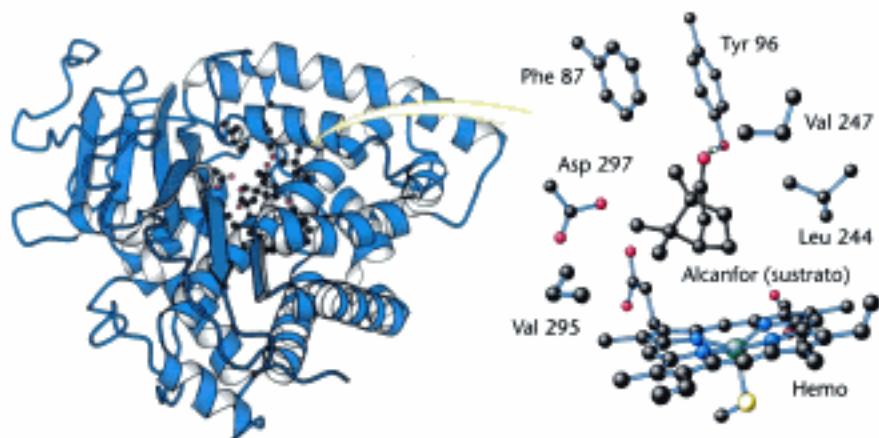


Figura 8.5 Estructura de un complejo enzima-sustrato. (Izquierda) Se ilustra el enzima citocromo P-450 unido a su sustrato alcanfor. (Derecha) En el centro activo, el sustrato está rodeado por residuos del enzima. Nótese también la presencia del cofactor hemo. [Tomado de 2CPP.pdb.]

3. Las características espectroscópicas de muchos enzimas y sustratos cambian con la formación del complejo ES. Estos cambios son particularmente llamativos cuando los enzimas contienen un grupo prostético coloreado. La triptófano sintetasa, un enzima bacteriano que contiene piridoxal fosfato (PLP) como grupo prostético, suministra una bonita ilustración de ello. Este enzima cataliza la síntesis de L-triptófano a partir de la L-serina y un derivado del indol. La adición de L-serina al enzima produce un acentuado aumento en la fluorescencia del PLP (Figura 8.6). La adición siguiente de indol, el segundo sustrato, disminuye esta fluorescencia a un nivel me-

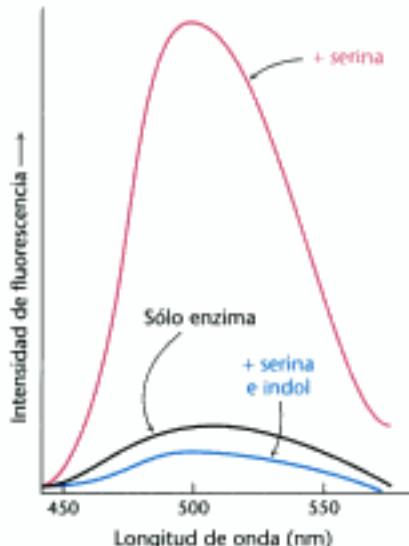


Figura 8.6 Cambios de las características espectroscópicas en la formación de un complejo enzima-sustrato. La intensidad de fluorescencia del grupo píridoxal fosfato en el centro activo de la triptófano sintetasa cambia por la adición de los sustratos serina e indol.

nor que la del enzima solo. Así, la espectroscopía de fluorescencia revela la existencia de un complejo enzima-serina y de un complejo enzima-serina-indol. Otras técnicas espectroscópicas, tales como la resonancia magnética nuclear y la resonancia de espín electrónico, son también altamente informativas acerca de las interacciones ES.

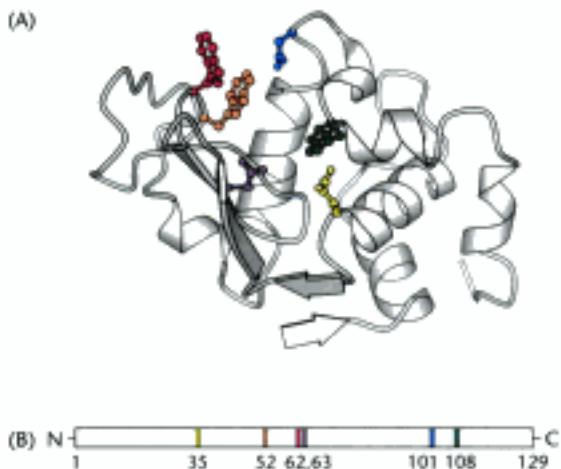
Los centros activos de los enzimas tienen algunas características comunes

El centro activo de un enzima es la región que une a los sustratos (y al cofactor, si existe) y contiene los residuos que participan directamente en la producción y ruptura de enlaces. Estos residuos se denominan *grupos catalíticos*. En esencia, la interacción del enzima y el sustrato en el centro activo hace posible la formación del estado de transición. El centro activo es la región del enzima que reduce más directamente la ΔG^\ddagger de la reacción, lo cual tiene por resultado el característico aumento de velocidad debido a la acción del enzima. Aunque los enzimas difieren ampliamente en la estructura, especificidad y modo de catálisis, se pueden establecer algunas generalizaciones respecto a sus centros activos:

1. *El centro activo es una hendidura tridimensional formada por grupos que provienen de diferentes partes de la secuencia de aminoácidos;* incluso, residuos muy alejados en la secuencia de aminoácidos pueden interaccionar más fuertemente que los residuos adyacentes. En la lisozima, un enzima que degrada las paredes celulares de algunas bacterias, los grupos importantes en el centro activo son los aportados por los residuos 35, 52, 62, 63, 101 y 108 de su secuencia lineal de 129 aminoácidos (Figura 8.7)



Figura 8.7 Los centros activos pueden incluir a residuos distantes. (A) Modelo de cintas del enzima lisozima, donde se muestran los componentes del centro activo en colores diferentes. (B) Diagrama esquemático de la estructura primaria de la lisozima donde se muestra que el centro activo está formado por residuos que proceden de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica. [Tomado de 6LYZ.pdb.]



2. *El centro activo supone una porción relativamente pequeña del volumen total del enzima.* Muchos de los residuos de aminoácidos de un enzima no están en contacto con el sustrato. Esto plantea la intrigante pregunta de por qué los enzimas son tan grandes. Casi todos los enzimas están constituidos por más de 100 residuos de aminoácidos, lo que les da una masa mayor de 10 kd y un diámetro mayor de 25 Å. Los aminoácidos "extra" sirven como andamiaje para crear el centro activo tridimensional, a partir de los aminoácidos que están alejados en la estructura primaria. Los aminoácidos próximos unos a otros en la estructura primaria a menudo están estéricamente obligados a adoptar las relaciones estructurales necesarias para formar el centro activo. En muchas proteínas los aminoácidos sobrantes constituyen también centros reguladores, centros de interacción con otras proteínas, o conductos para atraer a los sustratos hacia los centros activos.

3. Los centros activos son microentornos únicos. En todos los enzimas de estructura conocida, las moléculas de sustrato quedan ligadas a un hoyo o hendidura de la cual el agua ha quedado normalmente excluida, salvo que sea un componente de la reacción. El microentorno no polar de esta hendidura favorece la unión con el sustrato, así como su catálisis. Además, la hendidura contiene también residuos polares. En el microentorno apolar del centro activo, ciertos residuos polares adquieren propiedades especiales para la unión del sustrato o la catálisis. Las posiciones internas de estos residuos polares son, desde el punto de vista biológico, excepciones a la regla general de que los residuos polares están expuestos al agua.

4. Los sustratos se unen a los enzimas por numerosas fuerzas débiles. Las interacciones no covalentes en los complejos ES son mucho más débiles que los enlaces covalentes, que tienen energías comprendidas entre -210 y -460 kJ mol^{-1} (entre -50 y $-110\text{ kcal mol}^{-1}$). Por el contrario, los complejos ES tienen normalmente constantes de equilibrio que oscilan entre 10^{-2} a 10^{-8} M , que corresponden a energías libres de interacción de unos -13 a -50 kJ mol^{-1} (de -3 a -12 kcal mol^{-1}). Como ya se vio en la Sección 1.3, estas interacciones reversibles débiles entre biomoléculas se realizan por enlaces electrostáticos, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Las fuerzas de van der Waals llegan a ser importantes en la unión sólo cuando varios átomos de sustrato se acercan simultáneamente a varios átomos del enzima. Por consiguiente, el enzima y el sustrato deben tener formas complementarias. El carácter direccional de los puentes de hidrógeno entre el enzima y el sustrato obliga a menudo a un alto grado de especificidad, como se puede ver en la ribonucleasa, un enzima que degrada al RNA (Figura 8.8).

5. La especificidad del enlace depende de la disposición exactamente definida de los átomos del centro activo. Un sustrato debe tener una forma adecuada para introducirse en dicho centro ya que el enzima y el sustrato interactúan por medio de fuerzas de corto alcance que necesitan un contacto cercano. La metáfora establecida en 1890 por Emil Fischer sobre la llave y la cerradura (Figura 8.9) ha demostrado ser muy estimulante y fructífera. Sin embargo está actualmente probado que los enzimas son flexibles y la forma de los centros activos de algunos de ellos se modifica sensiblemente al unirse al sustrato, como fue postulado por Daniel E. Koshland, Jr., en 1958. Los centros activos de estos enzimas tienen formas que son complementarias a la del sustrato solamente *después* de que el sustrato se haya unido. Este proceso de reconocimiento dinámico se denomina *ajuste inducido* (Figura 8.10).

Para la catálisis es importante la energía de unión entre el enzima y el sustrato

Mediante la formación de un gran número de interacciones débiles entre un sustrato y su enzima complementario se libera energía libre. La energía libre liberada en la unión se denomina *energía de unión*. Solamente el sustrato correcto puede participar en la mayoría de las interacciones con el enzima, y de esta manera incrementar la energía de unión, justificando así el hecho de que muchos enzimas manifiestan una especificidad extraordinaria por el sustrato. Además, *sólo cuando el sustrato se encuentra en el estado de transición se genera la complementariedad total en dichas interacciones*. De esta manera, cuando el enzima favorece la formación del estado de transición se libera la energía de unión máxima. La energía liberada por las interacciones entre el enzima y el sustrato permite que la energía

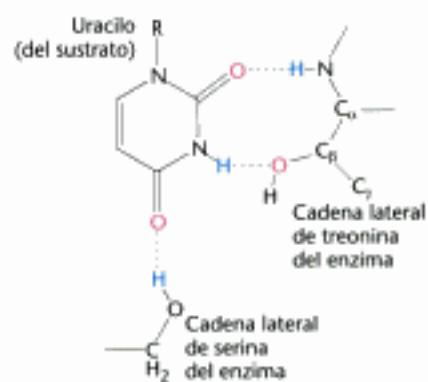


Figura 8.8 Interacciones por puentes de hidrógeno entre el enzima y su sustrato. El enzima ribonucleasa forma puentes de hidrógeno con el anillo de uridina del sustrato. [Tomado de F. M. Richards, H. W. Wyckoff y N. Allewell. En *The Neurosciences: Second Study Program*, F. O. Schmidt, ed. (Rockefeller University Press, 1970 p. 970).]

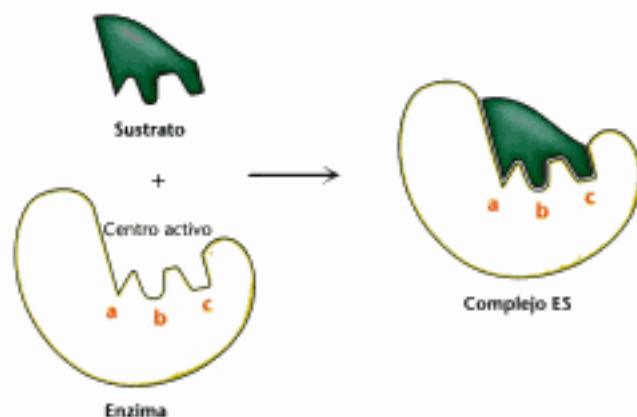


Figura 8.9 Modelo de la llave y la cerradura para la interacción enzima-sustrato. En este modelo, el centro activo del enzima por sí mismo es complementario a la forma del sustrato.

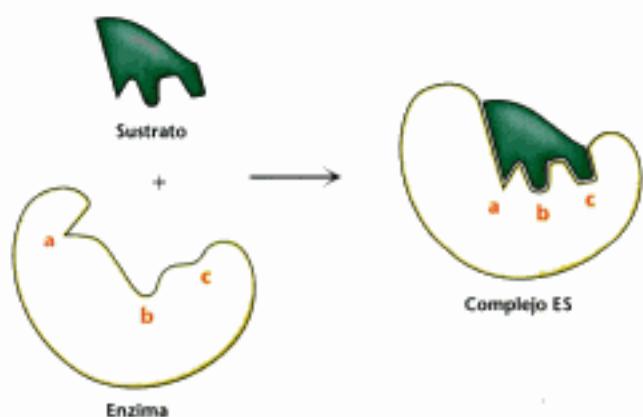


Figura 8.10 Modelo del ajuste inducido para la interacción enzima-sustrato. En este modelo, el enzima cambia de forma en la unión con el sustrato. El centro activo tiene una forma complementaria a la del sustrato solamente después que el sustrato se une a él.

de activación disminuya. Paradójicamente, la mayor interacción estable (energía de unión máxima) tiene lugar entre el enzima y el estado de transición, siendo éste el intermediario de reacción menos estable. Sin embargo, el estado de transición es demasiado inestable para existir durante mucho tiempo, y se transforma bien en sustrato o bien en producto. Únicamente el ΔG de la reacción, es decir, la diferencia de energía entre el sustrato y el producto, determina cuál de los dos componentes se acumula.

8.4 El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchos enzimas

El estudio de la velocidad de las reacciones químicas se denomina *cinética*, y el estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se denomina *cinética enzimática*. Una descripción cinética de la actividad de un enzima nos ayudará a comprender cómo funcionan los enzimas. Comenzaremos examinando brevemente los principios básicos de cinética de las reacciones.

La cinética es el estudio de las velocidades de reacción

¿Qué significa "velocidad" cuando hablamos de una reacción química? Vamos a considerar una reacción sencilla:



La velocidad V es la cantidad de A que desaparece en una unidad de tiempo concreta. Es igual a la velocidad de aparición de P, es decir, la cantidad de P que aparece en una unidad de tiempo concreta.

$$V = -\Delta A / \Delta t = \Delta P / \Delta t \quad (9)$$

Si A es de color amarillo y P es incoloro, podemos seguir el decrecimiento en la concentración de A midiendo la disminución en la intensidad de color amarillo en función del tiempo. Consideraremos en este momento solamente el cambio en la concentración de A. La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de A mediante una constante de proporcionalidad, k , denominada *constante de velocidad*.

$$V = k[A] \quad (10)$$

Las reacciones que son directamente proporcionales a la concentración de reactantes se denominan reacciones de primer orden. La constante de velocidad de primer orden tiene unidades de s^{-1} .

Muchas reacciones bioquímicas importantes incluyen dos reactantes. Por ejemplo



o bien



Se denominan *reacciones bimoleculares* y las ecuaciones de velocidad y tienen con frecuencia la forma

$$V = k[A]^2 \quad (11)$$

$$V = k[A][B] \quad (12)$$

Las constantes de velocidad, llamadas constantes de velocidad de segundo orden, tienen unidades de $M^{-1}s^{-1}$.

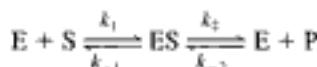
Algunas veces, las reacciones de segundo orden, pueden aparecer como de primer orden. Por ejemplo en la reacción 12, si B está presente en exceso y A está presente a baja concentración, la velocidad de reacción aparecerá como de primer orden con respecto a A. Estas reacciones se denominan *reacciones de pseudo primer orden*, y las veremos múltiples veces en nuestro estudio de la Bioquímica.

De manera interesante, y bajo las mismas condiciones, una reacción puede ser de orden cero. En estos casos, la velocidad es independiente de la concentración de reactantes. Las reacciones catalizadas por enzimas pueden aproximarse a las reacciones de orden cero bajo ciertas circunstancias (p. 219).

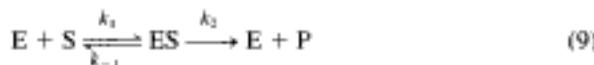
La presunción del estado estacionario facilita una descripción de la cinética del enzima

Para investigar la velocidad de una reacción el método más sencillo es seguir el incremento del producto de la reacción en función del tiempo. La cantidad del producto formado se determina como una función del tiempo para una serie de concentraciones diferentes de sustrato (Figura 8.11). Como se espera, en todos los casos, aumenta la cantidad de producto formado en función del tiempo, hasta alcanzar un punto donde no existen cambios netos en la concentración de S o P. El enzima es aún activo y convierte el sustrato en producto y viceversa. En dicho tiempo se dice que el enzima ha alcanzado el equilibrio de la reacción. Sin embargo, las cinéticas enzimáticas son más fácilmente comprendidas si se considera solamente la reacción directa. Se puede definir la velocidad de la catálisis V_0 como el número de moles de producto formado por segundo cuando la reacción acaba de empezar, esto es, cuando $t = 0$ (ver Figura 8.11). Para muchos enzimas, V_0 varía con la concentración de sustrato, $[S]$, tal y como se muestra en la Figura 8.12. La velocidad de la catálisis aumenta de forma lineal al incrementar la concentración del sustrato y, luego, a mayores concentraciones de sustrato, comienza a aproximarse a un máximo.

En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten propusieron un modelo sencillo que explica estas características cinéticas. El aspecto crítico de su desarrollo es que se necesita un complejo específico ES intermedio en la catálisis. El modelo que propusieron es el más sencillo de los que pueden explicar las propiedades cinéticas de muchos enzimas:



Un enzima E se combina con S para formar un complejo ES con una constante de velocidad k_1 . El complejo ES tiene dos destinos posibles. Puede disociarse hasta E y S con una constante de velocidad k_{-1} , o bien puede continuar hasta formar un producto P con una constante de velocidad k_2 . El complejo ES también puede ser regenerado a partir de E y P mediante la reacción inversa con una constante de velocidad de k_{-2} . Sin embargo, como anteriormente, podemos simplificar estas reacciones, considerando la velocidad de reacción próxima a tiempo cero (es decir, V_0), cuando la formación de producto es insignificante y de esta forma la reacción no revierte ($k_{-2}[P] = 0$).



Así, para la gráfica de la Figura 8.12, V_0 se determina para cada concentración de sustrato midiendo la velocidad de formación de producto a tiempos previos a la acumulación de P (ver Figura 8.11).

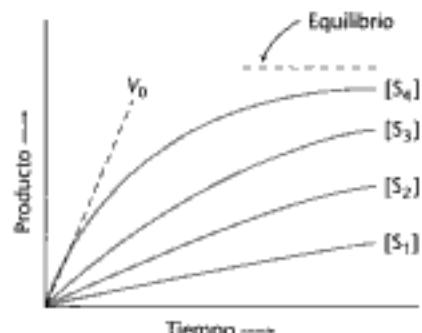


Figura 8.11 Determinación de la velocidad inicial. Se representa la cantidad del producto formado a distintas concentraciones de sustrato en función del tiempo. La velocidad inicial (V_0) para cada concentración de sustrato se determina a partir de la pendiente de la curva al comienzo de la reacción, cuando la reacción inversa es insignificante.

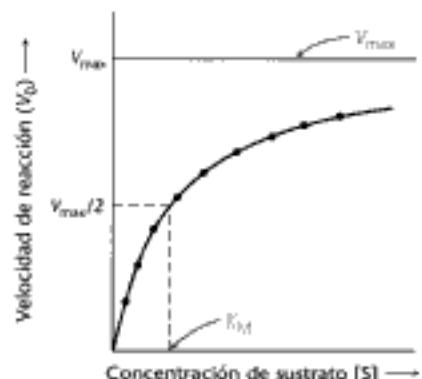


Figura 8.12 Cinéticas Michaelis-Menten. Representación de la velocidad de reacción (V_0) en función de la concentración de sustrato ($[S]$), para un enzima que obedece a la cinética de Michaelis-Menten, donde se muestra que la velocidad máxima (V_{max}) se alcanza de forma aproximadamente asintótica. La constante de Michaelis (K_M) es la concentración de sustrato que produce una velocidad de $V_{\text{max}}/2$.

Necesitamos una expresión que relacione la velocidad de catálisis con las concentraciones de sustrato y enzima y las velocidades de las etapas individuales. Se parte de la base de que la velocidad catalítica es igual al producto de la concentración del complejo ES por k_2 :

$$V_0 = k_2 [ES] \quad (14)$$

Ahora necesitamos expresar ES en función de magnitudes conocidas. Las velocidades de formación y de destrucción de ES vienen dadas por

$$\text{Velocidad de formación de ES} = k_1[E][S] \quad (15)$$

$$\text{Velocidad de destrucción de ES} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (16)$$

Para simplificar esta materia, en 1924 George Briggs y John Haldane sugirieron la presunción del *estado estacionario*. En el estado estacionario, las concentraciones de los intermediarios, en este caso [ES], permanecen invariables, mientras que las concentraciones de los materiales de partida y de los productos van cambiando. Esto ocurre cuando las velocidades de formación y de destrucción del complejo ES son iguales. Igualando las ecuaciones (15) y (16) tenemos

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (17)$$

Si reordenamos la ecuación (1) resulta

$$[E][S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (18)$$

La ecuación (18) puede simplificarse definiendo una nueva constante K_M , denominada *constante de Michaelis*:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (19)$$

Obsérvese que K_M tiene unidades de concentración y es independiente de la concentración del enzima y la del sustrato. Como se ha mencionado (p. 220), la K_M es una característica importante de las interacciones enzima-sustrato.

Sustituyendo la ecuación (18) en (19) y despejando la [ES], resulta

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (20)$$

Ahora examinaremos el numerador de la ecuación (20). La concentración de sustrato no combinado, [S], es casi igual a la concentración total de sustrato, suponiendo que la concentración de enzima sea mucho más baja que la concentración de sustrato. La concentración de enzima no combinado, [E], es igual a la concentración total del enzima menos la concentración del complejo [ES].

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (21)$$

Sustituyendo [E] en la ecuación (20) por esta expresión,

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{K_M} \quad (22)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]/K_M}{1 + [S]/K_M} \quad (23)$$

o bien,

$$[ES] = [E]_T \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (24)$$

Sustituyendo $[ES]$ por esta expresión de la ecuación (14) obtenemos

$$V_0 = k_2[E]_T \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (25)$$

La velocidad máxima V_{\max} se obtiene cuando los centros del enzima están saturados con sustrato es decir, cuando $[ES] = [E]_T$. Así,

$$V_{\max} = k_2[E]_T \quad (26)$$

Sustituyendo la ecuación (26) en la ecuación (25) se obtiene la *ecuación de Michaelis-Menten*

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (27)$$

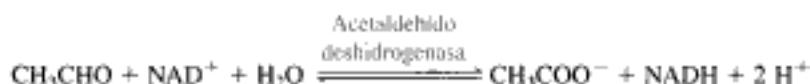
Esta ecuación justifica los datos cinéticos que se representan en la Figura 8.12. A concentraciones muy bajas de sustrato, cuando $[S]$ es mucho menor que K_M , $V_0 = (V_{\max}/K_M)[S]$; es decir, la reacción es de primer orden con la velocidad directamente proporcional a la concentración de sustrato. A concentraciones elevadas de sustrato, cuando $[S]$ es mucho mayor que K_M , $V_0 = V_{\max}$; es decir, la velocidad es máxima. La reacción es de orden cero independiente de la concentración de sustrato.

El significado de K_M resulta evidente en la ecuación (27). Cuando $[S] = K_M$, entonces $V = V_{\max}/2$. Así, K_M es aquella concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción se hace la mitad de su valor máximo. La K_M es una característica importante de una reacción catalizada por un enzima, trascendente para su función biológica.

Las consecuencias fisiológicas de la K_M se ilustran en la sensibilidad al etanol de algunos individuos. Estas personas, después de ingerir incluso pequeñas cantidades de alcohol, muestran rubor facial y aceleración rápida del corazón (taquicardia). En el hígado, la alcohol deshidrogenasa convierte al etanol en acetaldehído.



Normalmente, el acetaldehído, que a altas concentraciones es la causa de los síntomas descritos, se transforma en acetato mediante la acetaldehído deshidrogenasa.



Casi todos tenemos dos formas de acetaldehído deshidrogenasas: una forma mitocondrial de baja K_M y una forma citosólica de alta K_M . En las personas sensibles al alcohol el enzima mitocondrial es menos activo debido a la sustitución de un solo

aminoácido, y por lo tanto el acetaldehído se transforma sólo por el enzima citosólico. Como este enzima tiene una K_M alta, alcanza una velocidad de catálisis elevada sólo a concentraciones muy altas de acetaldehído. En consecuencia, convierte menos cantidad de acetaldehído en acetato. El exceso de acetaldehído pasa a la sangre y así se explican los efectos fisiológicos observados.

Los valores de K_M y V_{max} se determinan mediante diferentes métodos

La constante de Michaelis, K_M , y la velocidad máxima V_{max} , pueden deducirse fácilmente de las velocidades de catálisis a diferentes concentraciones de sustrato, si un enzima opera de acuerdo con el esquema sencillo dado en la ecuación (27). Habitualmente los cálculos para conocer K_M y V_{max} se realizan en un ordenador por medio de diferentes programas de ajuste de curvas. Sin embargo, un método más antiguo y poco utilizado debido a que los datos correspondientes a bajas y altas concentraciones son muy dispares y por ello sensibles al error, constituye una fuente de prospección adicional en el significado de K_M y V_{max} .

Antes de disponer de ordenadores, la determinación de los valores de K_M y V_{max} requería una manipulación algebraica de la ecuación de Michaelis-Menten. Debido a que la V_{max} es aproximadamente asintótica (ver Figura 8.12), es imposible obtener un valor definitivo mediante la representación típica de Michaelis-Menten. Como la K_M es la concentración de sustrato a la velocidad mitad de la máxima, $V_{max}/2$, también resulta imposible determinar un valor exacto de K_M . Sin embargo, la V_{max} se puede determinar con exactitud si la ecuación de Michaelis-Menten se transforma en otra que proporcione una representación lineal. Si tomamos la recíproca en ambos miembros de la ecuación (27):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (28)$$

Una representación de $1/V_0$ frente a $1/[S]$, llamada de *Lineweaver-Burk o representación doble recíproca*, genera una línea recta con una intersección con eje y de $1/V_{max}$ y una pendiente de K_M/V_{max} (Figura 8.13). La intersección con el eje x es $-1/K_M$.

Los valores de K_M y V_{max} son características importantes de los enzimas

Los valores de K_M de los enzimas varían ampliamente (Tabla 8.4). Para la mayoría de los enzimas K_M varía entre 10^{-1} y 10^{-7} M. El valor de K_M para un enzima depende de cada sustrato particular y también de las condiciones ambientales, tales como pH, temperatura y fuerza iónica. La constante de Michaelis, K_M , tiene dos significados. Primero, K_M es la concentración de sustrato a la cual la mitad de los centros activos están ocupados. Así, K_M proporciona una medida de la concentración de sustrato necesaria para que tenga lugar una catálisis significativa. De hecho, para muchos enzimas, las evidencias experimentales sugieren que la K_M proporciona una aproximación *in vivo* de la concentración de sustrato.

Segundo, K_M se relaciona con la constante de velocidad de las etapas individuales en el esquema catalítico representado en la ecuación (13). De acuerdo con la ecuación (19), K_M se define como $(k_{-1} + k_2)/k_1$. Consideremos un caso límite en el cual k_{-1} es mucho mayor que k_2 . Esto significa que la disociación del complejo ES hacia E y S es mucho más rápida que la formación de producto. En estas condiciones ($k_{-1} \gg k_2$),



Figura 8.13 Representación doble recíproca o de Lineweaver-Burk. Una representación doble recíproca de la cinética de un enzima se genera representando $1/V_0$ en función de $1/[S]$. La pendiente es K_M/V_{max} , la intersección con el eje vertical es $1/V_{max}$ y la intersección con el eje horizontal es $-1/K_M$.

TABLA 8.4 Valores de la K_M de algunos enzimas

Enzima	Sustrato	K_M (μM)
Quimotripsina	Acetil-L-triptofanamida	5000
Lisozima	Hexa-N-acetilglucosamina	6
β-Galactosidasa	Lactosa	4000
Treonina desaminasa	Treonina	5000
Anhidrasa carbónica	CO ₂	8000
Penicilinasa	Bencilpenicilina	50
Piruvato carboxilasa	Piruvato	400
	HCO ₃ ⁻	1000
	ATP	60
Arginina-tRNA sintetasa	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (29)$$

La ecuación (29) describe la constante de disociación del complejo ES.

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (30)$$

En otras palabras, K_M es igual a la constante de disociación del complejo ES, si k_2 es mucho menor que k_{-1} . En estas condiciones, K_M es la medida de la estabilidad del complejo enzima sustrato (ES): una K_M baja indica una unión fuerte. Debe subrayarse que K_M indica la afinidad del complejo ES solamente cuando k_{-1} es mucho mayor que k_2 .

La velocidad máxima, V_{max} , revela el número de recambio de un enzima, que es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima cuando éste está totalmente saturado de sustrato. Es igual a la constante cinética k_2 , también llamada k_{cat} . La velocidad máxima, V_{max} , revela el número de recambio de un enzima si se conoce la concentración de centros activos $[E]_T$, porque

$$V_{max} = k_2 [E]_T \quad (31)$$

y así,

$$k_2 = V_{max} / [E]_T \quad (32)$$

Por ejemplo, una disolución de anhidrasa carbónica 10^{-6} M cataliza, cuando está completamente saturada de sustrato, la formación de $0,6$ M de H_2CO_3 por segundo. De aquí resulta que k_2 es 6×10^5 s $^{-1}$. Este número de recambio es uno de los mayores conocidos. Cada ciclo catalítico tiene lugar en un tiempo igual a $1/k_2$ que es 1,7 microsegundos para la anhidrasa carbónica. Los números de recambio de la mayoría de los enzimas para sustratos fisiológicos oscilan entre 1 y 10^4 por segundo (Tabla 8.5).

K_M y V_{max} permiten también la determinación de la fracción de centros activos ocupados, f_{ES} . Esta relación de f_{ES} con K_M y V_{max} viene dada por la ecuación siguiente:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (33)$$

El criterio k_{cat}/K_M es una medida de la eficiencia catalítica

Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que K_M , la velocidad de catálisis es igual a k_{cat} , el número de recambio, tal como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la mayoría de los enzimas no están habitualmente saturados de sustrato. En condiciones fisiológicas, la razón $[S]/K_M$ suele estar comprendida entre 0,01 y 1,0. Cuando $[S] \ll K_M$, la velocidad enzimática es mucho menor que k_{cat} , porque la mayor parte de los centros activos no están ocupados. ¿Hay algún parámetro adecuado para precisar la cinética enzimática en estas condiciones? Ciertamente lo hay, como se ve en si se combinan las ecuaciones (14) y (20):

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E][S] \quad (34)$$

TABLA 8.5 Números de recambio máximos de algunos enzimas

Enzima	Número de recambio (por segundo)
Anhidrasa carbónica	600 000
3-Cetosteroide isomerasa	280 000
Acetilcolinesterasa	25 000
Penicilinasa	2000
Lactato deshidrogenasa	1000
Quimotripsina	100
DNA polimerasa I	15
Triptófano sintetasa	2
Lisozima	0,5

TABLA 8.6 Preferencias de la quimotripsina por los sustratos

Aminoácido en enlace éster	Cadena lateral de aminoácido	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Glicina	—H	$1,3 \times 10^{-1}$
Valina	—CH ₂ CH ₃	2,0
Norvalina	—CH ₂ CH ₂ CH ₃	$3,6 \times 10^2$
Norleucina	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	$3,0 \times 10^3$
Fenilalanina	—CH ₂ —C ₆ H ₅	$1,0 \times 10^5$

Tomada de A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Tabla 7.3.

Cuando $[S] \ll K_M$, la concentración de enzima libre, $[E]$, es aproximadamente igual a la concentración total del enzima $[E]_T$, y así

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [S][E]_T \quad (35)$$

Por consiguiente, cuando $[S] \ll K_M$, la velocidad enzimática depende del valor de k_{cat}/K_M , $[S]$, y $[E]_T$. En estas condiciones, k_{cat}/K_M es la constante de velocidad para la interacción de S y E, y se puede utilizar como una medida de la eficiencia catalítica, porque considera tanto la velocidad de la catálisis (k_{cat}) como la fuerza de la interacción enzima–sustrato (K_M). Por ejemplo, utilizando los valores k_{cat}/K_M se puede comparar la preferencia de un enzima por diferentes sustratos. La Tabla 8.6 muestra los valores de k_{cat}/K_M para diferentes sustratos de la quimotripsina. La quimotripsina tiene claramente preferencia para llevar a cabo rupturas en puntos próximos a cadenas laterales hidrofóbicas.

¿Qué eficacia puede tener un enzima? Podemos abordar esta cuestión determinando si existe algún límite físico al valor de k_{cat}/K_M . Observe que esta relación depende de k_1 , k_{-1} y k , como se demuestra sustituyendo K_M .

$$k_{cat}/K_M = \frac{k_{cat} k_1}{k_{-1} + k_{cat}} = \left(\frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}} \right) k_1 < k_1 \quad (36)$$

Supongamos que la velocidad de formación de producto (k_{cat}) es mucho más rápida que la velocidad de disociación del complejo ES (k_{-1}). En este caso el valor de k_{cat}/K_M se aproxima a k_1 . Así; el límite más alto del valor de k_{cat}/K_M lo establece k_1 , la velocidad de formación del complejo ES. Esta velocidad no puede superar la velocidad de encuentro del enzima y el sustrato, controlada por la difusión. La difusión limita el valor de k_1 , de modo que no puede superar cifras de 10^8 a $10^9 s^{-1} M^{-1}$. En consecuencia, el límite máximo de k_{cat}/K_M , está comprendido entre 10^8 y $10^9 s^{-1} M^{-1}$.

La razón k_{cat}/K_M de ciertos enzimas, tales como superóxido dismutasa, acetilcolinesterasa y triosafosfato isomerasa está comprendida entre 10^8 y $10^9 s^{-1} M^{-1}$. Enzimas como estos, que tienen la razón k_{cat}/K_M en el límite máximo, han alcanzado una *perfección cinética. Su velocidad catalítica sólo está limitada por la velocidad a la que se encuentran sus sustratos en la disolución* (Tabla 8.7). Cualquier aumento en la velocidad catalítica sólo podría conseguirse disminuyendo el tiempo de difusión. Recordar que el centro activo es sólo una parte pequeña de la estructura total del enzima. Sin embargo, para enzimas catalíticamente perfectas, resulta productivo

TABLA 8.7 Enzimas con valores de k_{cat}/K_M próximos a la velocidad de difusión controlada para el encuentro con el sustrato

Enzima	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Acetilcolinesterasa	$1,6 \times 10^8$
Anhidrasa carbónica	$8,3 \times 10^7$
Catalasa	4×10^7
Crotonasa	$2,8 \times 10^8$
Fumarasa	$1,6 \times 10^8$
Triosa fosfato isomerasa	$2,4 \times 10^8$
β -Lactamasa	1×10^8
Superóxido dismutasa	7×10^9

Tomado de A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Tabla 4.5.

cada encuentro entre el enzima y el sustrato. En estos casos, en el enzima existen fuerzas electrostáticas atractivas que arrastran al sustrato hacia el centro activo. Estas fuerzas se denominan algunas veces poéticamente como *efecto Circe*.

El límite impuesto por la velocidad de difusión en el medio puede superarse parcialmente secuestrando los sustratos y los productos en el espacio limitado del complejo multienzimático. De hecho, existen series de enzimas asociados a estructuras organizadas, de modo que el producto de reacción de un enzima se encuentra rápidamente con el siguiente enzima. En efecto, los productos son canalizados de un enzima al siguiente como en una cadena de montaje.

La mayoría de las reacciones bioquímicas incluye múltiples sustratos

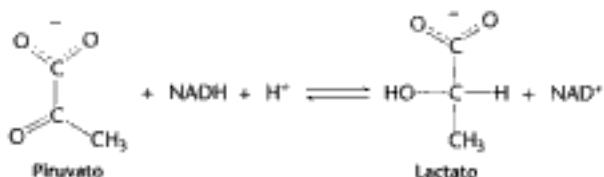
La mayor parte de las reacciones en los sistemas biológicos incluyen normalmente dos sustratos y dos productos, y se representan mediante la reacción bisustrato:



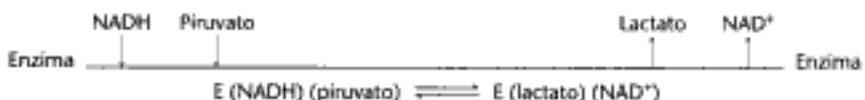
La mayoría de estas reacciones supone la transferencia de un grupo funcional, como un grupo fosforilo o amonio, desde un sustrato al otro. En las reacciones de oxidación-reducción, los electrones se transfieren entre sustratos. Las reacciones de múltiples sustratos se dividen en dos clases: *desplazamiento secuencial* y *desplazamiento doble*.

Desplazamiento secuencial. En la reacción secuencial, todos los sustratos se unen al enzima antes de que se libere cualquier producto. Consecuentemente, en una reacción bisustrato se forma un *complejo ternario* entre el enzima y ambos sustratos. Existen dos tipos de mecanismos secuenciales: ordenado, cuando el sustrato se une al enzima en una secuencia definida, y al azar.

Muchos enzimas que tienen como sustrato NAD^+ o NADH manifiestan un mecanismo secuencial ordenado. Consideremos la lactato deshidrogenasa, un enzima importante en el metabolismo de la glucosa (p. 447). Este enzima reduce el piruvato a lactato mientras oxida el NADH a NAD^+ .



En el mecanismo secuencial ordenado, el coenzima se une siempre primero y el lactato se libera siempre el primero. Esta secuencia se representa como sigue, en una notación desarrollada por W. Wallace Cleland:



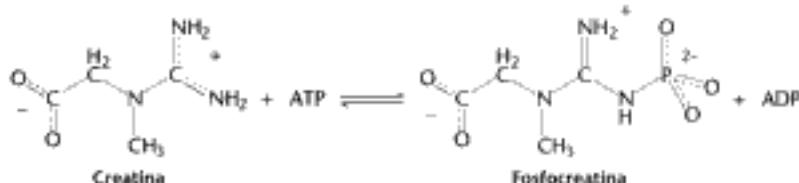
El enzima se estructura como un complejo ternario: primero, comprende al enzima y los sustratos y, después de la catálisis, al enzima y los productos.

En el mecanismo secuencial al azar, el orden de adición de sustratos y la liberación de los productos es al azar. Las reacciones secuenciales al azar se ilustran con la reacción de la creatina quinasa (p. 416), donde se forma fosfocreatina y ADP a partir de ATP y creatina.

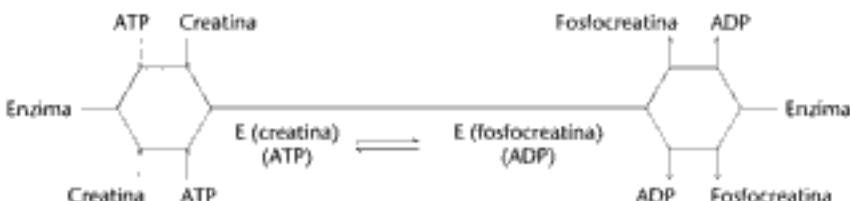
Efecto Circe

Fue propuesto por William P. Jencks, un enzimólogo que acuñó el término para definir la utilización de las fuerzas atractivas como señuelo para que un sustrato entre en el centro activo de un enzima, el cual sufre una transformación de su estructura.

Circe, diosa de la mitología griega, atrajo con engaños a los hombres de Ulises a su casa, donde los transformó en cerdos.

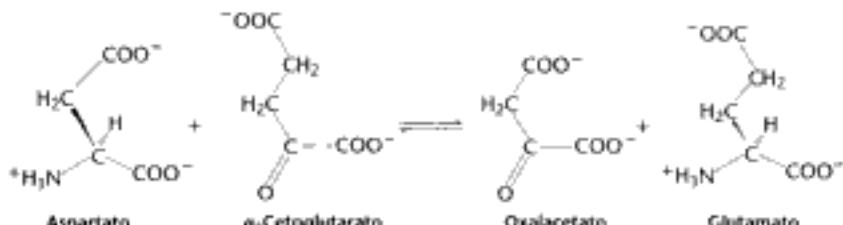


Tanto la creatina como el ATP se puede unir primero, y posteriormente se puede liberar en primer lugar la fosfocreatina o el ADP. La fosfocreatina es una importante fuente de energía en el músculo. Las reacciones secuenciales al azar también pueden representarse en la notación de Cleland.

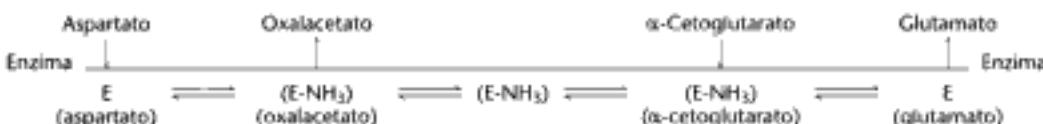


Aunque el orden de ciertos sucesos es al azar, la reacción también pasa a través de complejos terciarios, que incluyen primero a los sustratos y después a los productos.

Reacciones de doble desplazamiento (ping-pong). En las reacciones de doble desplazamiento o ping-pong, uno o más productos se liberan antes de que todos los sustratos se unan al enzima. La característica definitiva de las reacciones de doble desplazamiento es la existencia de un *intermediario del enzima sustituido*, en el cual el enzima se modifica temporalmente. Las reacciones que transfieren grupos amino entre aminoácidos y α -cetoácidos son ejemplos clásicos de mecanismos de doble desplazamiento. El enzima aspartato aminotransferasa (p. 659) cataliza la transferencia de un grupo amino desde el aspartato al α -cetoglutarato.



La secuencia de sucesos se puede describir en el diagrama siguiente.



Después de que el aspartato se une al enzima, éste separa el grupo amino del aspartato para formar un intermediario del enzima sustituido. Posteriormente, sale el primer producto: el oxalacetato. El α -cetoglutarato, el segundo sustrato, se une al enzima, acepta el grupo amino del enzima modificado y después libera glutamato, el producto final. En la notación de Cleland, los sustratos aparecen botar dentro y fuera del enzima análogamente a una pelota de ping-pong rebotando sobre una mesa.

Los enzimas alostéricos no siguen la cinética de Michaelis-Menten

El modelo de Michaelis-Menten ha tenido una gran influencia sobre el desarrollo de la enzimología. Sus virtudes radican en su sencillez y amplia aplicabilidad. Sin embargo, las propiedades cinéticas de muchos enzimas no pueden explicarse por el mo-

délo de Michaelis-Menten. Un importante grupo está formado por los enzimas alostéricos que no siguen una cinética de tipo Michaelis-Menten. Estos enzimas contienen múltiples subunidades y múltiples centros activos.

Los enzimas alostéricos a menudo muestran curvas sigmoides (Figura 8.14) de la velocidad de reacción, V_0 , frente a la concentración de sustrato [S], en vez de las gráficas hiperbólicas previstas por la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 27). En los enzimas alostéricos, la unión de un sustrato a un centro activo de la molécula enzimática puede afectar a las propiedades de otro centro activo de la misma molécula del enzima. Una posible consecuencia de esta interacción entre subunidades es que la unión del sustrato se transforme en cooperativa; es decir, la unión del sustrato a un centro activo del enzima facilita la unión del sustrato a otros centros activos. Como consideraremos para la hemoglobina (Capítulo 7), tal cooperatividad tiene por resultado una representación sigmoidal de V_0 frente a la [S]. Además, la actividad de un enzima alostérico se puede modificar por moléculas reguladoras que se unen reversiblemente a otros centros específicos diferentes de los centros catalíticos. Las propiedades catalíticas de los enzimas alostéricos, de este modo, pueden adaptarse para satisfacer las necesidades inmediatas de la célula (Capítulo 10). Por esta razón, los enzimas alostéricos son llaves reguladoras de las vías metabólicas.

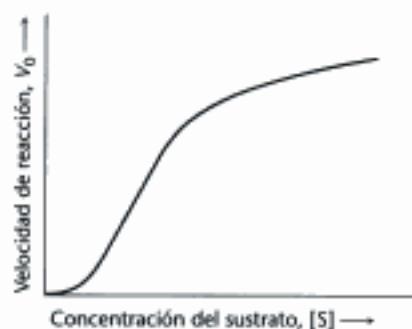


Figura 8.14 Cinética de un enzima alostérico. Dependencia sigmoidal de la velocidad de reacción frente a la concentración del sustrato en un enzima alostérico.

8.5 Los enzimas pueden inhibirse mediante moléculas específicas

La actividad de muchos enzimas puede inhibirse por la unión de moléculas pequeñas e iones. Esta forma de inhibición de la actividad enzimática constituye el principal mecanismo de control de los sistemas biológicos. La regulación de los enzimas alostéricos representa este tipo de control. También muchos fármacos y agentes tóxicos actúan inhibiendo a los enzimas (Capítulo 35). Es más, la inhibición enzimática por moléculas químicas concretas puede proporcionar ideas acerca del mecanismo de la acción enzimática: pueden a menudo identificarse residuos importantes para la catálisis empleando inhibidores específicos. Los análogos del estado de transición son inhibidores especialmente potentes.

La inhibición enzimática puede ser tanto reversible como irreversible. En la *inhibición irreversible* el inhibidor queda, covalentemente o no, unido al enzima o ligado tan fuertemente a él que su disociación es muy lenta. Algunos inhibidores irreversibles son importantes fármacos. La penicilina actúa modificando covalentemente al enzima transpeptidasa impidiendo por lo tanto la síntesis de las paredes celulares bacterianas, y matando así a las bacterias (p. 232). La aspirina actúa modificando covalentemente al enzima ciclooxigenasa reduciendo así la síntesis de señales inflamatorias (p. 339).

La *inhibición reversible* se caracteriza, por contraste con la inhibición irreversible, por la rápida disociación del complejo enzima-inhibidor. En la *inhibición competitiva*, el enzima puede unirse al sustrato (formando un complejo ES) o al inhibidor (EI) pero no a ambos (ESI). Muchos inhibidores competitivos se parecen al sustrato y se unen al centro activo del enzima (Figura 8.15). De este modo, se impide la unión del sustrato al mismo centro activo. *Un inhibidor competitivo disminuye la velocidad de catálisis reduciendo la proporción de moléculas de enzima que quedan ligadas al sustrato.* La inhibición competitiva, a una concentración dada de inhibidor, puede contrarrestarse si se aumenta la concentración de sustrato. En estas

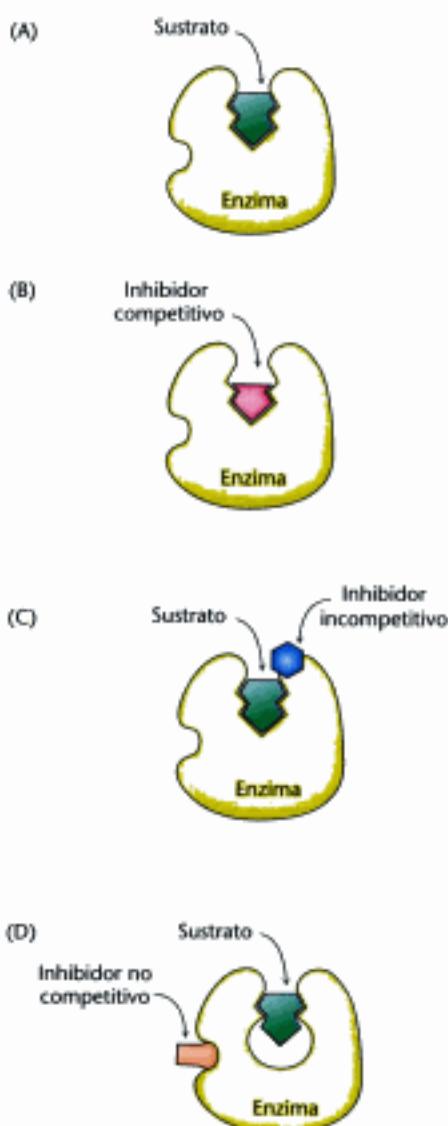


Figura 8.15 Diferencias entre inhibidores reversibles. (A) Complejo enzima-sustrato; (B) un inhibidor competitivo se une al centro activo e impide la unión del sustrato; (C) un inhibidor in competitivo se une únicamente al complejo enzima-sustrato; (D) un inhibidor no competitivo no impide la unión del sustrato.

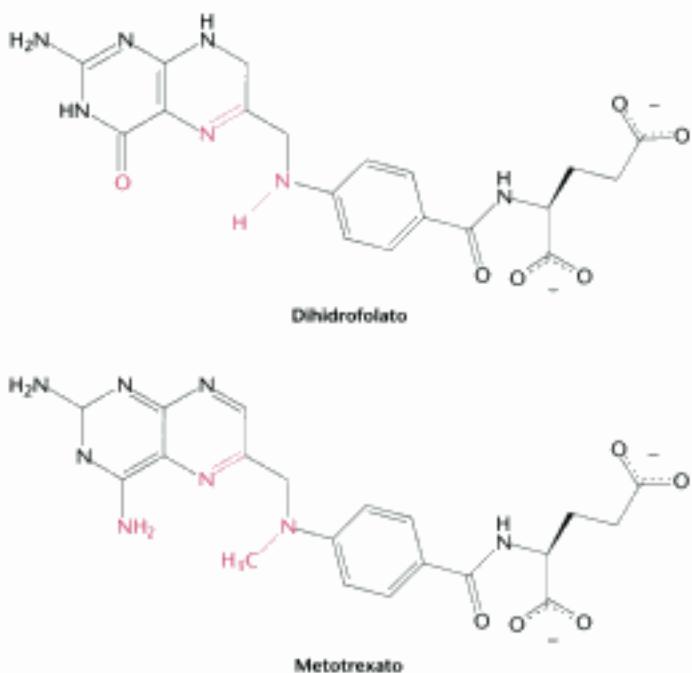


Figura 8.16 Inhibidores de enzimas. Se muestra el cofactor dihidrofolato y su análogo estructural metotrexato. Las regiones con diferencias estructurales se indican en rojo.

condiciones, el sustrato gana la competición contra el inhibidor por el centro activo. El metotrexato es un inhibidor competitivo muy fuerte del enzima dihidrofolato reductasa, que desempeña un papel importante en la biosíntesis de purinas y pirimidinas (Figura 8.16). Inhibe la síntesis de bases nucleotídicas porque se une a la dihidrofolato reductasa con una fuerza 1000 veces mayor que el sustrato natural, el dihidrofolato. El metotrexato se utiliza en el tratamiento del cáncer.

La *inhibición incompetitiva* se diferencia por el hecho de que el inhibidor se une solamente al complejo enzima-sustrato. El lugar de unión de inhibidor incompetitivo se crea solamente cuando se genera la interacción entre el enzima y el sustrato (ver Figura 8.15C). La inhibición incompetitiva no puede superarse mediante la adición de más cantidad de sustrato.

En la *inhibición no competitiva*, que también es reversible, el inhibidor y el sustrato pueden unirse simultáneamente a una molécula de enzima en diferentes centros de unión (ver Figura 8.15D). Un inhibidor no competitivo actúa disminuyendo el número de recambio del enzima, en vez de disminuir la proporción de moléculas enzimáticas que se han ligado al sustrato. La inhibición no competitiva, por contraste con la inhibición competitiva, no puede superarse al aumentar la concentración de sustrato. Se producen otros tipos de inhibición más complejos incluidos en la *inhibición mixta*, cuando el inhibidor impide la unión del sustrato y disminuye el número de recambio del enzima.

Los inhibidores reversibles se distinguen cinéticamente

¿Cómo podemos determinar si un inhibidor reversible actúa mediante inhibición competitiva o no competitiva? Consideraremos sólo los enzimas que muestran una cinética de tipo Michaelis-Menten. Las medidas de velocidades de catálisis a diferentes concentraciones de sustrato e inhibidor sirven para distinguir entre la inhibición competitiva y la no competitiva. En la inhibición competitiva, el inhibidor compite por el centro activo con el sustrato. La constante de disociación para el inhibidor viene dada por

$$K_i = [E][I]/[EI]$$

La inhibición es más potente cuando más pequeño sea el valor de K_i . La característica fundamental de la inhibición competitiva es que ésta puede ser superada a concentraciones suficientemente elevadas de sustrato (Figura 8.17). El efecto de un inhibidor competitivo consiste en aumentar el valor aparente K_M , es decir, para obtener la misma velocidad de reacción se necesita más cantidad de sustrato. Este nuevo valor de K_M , llamado $K_{M,i}$, es numéricamente igual a

$$K_{M,i}^0 = K_M(1 + [I]/K_i)$$

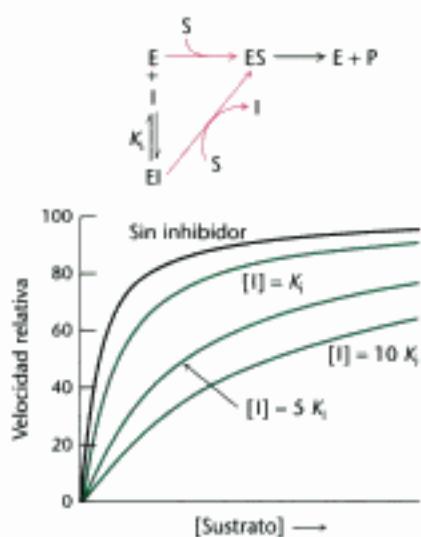


Figura 8.17 Cinética de un inhibidor competitivo. Cuando la concentración de inhibidor competitivo aumenta, para alcanzar una velocidad de reacción determinada se necesitan concentraciones de sustrato superiores. La propia secuencia de la reacción sugiere la concentración suficientemente alta de sustrato que puede suprimir completamente la inhibición competitiva.

donde $[I]$ es la concentración del inhibidor y K_i es la constante de disociación para el complejo enzima-inhibidor. El enzima tendrá la misma V_{max} en presencia de un inhibidor competitivo, como en su ausencia. Para que un enzima sea totalmente funcional, prácticamente todos los centros activos deben estar ocupados por el sustrato, lo cual sucede a una concentración suficientemente alta del mismo.

Los inhibidores competitivos se utilizan habitualmente como fármacos. Ya se ha citado que el ibuprofeno es un inhibidor competitivo de la ciclooixigenasa, enzima

que tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria. Las estatinas son fármacos que reducen los niveles de colesterol elevados, inhibiendo competitivamente a un enzima clave en la biosíntesis de colesterol (p. 339).

En la inhibición incompetitiva, el inhibidor se une solamente al complejo ES. Este complejo inhibidor-sustrato-enzima no progresará hacia la formación de producto. Ya que los complejos ESI improductivos están siempre presentes, la V_{max} en presencia de inhibidor será más pequeña que en su ausencia (Figura 8.18). En presencia del inhibidor incompetitivo disminuye la K_M , aparentando como si el enzima adquiriese una afinidad mayor para el sustrato. ¿Cuál es la causa de esa aparente disminución en la K_M ?

Cuando el inhibidor agota la concentración de ES formando ESI, la reacción de unión del sustrato prosigue para formar más ES. Este efecto aumenta la k_1 y así disminuye el valor aparente de K_M . El herbicida glicofosfato, también llamado Roundup, es un inhibidor incompetitivo de un enzima de la vía biosintética de los aminoácidos aromáticos.

En la *inhibición no competitiva* (Figura 8.19) el sustrato aún puede unirse al complejo enzima-inhibidor. Sin embargo, el complejo enzima-inhibidor-sustrato *no* prosigue para formar producto. El valor de V_{max} disminuye a un nuevo valor llamado V_{max}^{NP} mientras que el valor de K_M no cambia. En presencia de un inhibidor no competitivo puro la velocidad máxima, V_{max}^{NP} , viene dada por

$$V_{max}^{NP} = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i} \quad (37)$$

¿Por qué disminuye V_{max} mientras K_M permanece igual? En esencia, el inhibidor disminuye simplemente la concentración del enzima funcional. El enzima remanente equivale a una disolución de enzima más diluida. La *inhibición no competitiva no puede superarse incrementando la concentración de sustrato*. El antibiótico desoxiciclina a bajas concentraciones funciona como un inhibidor no competitivo de un enzima proteolítico (colagenasa) que se utiliza para tratar las enfermedades periodontales. Los efectos tóxicos del envenenamiento por plomo se deben a la capacidad del plomo para actuar como un inhibidor no competitivo de una multitud de enzimas, en los que el plomo reacciona con grupos sulfidrilo cruciales.

Las representaciones doble recíproca se utilizan especialmente para distinguir entre inhibidores competitivos, incompetitivos y no competitivos. En la inhibición competitiva, la intersección con el eje y de la representación de $1/V_0$ frente a $1/[S]$ es la

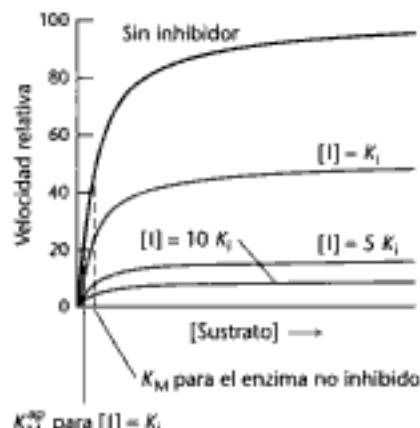
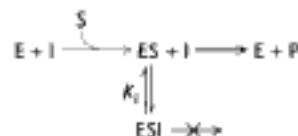


Figura 8.18 Cinética de un inhibidor incompetitivo. La secuencia de la reacción muestra que el inhibidor se une sólo al complejo enzima-sustrato. Por lo tanto, incluso a altas concentraciones de sustrato, no se puede alcanzar la V_{max} . El valor aparente de K_M disminuye, llegando a ser más pequeño cuando se añade más inhibidor.

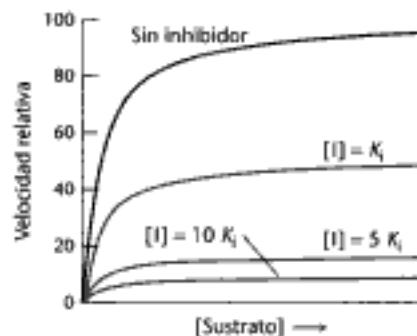
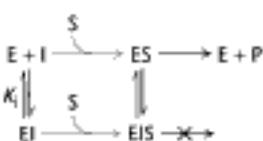


Figura 8.19 Cinética de un inhibidor no competitivo. La secuencia de la reacción muestra que el inhibidor se une tanto al enzima libre como al complejo del enzima. Por lo tanto, la K_M permanece inalterada, y por lo tanto, la velocidad de reacción a bajas concentraciones de sustrato aumenta más lentamente que en el caso de la competición incompetitiva y no se puede alcanzar V_{max} .

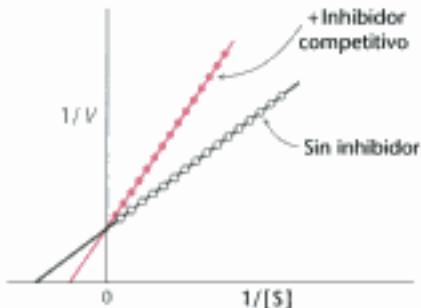


Figura 8.20 Representación doble recíproca para ilustrar la inhibición competitiva. La representación doble recíproca de la cinética enzimática en presencia y ausencia de un inhibidor competitivo muestra que la V_{max} no se altera, mientras que la K_M aumenta.

misma en presencia que en ausencia de inhibidor, aunque la pendiente aumenta (Figura 8.20). Dicha intersección es invariable ya que el inhibidor competitivo no modifica la V_{max} . El aumento en la pendiente de la representación de $1/V_0$ frente al $1/[S]$ indica la intensidad en la unión del inhibidor competitivo. En presencia de un inhibidor competitivo, la ecuación (28) se sustituye por

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) \quad (38)$$

En otras palabras, la pendiente de la gráfica aumenta por el factor $(1 + [I]/K_i)$ en presencia de un inhibidor competitivo. Consideremos un enzima con un valor de K_M de 10^{-4} M. En ausencia de inhibidor, $V_0 = V_{max}/2$, cuando $[S] = 10^{-4}$ M. En presencia de 2×10^{-3} M de un inhibidor competitivo que se une al enzima con un K_i de 10^{-3} M, la K_M aparente ($K_{M,app}$) será igual a $K_M \times (1 + [I]/K_i)$, 6.3×10^{-4} M. La sustitución de estos valores en la ecuación (37) da $V_0 = V_{max}/4$, cuando $[S] = 10^{-4}$ M. Así pues, la presencia del inhibidor competitivo reduce la velocidad de la reacción a la mitad a esa concentración de sustrato.

En la inhibición incompetitiva (Figura 8.21), el inhibidor se combina solamente con el complejo enzima-sustrato. Para un inhibidor incompetitivo, la ecuación que describe la representación doble recíproca es

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (39)$$

La pendiente de la recta K_M/V_{max} , es la misma que para el enzima no inhibido, mientras que la intersección con el eje y aumentará en $1 + [I]/K_i$. Por lo tanto, en la representación doble recíproca las rectas serán paralelas.

En la inhibición no competitiva (Figura 8.22), el inhibidor se combina bien con el enzima o bien con el complejo enzima-sustrato. En la inhibición no competitiva pura, los valores de las constantes de disociación del inhibidor y el enzima, y del inhibidor y el complejo enzima-sustrato son iguales. El valor de V_{max} disminuye a un nuevo valor llamado V_{max}^{app} , y por lo tanto la intersección con el eje vertical aumenta. La nueva pendiente, igual a K_M/V_{max}^{app} , se agranda en el mismo factor. Por el contrario a lo que sucede con V_{max} , la K_M no se modifica en la inhibición no competitiva pura.

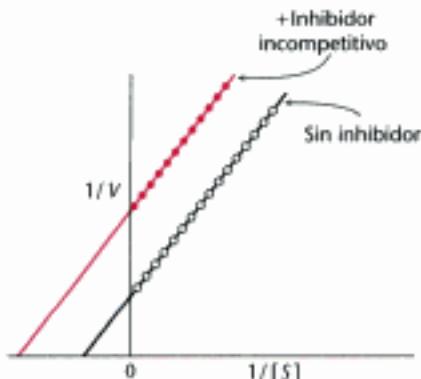


Figura 8.21 Representación doble recíproca para ilustrar la inhibición competitiva. Un inhibidor incompetitivo no altera la pendiente de la representación doble recíproca. V_{max} y K_M disminuyen en cantidades equivalentes.

Los inhibidores irreversibles se pueden utilizar para trazar el mapa del centro activo

Examinaremos los detalles químicos acerca de cómo funcionan los enzimas en el Capítulo 9. El primer paso para conocer el mecanismo químico de un enzima es determinar los grupos funcionales que se necesitan para la actividad enzimática. ¿Cómo podemos identificar a esos grupos funcionales? Una aproximación al enzima unido

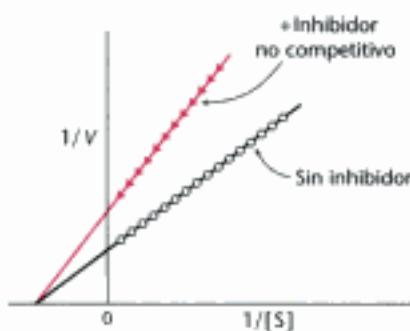


Figura 8.22 Representación doble recíproca para ilustrar la inhibición no competitiva. La representación doble recíproca de la cinética enzimática en presencia y ausencia de un inhibidor no competitivo muestra que la K_M no se altera y la V_{max} disminuye.

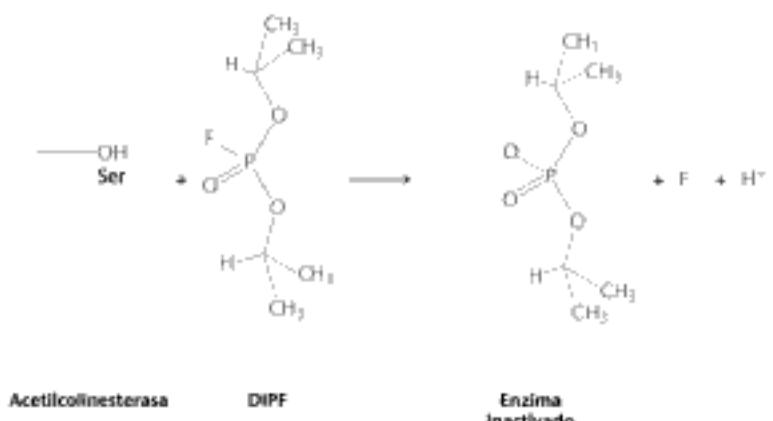


Figura 8.23. Inhibición enzimática por disopropilfosfofluoridato (DIPF), un reactivo específico de grupo. El DIPF inhibe al enzima mediante la modificación covalente de un residuo de serina decisivo.

a su sustrato la proporciona la cristalografía de rayos X. Los inhibidores irreversibles que se unen covalentemente a los enzimas son una alternativa a menudo complementaria para la averiguación de los grupos funcionales del centro activo del enzima, ya que modifican a esos grupos funcionales, que después pueden identificarse. Los inhibidores irreversibles se dividen en tres categorías: reactivos específicos de grupo, análogos del sustrato también llamados marcadores de afinidad e inhibidores suicidas.

Los reactivos específicos de grupo reaccionan con cadenas laterales específicas de los aminoácidos. Dos ejemplos de reactivos específicos de grupo son el diisopropilfosfofluoridato (DIPF; Figura 8.23) y la yodoacetamida (Figura 8.24). El DIPF modifica sólo 1 de los 28 residuos de serina en el enzima proteolítico quimotripsina, lo cual da a entender que este residuo de serina es especialmente reactivo. Como veremos en el Capítulo 9, este residuo de serina se encuentra efectivamente en el centro activo. El DIPF también reveló una serina reactiva en la acetilcolinesterasa, un enzima importante en la transmisión del impulso nervioso (ver Figura 8.23). Así, el DIPF y otros compuestos similares que unen e inactivan a la acetilcolinesterasa son gases nerviosos potentes.

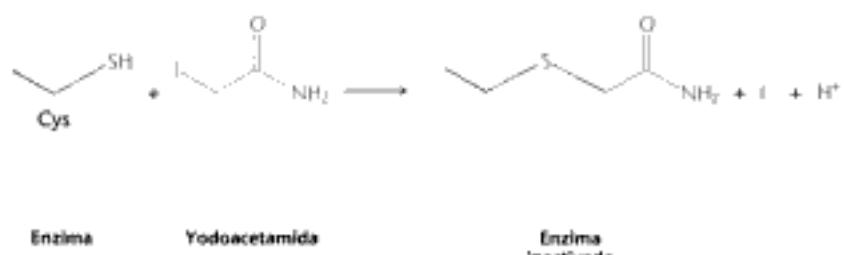


Figura 8.24. Inactivación de enzimas por yodoacetamida, un reactivo específico de grupo. La yodoacetamida reacciona con residuos de cisteína críticos e inactiva al enzima.

Los marcadores de afinidad, o análogos reactivos del sustrato, son moléculas estructuralmente similares al sustrato del enzima que modifican covalentemente los residuos del centro activo. De este modo, son más específicos para el centro activo del enzima que los reactivos específicos de grupo. La tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK) es un análogo del sustrato para la quimotripsina (Figura 8.25). La TPCK se une al centro activo e inhibe al enzima ya que reacciona irreversiblemente con un residuo de histidina en dicho centro. El compuesto 3-bromoacetal fosfato es un marcador de afinidad para el enzima triosa fosfato isomerasa (TPI). Imita al sustrato del

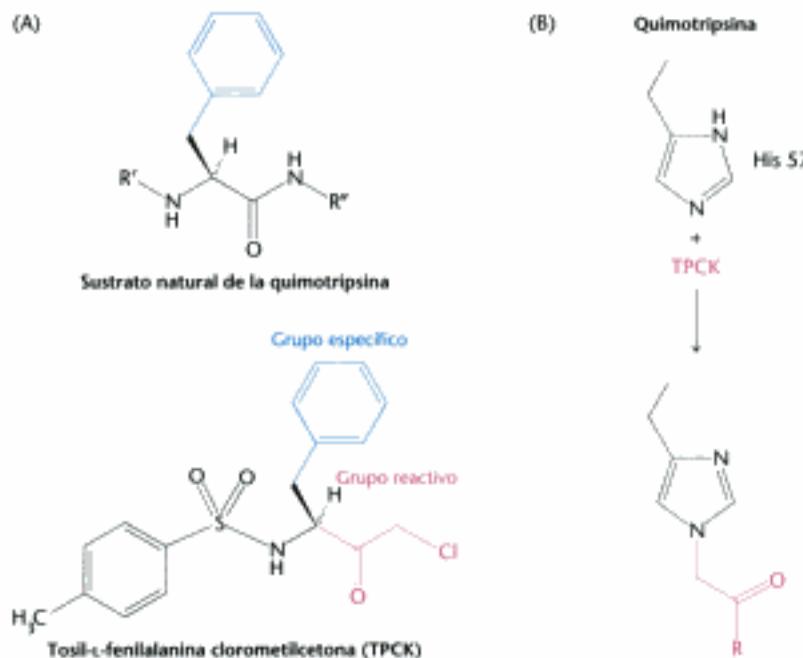


Figura 8.25 Marcadores de afinidad. (A) La tosil-L-fenilalanina clorometilketona (TPCK) es un reactivo análogo al sustrato normal de la quimotripsina. (B) La TPCK se une al centro activo de la quimotripsina y modifica covalentemente un residuo de histidina esencial.

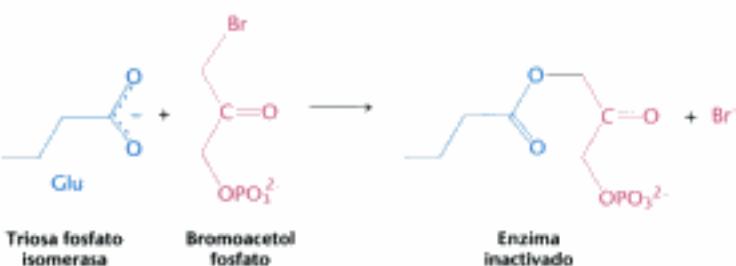
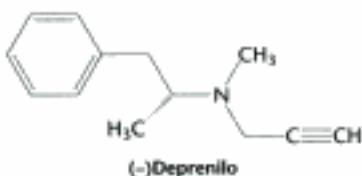


Figura 8.26 El bromoacetol fosfato es un marcador de afinidad para la triosa fosfato isomerasa (TPI). El bromoacetol fosfato, análogo del fosfato de dihidroxiacetona, se une al centro activo del enzima y modifica covalentemente un residuo de ácido glutámico, necesario para la actividad enzimática.

enzima, el fosfato de dihidroxiacetona, y se une en el centro activo; después modifica covalentemente al enzima, de tal manera que éste se inhibe de forma irreversible (Figura 8.26).

Los inhibidores suicidas, o inhibidores basados en el mecanismo, son sustratos modificados que proporcionan los medios más específicos para modificar el centro activo de un enzima. El inhibidor se une al enzima como un sustrato y se transforma inicialmente por el mecanismo catalítico normal. El mecanismo de la catálisis genera después un intermediario químicamente reactivo que inactiva al enzima por medio de una modificación covalente. El hecho de que el enzima participe en su propia inhibición irreversible sugiere con fuerza que el grupo del enzima modificado de forma covalente era catalíticamente esencial. Un ejemplo de este tipo de inhibidor es el *N,N*-dimetilpropargilamina, que inhibe al enzima monoamino oxidasa (MAO). Un grupo prostético de flavina de la monoamino oxidasa oxida el *N,N*-dimetilpropargilamina que, a su vez, inactiva al enzima por medio de la modificación covalente por unión al N-5 del grupo prostético de flavina (Figura 8.27). La monoamino oxidasa desamina a los neurotransmisores como dopamina y serotonina, disminuyendo sus niveles en el cerebro. La enfermedad de Parkinson está asociada a bajos niveles de dopamina y la depresión a bajos niveles de serotonina. El fármaco (-)deprenilo que se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y de la depresión, es un inhibidor suicida de la monoamino oxidasa.



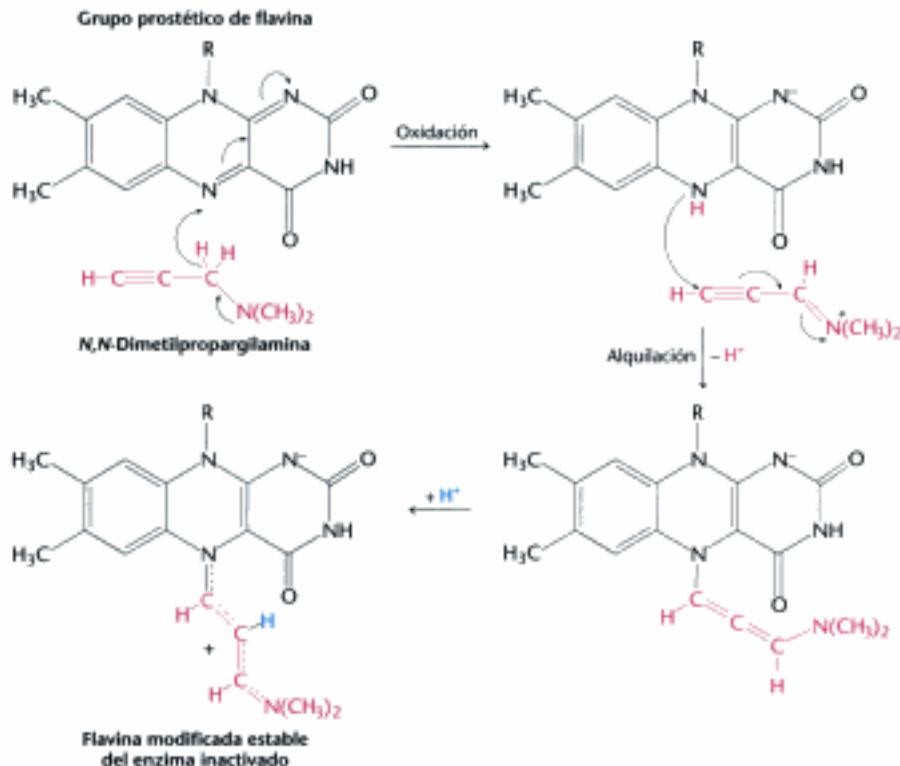


Figura 8.27 Inhibición basada en el mecanismo (suicida). La monoamino oxidasa es un enzima importante para la síntesis de neurotransmisores, que requiere el cofactor FAD (flavinadenina dinucleótido). La *N,N*-dimetilpropargilamina inhibe la monoamino oxidasa mediante la modificación covalente del grupo prostético de flavina, sólo después de que el inhibidor haya sido oxidado. El aducto N-5 flavina se estabiliza por adición de un protón.

Los análogos del estado de transición son eficaces inhibidores de los enzimas

Volvamos ahora a los componentes que proporcionan visiones íntimas de los procesos catalíticos por sí mismos. Linus Pauling propuso, en 1948, que los compuestos que son semejantes al estado de transición de una reacción catalizada deberían ser inhibidores enzimáticos muy efectivos. *Estas imitaciones se denominan análogos del estado de transición*. La inhibición de la racemasa de prolina es un ejemplo muy ilustrativo de ello. *La racemización de la prolina tiene lugar a través de un estado de transición en el que el átomo de carbono α tetraédrico se convierte en trigonal por la pérdida de un protón* (Figura 8.28). En esta forma trigonal, sus tres enlaces están en el mismo plano; C_{α} también posee una carga neta negativa. Este carbanión simétrico puede protonarse tanto por un lado, para originar el isomero L, como por el otro, para originar el isómero D. Este supuesto se confirmó cuando se comprobó que el pi-

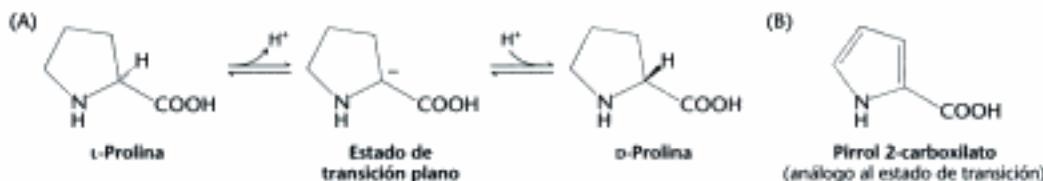


Figura 8.28 Inhibición por análogos del estado de transición. (A) La isomerización de la L-prolina a D-prolina por la prolina racemasa, que es un enzima bacteriano, tiene lugar a través de un estado de transición plano en el que el carbono α es trigonal y no tetraédrico. (B) El pirrol 2-carboxilato es un análogo del estado de transición porque posee una geometría trigonal y se comporta como un potente inhibidor de la prolina racemasa.

rrol 2-carboxilato se une a la racemasa con una fuerza 160 veces mayor que la propia prolina. El *átomo de carbono α de este inhibidor es trigonal, como el del estado de transición*. Se podría esperar que cualquier análogo que tuviera una carga negativa en el C_α fuera capaz de unirse más fuertemente aún. En general, se pueden producir inhibidores de enzimas con alta potencia y especificidad mediante la síntesis de compuestos semejantes al estado de transición que sufre el sustrato. El poder de inhibición de los análogos del estado de transición hace evidente la esencia misma de la catálisis: *la unión selectiva del enzima al estado de transición*.

Los anticuerpos catalíticos demuestran la importancia de la unión selectiva del estado de transición para la actividad enzimática

Si nuestra comprensión de la importancia del estado de transición para la catálisis es correcta, los anticuerpos que reconocen estados de transición deberán funcionar como catalizadores. Una buena ilustración de la validez de este planteamiento es la preparación de un anticuerpo que cataliza la inserción de un ion metálico en una porfirina. La ferroquellatasa, el último enzima de la vía biosintética para la producción del grupo hemo, cataliza la inserción de Fe²⁺ en la protoporfirina IX. La porfirina casi plana se distorsiona para que entre el hierro.

El problema consiste en encontrar un análogo del estado de transición para esta reacción de metalización, que se pueda utilizar como un antígeno (inmunógeno) para generar un anticuerpo. La solución vino de los estudios que demostraron que la N-metilprotoporfirina, una porfirina alquilada, era un potente inhibidor de la ferroquellatasa. Este compuesto es semejante al estado de transición porque la N-alquilación obliga a la porfirina a curvarse. Además, se sabía que las N-alquilporfirinas quelaban iones metálicos 10⁴ veces más rápidamente que sus homólogos no alquilados. La curvatura de la molécula favorece la exposición de los pares de electrones solitarios de los nitrógenos pirrólicos hacia el disolvente, lo cual facilita la unión al ion hierro.

De hecho, cuando se utilizó una N-alquilporfirina como inmunógeno se produjo un anticuerpo catalítico. El anticuerpo resultante distorsionaba a las porfirinas planas (Figura 8.29) y con ello facilitaba la entrada de los iones metálicos. Por cada molécula de anticuerpo se metalizaban 80 moléculas de porfirina por hora, una velocidad que sólo era 10 veces inferior a la de la ferroquellatasa y 2500 veces más rápida que la reacción no catalizada. *Los anticuerpos catalíticos (abzimas o abozimas) pueden efectivamente producirse utilizando como antígenos los análogos del estado de transición*. Empleando estrategias similares, se han producido anticuerpos que catalizan muchas otras clases de reacciones químicas, por ejemplo, hidrólisis de ésteres y amidas, formación de enlaces amida, transesterificación, escisión fotoinducida, dimerización fotoinducida, descarboxilación y oxidación. Los resultados de los estudios con análogos del estado de transición proporcionan evidencias sólidas de que los enzimas actúan a través de una estructura complementaria al estado de transición. Ahora ya resulta evidente la importancia de los análogos de los estados de transición: (1) proporcionan conocimientos acerca de los mecanismos catalíticos, (2) sirven como inhibidores potentes y específicos de los enzimas (3) pueden emplearse como inmunógenos para generar una amplia gama de nuevos catalizadores.

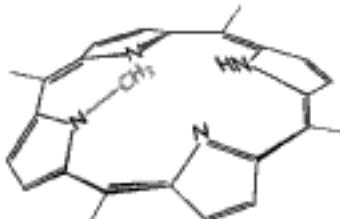


Figura 8.29 Utilización de análogos de estado de transición para generar anticuerpos catalíticos. La inserción de un ion metálico en una porfirina mediante la ferroquellatasa tiene lugar a través de un estado de transición en el que la porfirina se curva. La N-metilmesoporfirina, una porfirina curvada que se parece al estado de transición de la reacción catalizada por la ferroquellatasa, se utilizó para generar un anticuerpo que cataliza también la inserción de un ion metálico en el anillo de la porfirina.

La penicilina inactiva irreversiblemente a un enzima clave en la síntesis de la pared celular bacteriana

La penicilina, el primer antibiótico descubierto, consta de un anillo de tiazolidina fundido a un anillo β-lactámico, al cual va unido un grupo R variable, mediante un enlace peptídico (Figura 8.30A). En la bencilpenicilina, por ejemplo, R es un grupo bencilo (Figura 8.30B). Esta estructura puede sugerir una gama de reagrupamientos y, en particular, el anillo β-lactámico es muy labil. Verdaderamente, esta inestabilidad está unida estrechamente a la actividad antibiótica de la penicilina, como se estudiará en breve.

¿Cómo inhibe la penicilina el crecimiento bacteriano? En 1957, Joshua Lederberg demostró que las bacterias normalmente sensibles a la penicilina podían cultivarse en su presencia si se utilizaba un medio hipertónico. El organismo obtenido de



Figura 8.30 Estructura de la penicilina. El centro reactivo de la penicilina es el enlace peptídico de su anillo β -lactámico. (A) Fórmula estructural de la penicilina. (B) Modelo de la benzílpencilina.

esta forma, llamado *protoplasto*, no tiene pared celular y, en consecuencia, se destruye cuando se transfiere a un medio normal. Así pues, se dedujo que la penicilina interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana. La macromolécula integrante de la pared celular, denominada *peptidoglicano*, consta de cadenas de polisacárido lineales que están entrecruzadas con péptidos cortos (Figura 8.31). El enorme peptidoglicano en forma de bolsa proporciona soporte mecánico y evita que la bacteria estalle debido a su elevada presión osmótica interna.

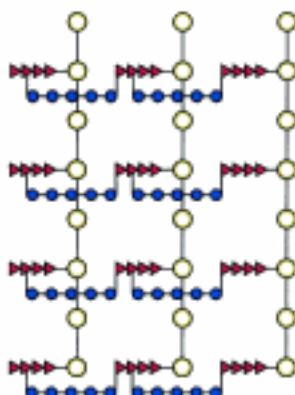


Figura 8.31 Diagrama esquemático del peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*. Los azúcares están representados en amarillo, los tetrapéptidos en rojo y los puentes de pentaglicina en azul. La pared celular consta de una única pero enorme macromolécula boliforme debido a su gran entrecruzamiento.

En 1965, James Park y Jack Strominger descubrieron independientemente que la penicilina bloquea la última etapa en la síntesis de la pared celular, el entrecruzamiento de las distintas cadenas de peptidoglicano. En la formación de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, el grupo amino terminal de una cadena de pentaglicina ataca al enlace peptídico entre dos residuos de D-alanina situados en otro péptido (Figura 8.32). Se forma un enlace peptídico entre la glicina y uno de los residuos de D-alanina, mientras que se libera el otro residuo de D-alanina. Esta reacción de entrecruzamiento está catalizada por la *glicopéptido transpeptidasa*. Las paredes celulares bacterianas son las únicas que contienen D-aminoácidos, que forman entrecruzamientos por un mecanismo completamente diferente al que se emplea para sintetizar proteínas.

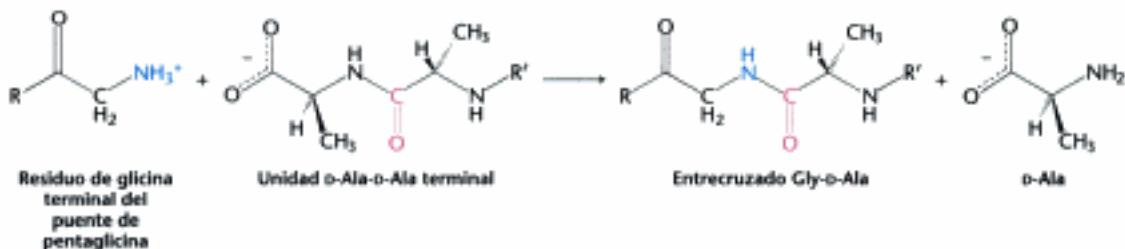


Figura 8.32 Formación de enlaces cruzados en el peptidoglicano de *S. aureus*. El grupo amino terminal del puente de pentaglicina de la pared celular ataca al enlace peptídico entre dos residuos de D-alanina para formar un enlace cruzado.

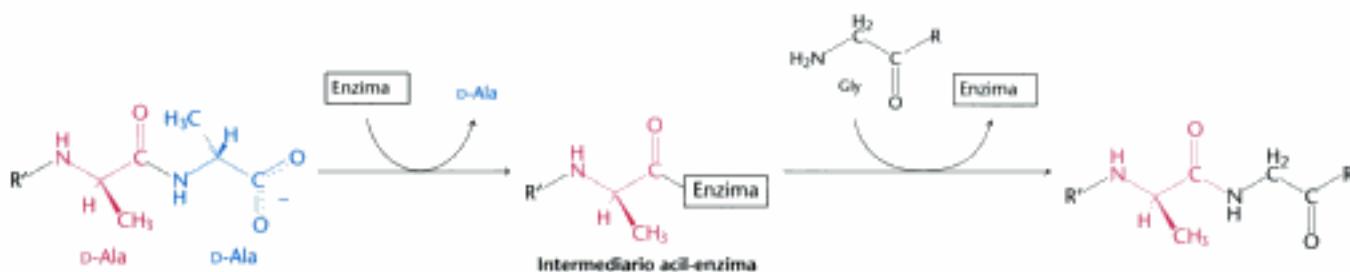


Figura 8.33 Reacción de transpeptidación. Se forma un intermediario acil-enzima en la reacción de transpeptidación que conduce a la formación de los enlaces cruzados.

La penicilina inhibe la transpeptidasa responsable del entrecruzamiento mediante la estrategia del caballo de Troya. La transpeptidasa forma normalmente un *intermediario acilado* con el penúltimo residuo de d-alanina del péptido d-Ala-d-Ala (Figura 8.33). Este intermediario covalente acil-enzima reacciona más tarde con el grupo amino de la glicina terminal de otro péptido para formar el entrecruzado. La penicilina llega al centro activo de la transpeptidasa porque se confunde con el componente d-Ala-d-Ala del sustrato normal (Figura 8.34). La penicilina unida forma luego un enlace covalente con un residuo de serina en el centro activo del enzima. *Este penicilil-enzima ya no reacciona más. Por tanto, la transpeptidasa queda inhibida irreversiblemente y no tiene lugar la síntesis de la pared celular.*

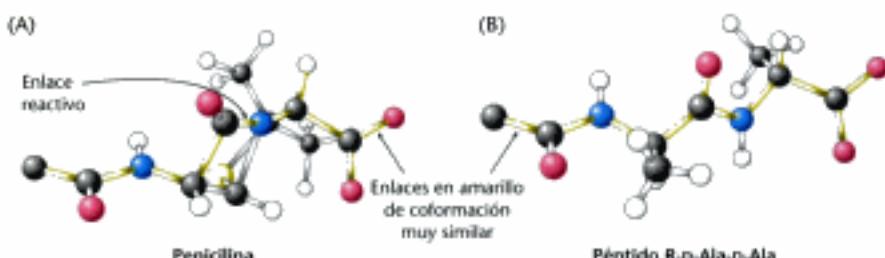


Figura 8.34 Conformaciones de la penicilina y de un sustrato natural. La conformación de la penicilina en la proximidad de su enlace peptídico reactivo (A) se parece a la conformación postulada del estado de transición de R-d-Ala-d-Ala (B) en la reacción de transpeptidación. [Tomado de B. Lee. *J. Mol. Biol.*, 61 (1971): 463.]

¿Por qué la penicilina es un inhibidor de la transpeptidasa tan eficaz? El anillo de cuatro eslabones β -lactámico de la penicilina está forzado, lo que lo hace muy reactivo. Al unirse a la transpeptidasa, el residuo de serina del centro activo ataca al átomo de carbono carbonílico del anillo lactámico para formar el derivado penicilil-serina. (Figura 8.35). Debido a que la peptidasa participa en su propia inactivación, la penicilina actúa como un inhibidor suicida.

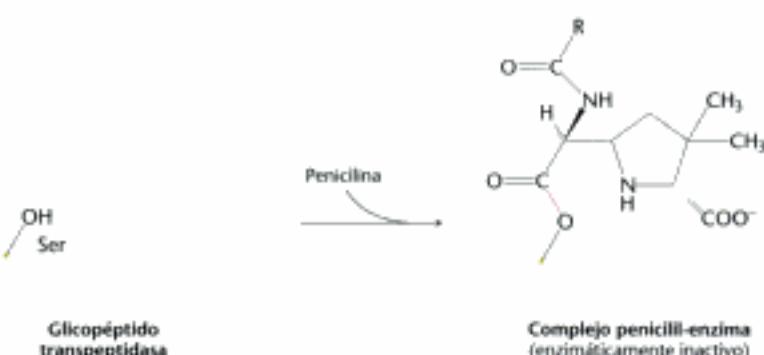


Figura 8.35 Formación de un complejo penicillil-enzima. La penicilina reacciona con la transpeptidasa para formar un complejo inactivo, que es estable indefinidamente.

Resumen

8.1 Los enzimas son catalizadores eficaces y muy específicos

Los enzimas son los catalizadores de los sistemas biológicos y casi todos los enzimas son proteínas. Los enzimas son muy específicos y tienen gran poder catalítico. Pueden aumentar las velocidades de reacción por factores de 10^6 o aún mayores. Muchos enzimas requieren cofactores para su actividad catalítica. Dichos cofactores pueden ser iones metálicos o coenzimas, pequeñas moléculas orgánicas derivadas de las vitaminas.

8.2 La energía libre es una función termodinámica útil para la comprensión de los enzimas

La energía libre (G) es la función termodinámica más valiosa para determinar si una reacción puede tener lugar y para comprender la energética de la catálisis. Una reacción transcurre de forma espontánea sólo si el cambio en la energía libre (ΔG) es negativo. El cambio de energía libre que se produce en una reacción en la que las actividades de las sustancias reactantes y de los productos de reacción es la unidad se denomina cambio de energía libre estándar (ΔG°). Los bioquímicos utilizan normalmente el ΔG° , que es el cambio de energía libre estándar a pH 7. Los enzimas no modifican el equilibrio de la reacción; sino que aumentan las velocidades de la reacción.

8.3 Los enzimas aceleran las reacciones facilitando la formación del estado de transición

Los enzimas actúan como catalizadores mediante la reducción de la energía libre de activación de las reacciones químicas. Los enzimas aceleran reacciones ya que proporcionan nuevas vías de reacción en las que el estado de transición (la forma de mayor energía) tiene menor energía libre y por tanto se forma más rápidamente que en las reacciones no catalizadas.

La primera etapa en la catálisis es la formación de un complejo enzima-sustrato. Los sustratos se unen a los enzimas en la cavidad del centro activo, en la que se elimina el agua al unirse al sustrato. La especificidad de las interacciones enzima-sustrato proviene fundamentalmente de los puentes de hidrógeno formados, que son direccionales, y de la configuración del centro activo, que rechaza las moléculas que no presentan una forma suficientemente complementaria. El reconocimiento de los sustratos por los enzimas va acompañado de cambios conformacionales en los centros activos, que facilitan la formación del estado de transición.

8.4 El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchos enzimas

El modelo de Michaelis-Menten explica las propiedades cinéticas de muchos enzimas. En este modelo, un enzima (E) se combina con un sustrato (S) para formar un complejo enzima-sustrato (ES), que puede proseguir hasta formar un producto (P) o disociarse en E y S.



La velocidad de formación del producto, V_0 , viene dada por la ecuación Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

donde V_{\max} es la velocidad cuando el enzima está completamente saturado de sustrato y K_M , la constante de Michaelis, es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima. La velocidad máxima, V_{\max} , es

igual al producto de k_2 o k_{cat} por la concentración total del enzima. La constante cinética k_{cat} , llamada número de recambio, es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo en un solo centro catalítico, cuando el enzima está completamente saturado de sustrato. Los números de recambio de muchos enzimas se encuentran comprendidos entre 1 y 10^4 por segundo. La razón k_{cat}/K_M proporciona una información crucial sobre la eficacia de los enzimas.

Los enzimas alostéricos constituyen una clase importante de enzimas cuya actividad catalítica se puede regular. Estos enzimas, que no se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten, tienen múltiples centros activos. Estos centros activos manifiestan cooperatividad, como se demuestra por la dependencia sigmoidal de la velocidad de reacción con respecto a la concentración de sustrato.

8.5 Los enzimas pueden inhibirse mediante moléculas específicas

Incluso los enzimas no alostéricos pueden inhibirse por pequeñas moléculas específicas o por iones. En la inhibición irreversible, el inhibidor queda covalentemente unido al enzima o ligado tan fuertemente a él que la disociación del enzima resulta muy lenta. Los inhibidores covalentes constituyen un sistema muy útil para cartografiar el centro activo del enzima. Por el contrario, la inhibición reversible se caracteriza por un equilibrio rápido entre el inhibidor y el enzima. Un inhibidor competitivo impide al sustrato unirse al centro activo. Reduce la velocidad de reacción al disminuir la proporción de moléculas enzimáticas que tienen sustrato ligado. La inhibición competitiva se puede superar incrementando la concentración de sustrato. En la inhibición incompetitiva, el inhibidor se combina solamente con el complejo enzima-sustrato. En la inhibición no competitiva, el inhibidor disminuye el número de recambio. La inhibición incompetitiva y la no competitiva no se pueden superar incrementando la concentración de sustrato.

La esencia de la catálisis es la estabilización selectiva del estado de transición. Por tanto, los enzimas se unen al estado de transición de modo más compacto que al sustrato. Los análogos de los estados de transición son compuestos estables que imitan los rasgos clave de las especies de mayor energía. Son inhibidores eficaces y específicos de los enzimas. La demostración de que la estabilización del estado de transición es un aspecto fundamental de la actividad enzimática se obtuvo mediante la generación de anticuerpos catalíticos. Los análogos de los estados de transición se utilizan como antígenos o inmunógenos para generar anticuerpos con propiedades catalíticas.

APÉNDICE: Los enzimas se clasifican en base al tipo de reacción que catalizan

Muchos enzimas tienen nombres triviales que aportan escasa información sobre las reacciones que catalizan. Por ejemplo, un enzima proteolítico segregado por el páncreas se denomina tripsina. Pero la mayor parte de los enzimas se denominan por sus sustratos y por las reacciones que catalizan, añadiendo el sufijo “asa”. Así, una hidrolasa peptídica es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos, mientras que la ATP sintasa es un enzima que sintetiza ATP.

Para aportar una cierta coherencia a la clasificación de los enzimas, la Unión Internacional de Bioquímica en 1964 estableció una Comisión de Enzimas para desarrollar una nomenclatura para los enzimas. Las reacciones se dividieron en seis grupos principales numerados del 1 al 6 (Tabla 8.8). Para identificar con precisión todos los enzimas, los grupos se subdividieron varias veces hasta originar nombres con cuatro dígitos precedidos por las letras EC (de *Enzyme Commission*).

Consideremos como un ejemplo a la nucleósido monofosfato (NMP) quinasa, un enzima que se tratará ampliamente

en la Sección 9.4. Cataliza la reacción siguiente:



La NMP quinasa transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al NMP para formar un nucleósido difosfato (NDP) y ADP. Por lo tanto, es una transferasa, es decir miembro del grupo 2. Además del grupo fosforilo se pueden transferir otros grupos, como por ejemplo azúcares ó unidades de carbono. Las transferasas que intercambian un grupo fosforilo se designan como 2.7. El grupo fosforilo puede ser aceptado por diferentes grupos funcionales. Si es un fosfato el grupo aceptor, la transferasa se designa 2.7.4. El número final designa más concretamente al aceptor. Observando la NMP quinasa, el aceptor es un nucleósido monofosfato, y la designación del enzima es EC 2.7.4.4. Aunque los nombres triviales se utilizan de manera rutinaria, cuando la identidad de un enzima concreto pueda resultar ambigua se utiliza su número de clasificación.

TABLA 8.8 Las seis clases principales de enzimas

Clase	Tipo de reacción	Ejemplo	Capítulo
1. Oxidorreductasas	Oxidación-reducción	Lactato deshidrogenasa	16
2. Transferasas	Transferencia de grupo	Nucleósido monofosfato quinasa (NMP quinasa)	9
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis/transferencias de grupos funcionales al agua	Quimotripsina	9
4. Liasas	Adición y separación de grupos para formar dobles enlaces	Fumarasa	17
5. Isomerasas	Isomerización (transferencia intramolecular de grupo)	Triosa fosfato isomerasa	16
6. Ligasas	Unión de dos sustratos a expensas de la hidrólisis del ATP	Aminoacil-tRNA sintetasa	30

Términos clave

enzima (p. 206)	ajuste inducido (p. 215)	inhibición competitiva (p. 225)
sustrato (p. 206)	K_M (constante de Michaelis) (p. 218)	inhibición incompetitiva (p. 226)
cofactor (p. 207)	V_{max} (p. 219)	inhibición no competitiva (p. 226)
apoenzima (p. 207)	ecuación de Michaelis-Menten (p. 219)	reactivo específico de grupo (p. 229)
holoenzima (p. 207)	número de recambio (p. 221)	marcador de afinidad (reactivos análogos del sustrato) (p. 229)
coenzima (p. 207)	k_{cat}/K_M (p. 221)	inhibición basada en el mecanismo (suicida) (p. 230)
grupo prostético (p. 207)	reacción de desplazamiento secuencial (p. 223)	análogo del estado de transición (p. 231)
energía libre (p. 208)	reacción de doble desplazamiento análogo de estado de transición (ping-pong) (p. 224)	anticuerpo catalítico (abozima) (p. 232)
estado de transición (p. 211)	enzima alostérico (p. 224)	
energía libre de activación (p. 211)		
centro activo (p. 213)		

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Koshland, D. E., Jr., 1987. Evolution of catalytic function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:1-7.
 Jencks, W. P., 1987. Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:65-73.
 Lerner, R. A. y Tramontano, A., 1988. Catalytic antibodies. *Sci. Am.* 258(3):58-70.

Libros

- Fersht, A., 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company.
 Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Company.
 Page, M. I. y Williams, A. (Eds.), 1987. *Enzyme Mechanisms*. Royal Society of Chemistry.
 Bender, M. L., Bergeron, R. J. y Komiyama, M., 1984. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*. Wiley-Interscience.
 Abelson, J. N. y Simon, M. I. (Eds.), 1992. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
 Boyer, P. D. (Ed.), 1970. *The Enzymes* (3d ed.). Academic Press.
 Friedman, H. (ed.), 1981. *Benchmark Papers in Biochemistry*. Vol. 1. *Enzymes*. Hutchinson Ross.

Estabilización del estado de transición, análogos y otros inhibidores de enzimas

- Schramm, V. L., 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67:693-720.
 Pauling, L., 1948. Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 161:707-709.
 Leinhard, G. E., 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180:149-154.
 Kraut, J., 1988. How do enzymes work? *Science* 242:533-540.
 Waxman, D. J. y Strominger, J. L., 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52:825-869.
 Abraham, E. P., 1981. The β -lactam antibiotics. *Sci. Am.* 244:76-86.
 Walsh, C. T., 1984. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: Recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* 53:493-535.

Anticuerpos catalíticos

- Hilvert, D., 2000. Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 69:751-794.
 Wade, H. y Scanlan, T. S., 1997. The structural and functional basis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Sci.* 26:461-493.

Lerner, R. A., Benkovic, S. J. y Schultz, P. G., 1991. At the crossroads of chemistry and immunology: Catalytic antibodies. *Science* 252:659-667.

Cochran, A. G. y Schultz, P. G., 1990. Antibody-catalyzed porphyrin metallation. *Science* 249:781-783.

Cinética y mecanismo enzimático

Benkovic, S. J. y Hammes-Schiffer, S., 2003. A perspective on enzyme catalysis. *Science* 301:1196-1202.

Hur, S. y Bruice, T.C., 29003. The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:12015-12020.

Xie, X. S. y Lu, H. P., 1999. Single-molecule enzymology. *J. Biol. Chem.* 274:15967-15970.

Miles, E. W., Rhee, S. y Davies, D. R., 1999. The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* 274:12193-12196.

Warshel, A., 1998. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J. Biol. Chem.* 273: 27035-27038.

Cannon, W. R. y Benkovic, S. J., 1999. Solvation, reorganization energy, and biological catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:26257-26260.

Cleland, W. W., Frey, P. A. y Gerlt, J. A., 1998. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* 273:25529-25532.

Romesberg, F. E., Santarsiero, B. D., Spiller, B., Yin, J., Barnes, D., Schultz, P. G. y Stevens, R. C., 1998. Structural and kinetic evidence for strain in biological catalysis. *Biochemistry* 37:14404-14409.

Lu, H. P., Xun, L. y Xie, X. S., 1998. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* 282:1877-1882.

Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J. y Wells, T. N. C., 1986. Binding energy and catalysis: A lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 11:321-325.

Jencks, W. P., 1975. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: The Circe effect. *Adv. Enzymol.* 43:219-410.

Knowles, J. R. y Albery, W. J., 1976. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry* 15:5631-5640.

Problemas

1. *Dirigido por la fuerza hidrolítica.* La hidrólisis del pirofosfato a ortofosfato es importante para impulsar reacciones biosintéticas tales como la síntesis del DNA. Esta reacción hidrolítica está catalizada en *Escherichia coli* por una pirofosfatasa que tiene una masa de 120 kd y está constituida por 6 subunidades idénticas. Para este enzima, una unidad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 10 µmoles de pirofosfato en 15 minutos a 37 °C en condiciones de ensayo estándar. El enzima purificado tiene una V_{max} de 2800 unidades por milígramo de enzima.

(a) ¿Cuántos moles de sustrato se hidrolizan por segundo y por milígramo de enzima cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que K_m ?

(b) ¿Cuántos moles de centro activo existen en un milígramo de enzima? Suponer que cada subunidad tiene un solo centro activo.

(c) ¿Cuál es el número de recambio del enzima? Comparar este valor con el de otros mencionados en este capítulo.

2. *Destrucción del caballo de Troya.* La penicilina se hidroliza y con ello se inactiva por la penicilinasa (también conocida como β-lactamasa), un enzima presente en algunas bacterias resistentes. La masa de este enzima en *Staphylococcus aureus* es 29,6 kd. La cantidad de penicilina hidrolizada en un minuto en una disolución de 10 mL que contiene 10^{-9} g de penicilinasa purificada se midió como función de la concentración de penicilina. Suponer que la concentración de penicilina no cambia apreciablemente durante el ensayo.

[Penicilina] (µM)	Cantidad hidrolizada (nanomoles)
1	0,11
3	0,25
5	0,34
10	0,45
30	0,58
50	0,61

(a) Representar V_0 frente a [S] y $1/V_0$ frente a $1/[S]$ a partir de los datos de la tabla. ¿Parece obedecer la penicilinasa a la cinética de Michaelis-Menten? Si es así, ¿cuál es el valor de K_m ?

(b) ¿Cuál es el valor de V_{max} ?

(c) ¿Cuál es el número de recambio de la penicilinasa en estas condiciones experimentales? Hay que suponer un centro activo por molécula del enzima.

3. *Contrapunto.* La penicilinasa (β-lactamasa) hidroliza la penicilina. Comparar la penicilinasa con la glicopéptido transpeptidasa.

4. *Modos de inhibición.* Se mide la cinética de un enzima como función de la concentración de sustrato en presencia y ausencia del inhibidor (I), a concentración 2 mM.

[S] (mM)	Velocidad (µmol/minuto)	
	Sin inhibidor	Con inhibidor
3	10,4	4,1
5	14,5	6,4
10	22,5	11,3
30	33,8	22,6
90	40,5	33,8

(a) ¿Cuáles son los valores de V_{max} y K_m en ausencia de inhibidor? ¿Y en su presencia?

(b) ¿De qué tipo de inhibición se trata?

(c) ¿Cuál es la constante de unión de este inhibidor?

(d) Cuando $[S] = 10 \mu\text{M}$ y $[I] = 2 \text{ mM}$, ¿qué fracción de las moléculas están unidas al sustrato? ¿Y al inhibidor?

(e) Cuando $[S] = 30 \mu\text{M}$, ¿qué fracción de moléculas del enzima tiene unidas moléculas de sustrato en presencia y ausencia de inhibidor 2 mM? Comparar esta relación con la relación de las velocidades de reacción en las mismas condiciones.

5. *Un modo diferente.* La cinética del enzima estudiado en el problema 4 se mide en presencia de un inhibidor diferente. La concentración de este inhibidor es 100 µM.

(a) ¿Cuáles son los valores de V_{max} y K_m en presencia de este inhibidor? Comparar con los obtenidos en el problema 4.

(b) ¿Qué tipo de inhibición es ésta?

(c) ¿Cuál es la constante de disociación de este inhibidor?

[S] (μM)	Velocidad ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)	
	Sin inhibidor	Con inhibidor
3	10,4	2,1
5	14,5	2,9
10	22,5	4,5
30	33,8	6,8
90	40,5	8,1

- (d) Cuando $[S] = 30 \mu\text{M}$, ¿qué fracción de las moléculas del enzima tienen sustrato ligado en presencia y en ausencia de inhibidor $100 \mu\text{M}$?

6. Una visión nueva. La representación de $1/V_0$ frente a $1/[S]$ se llama a veces representación de Lineweaver-Burk. Otra manera de expresar los datos cinéticos es representar V_0 frente a $V_0/[S]$, que es conocida como representación Eadie-Hofstee.

- (a) Reajustar la ecuación de Michaelis-Menten para dar V_0 como función de $V_0/[S]$.
 (b) ¿Cuál es el significado de la pendiente, la intersección con y y la intersección con x en una representación de V_0 frente a $V_0/[S]$?
 (c) Representar V_0 frente a $V_0/[S]$ en ausencia de un inhibidor, en presencia de un inhibidor competitivo y en presencia de un inhibidor no competitivo.

7. Dadores y aceptores potenciales. La hormona progesterona contiene dos grupos cetónicos. A pH 7, ¿qué cadenas laterales del receptor deben formar puentes de hidrógeno con la progesterona?

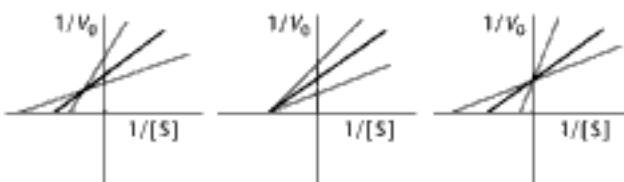
8. Sustratos que compiten. Suponer que dos sustratos A y B compiten por un enzima. Deducir una expresión que relacione la razón de las velocidades de utilización de A y B, V_A/V_B , con respecto a las concentraciones de estos sustratos y sus valores de k_{cat} y K_M . (Pista: expresar V_A en función de k_{cat}/K_M para el sustrato A y hacer lo mismo con V_B). ¿Viene la especificidad determinada únicamente por K_M ?

9. Un mutante tenaz. Suponer que un enzima mutante se une a un sustrato con una fuerza 100 veces mayor que la del enzima nativo. ¿Cuál es el efecto de esta mutación sobre la velocidad catalítica si la unión del estado de transición no resulta afectada?

10. Más sobre Michaelis-Menten. Para un enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten simple, ¿cuál es el valor de la V_{max} si V_0 es igual a 1 $\mu\text{M}/\text{minuto}$ a $1/10 K_M$?

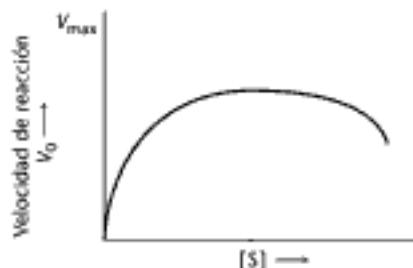
Problemas sobre interpretación de datos

11. Enzima que varía. Se determinó la representación doble recíproca para una reacción de un solo sustrato catalizada por un enzima a tres concentraciones de enzima diferentes. ¿Cuál de las siguientes tres familias de curvas se podría esperar obtener? Explicarlo.



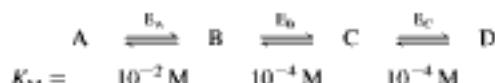
12. Demasiado para algo bueno. Un enzima de tipo Michaelis-Menten simple manifiesta la siguiente conducta cinética en ausencia de

cualquier inhibidor. El valor esperado de V_{max} se muestra sobre el eje y .



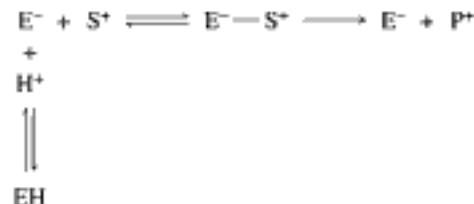
- (a) Dibujar una representación doble recíproca que corresponda a la curva de velocidad frente al sustrato.
 (b) Dar una explicación para los resultados cinéticos.

13. Etapa determinante de la velocidad. En la conversión de A en D, en la vía bioquímica siguiente, los enzimas E_A , E_B y E_C tienen los valores de K_M indicados debajo de cada enzima. Si todos los sustratos y productos están presentes a una concentración de 10^{-4} M , y los enzimas tienen la misma V_{max} aproximadamente, ¿qué paso será el determinante de la velocidad y por qué?



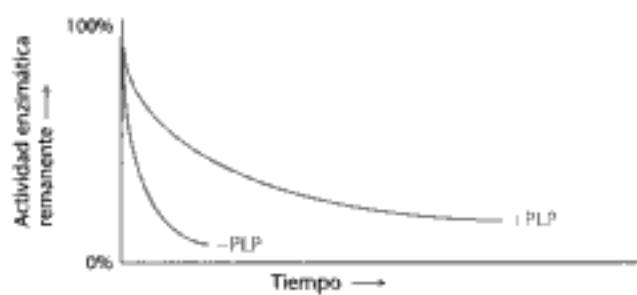
Problemas de integración del capítulo

14. Experimento de valoración. Se examinó el efecto del pH sobre la actividad de un enzima. En su centro activo, el enzima tiene un grupo ionizable que, para que se une al sustrato y tenga lugar la catálisis, deberá estar cargado negativamente. El grupo ionizable tiene un pK_a de 6,0. El sustrato está cargado positivamente en todo el intervalo de pH del experimento.



- (a) Dibujar la curva de V_0 frente al pH cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que la K_M del enzima.
 (b) Dibujar la curva de V_0 frente al pH cuando la concentración del sustrato es mucho menor que la K_M del enzima.
 (c) ¿A qué pH la velocidad será igual a la mitad de la velocidad máxima alcanzable en estas condiciones?

15. Una cuestión de estabilidad. El piridoxal fosfato (PLP) es un coenzima para el enzima ornitina aminotransferasa. El enzima se purificó a partir de células cultivadas en un medio que contenía PLP. La estabilidad del enzima se midió después incubando el enzima a 37°C y ensayando la cantidad de actividad enzimática remanente. Se obtuvieron los siguientes resultados.



- (a) ¿Por qué disminuye la cantidad de enzima activo con el tiempo de incubación?
 (b) ¿Por qué disminuye más rápidamente la cantidad de enzima procedente de las células deficientes en PLP?

Estrategias catalíticas



El ajedrez y los enzimas tienen en común el empleo de estrategia, deducida conscientemente en el juego del ajedrez, y seleccionada por la evolución para la acción de un enzima. En el centro activo de una clase de enzimas que rompen enlaces peptídicos, se ha descubierto una triada catalítica formada por tres residuos de aminoácidos, indicados a la derecha de la figura con enlaces blancos. El sustrato, representado por la molécula con enlaces negros, se encuentra tan desesperadamente atrapado como el rey de la fotografía de la izquierda en una partida de ajedrez, y se fragmentará con toda seguridad. [(Izquierda) Cortesía de Wendie Berg.]

¿Cuáles son las fuentes del poder catalítico y de la especificidad de los enzimas?

Este capítulo presenta las estrategias catalíticas utilizadas por cuatro clases de enzimas: serinproteasas, anhidrasas carbónicas, endonucleasas de restricción y nucleósido monofosfato (NMP) quinasas. Las tres primeras clases de enzimas catalizan reacciones que requieren la adición de agua a un sustrato, mientras que la cuarta clase cataliza reacciones que requieren evitar la adición de agua. Los mecanismos de estos enzimas se han desvelado gracias a pruebas experimentales, incluyendo las técnicas de determinación de estructura de proteínas (Capítulo 3) y mutagénesis dirigida (Capítulo 5). Estos mecanismos ilustran principios de catálisis muy importantes. Veremos cómo estos enzimas facilitan la formación del estado de transición mediante la utilización de la energía de unión y el ajuste inducido, así como diferentes estrategias catalíticas específicas.

Cada uno de los cuatro enzimas mostrados en este capítulo ilustra la utilización de dichas estrategias para resolver problemas diferentes. Para las serinproteasas, ejemplificadas por la quimotripsina, el desafío consiste en promover una reacción que a pH neutro y ausencia de catalizador es enormemente lenta. Para las anhidrasas carbónicas, el reto es alcanzar una velocidad de reacción muy alta apropiada para la integración con otros procesos fisiológicos rápidos. Para las endonucleasas de restricción, como EcoRV, el desafío reside en alcanzar un nivel muy alto de especificidad. Finalmente, para las NMP quinasas, el reto consiste en transferir un grupo fosforilo desde el ATP a un nucleótido y no al agua. Cada uno de los ejemplos seleccionados es miembro de una clase de proteínas importante. La compara-

Contenido

- 9.1 Las proteasas facilitan una reacción especialmente difícil
- 9.2 Las anhidrasas carbónicas aceleran una reacción rápida
- 9.3 Las enzimas de restricción llevan a cabo la escisión del DNA mediante reacciones muy específicas
- 9.4 Las nucleósido monofosfato quinasas catalizan la transferencia del grupo fosforilo entre nucleótidos sin provocar la hidrólisis

ción de los distintos miembros de estas clases revela cómo han evolucionado y se han perfeccionado los centros activos de sus enzimas. Las comparaciones estructurales y mecanísticas de la acción de los enzimas, de este modo, son fuentes para entender la historia evolutiva de los enzimas. Además, nuestro conocimiento de las estrategias catalíticas se ha utilizado para desarrollar aplicaciones prácticas, por ejemplo, fármacos que son específicos y eficaces inhibidores de enzimas. Finalmente, aunque no consideremos explícitamente a las moléculas de RNA catalíticas en este capítulo, los principios para estos catalizadores son los mismos que para los catalizadores proteicos.

Muchos enzimas utilizan unos pocos principios catalíticos básicos

En el Capítulo 8 vimos que la catálisis enzimática comienza con la unión del sustrato. La *energía de unión* es la energía libre liberada en la formación de un gran número de interacciones débiles entre el enzima y el sustrato. Se puede sospechar que esta energía de unión sirve para dos propósitos: establecer la especificidad del sustrato y aumentar la eficacia catalítica. Sólo el sustrato correcto puede participar en la mayor parte de las interacciones con el enzima y así potenciar la energía de unión, lo que explica la exquisita especificidad por el sustrato exhibida por muchos enzimas. Además, el complemento perfecto para dichas interacciones solamente se forma cuando el sustrato se encuentra en el estado de transición. De este modo, las interacciones entre el enzima y el sustrato no sólo favorecen la unión del sustrato sino que estabilizan al estado de transición, disminuyendo así la energía de activación. La energía de unión puede promover también cambios estructurales, tanto en el enzima como en el sustrato, que favorecen la catálisis, en un proceso denominado *ajuste inducido*.

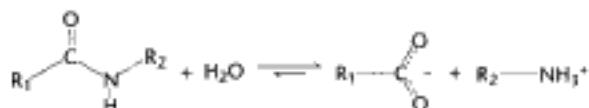
Para catalizar reacciones específicas, los enzimas normalmente emplean una o más de las estrategias siguientes:

1. *Catálisis covalente*. En la catálisis covalente, el centro activo contiene un grupo reactivo, habitualmente un nucleófilo potente, que en el transcurso de la catálisis llega a ser modificado covalentemente de forma temporal. El enzima proteolítico quimotripsina proporciona un ejemplo excelente de este mecanismo (Sección 9.1).
2. *Catálisis general ácido-base*. En general, en la catálisis ácido-base, una molécula diferente al agua desempeña el papel de dador o acceptor de un protón. La quimotripsina utiliza un residuo de histidina como un catalizador básico para incrementar el poder nucleofílico de la serina, mientras que en la anhidrasa carbónica, un residuo de histidina facilita la captación de un ion hidrógeno desde una molécula de agua unida al zinc para generar ion hidróxido (Sección 9.2).
3. *Catálisis por aproximación*. Muchas reacciones incluyen dos sustratos diferentes. En esos casos, la velocidad de la reacción puede aumentarse considerablemente, atrayendo a los dos sustratos juntos sobre una misma superficie de unión del enzima. Las NMP quinasas atraen a dos nucleótidos a la vez para facilitar la transferencia de un grupo fosforilo desde un nucleótido al otro (Sección 9.4.).
4. *Catálisis por ion metálico*. Los iones metálicos pueden funcionar catalíticamente de varias maneras. Por ejemplo, un ion metálico puede facilitar mediante coordinación directa la formación de nucleófilos como el ion hidróxido, un ion zinc (Zn^{2+}) se utiliza para este propósito (Sección 9.2). De forma alternativa, un ion metálico puede actuar como un electrófilo, estabilizando una carga negativa sobre un intermediario de reacción. En EcoRV un ion magnesio (Mg^{2+}) desempeña ese papel (Sección 9.3). Finalmente, un ion metálico puede actuar como un puente entre el enzima y el sustrato, aumentando la energía de unión y manteniendo al sustrato en una conformación apropiada para la catálisis. Las NMP quinasas utilizan esta estrategia (Sección 9.4) y también lo hacen casi todos los enzimas que utilizan ATP como sustrato.

9.1 Las proteasas facilitan una reacción especialmente difícil

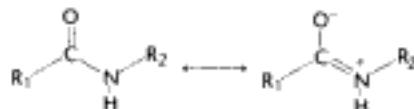
El recambio de las proteínas es un proceso importante en los seres vivos (Capítulo 23). Las proteínas que han cumplido sus objetivos deben degradarse, de forma que sus aminoácidos constituyentes se reciclen para la síntesis de nuevas proteínas. Las proteínas ingeridas en la dieta se descomponen en péptidos más pequeños y aminoácidos para su absorción en el intestino. Además, las reacciones proteolíticas son importantes en la regulación de la actividad de ciertos enzimas y algunas proteínas, tal y como se describirá en detalle en el Capítulo 10.

Las proteasas rompen a las proteínas mediante una reacción de hidrólisis, es decir, la adición de una molécula de agua a un enlace peptídico:



Aunque la hidrólisis de enlaces peptídicos está favorecida termodinámicamente, dichas reacciones hidrolíticas son extremadamente lentas. En ausencia de un catalizador, la vida media para la hidrólisis de un péptido típico a pH neutro se estima que está entre 10 y 1000 años. Sin embargo, los enlaces peptídicos, en algunos procesos bioquímicos, se hidrolizan en milisegundos.

La unión química en el enlace peptídico es la responsable de su estabilidad cinética. De forma específica, la estructura resonante que explica la planaridad del enlace peptídico (p. 37) hace también que dichos enlaces resistan a la hidrólisis. Esta estructura resonante dota al enlace peptídico de un carácter parcial de doble enlace:



El enlace carbono–nitrógeno se fortalece por sus carácter de doble enlace, y el átomo de carbono carbonílico es menos electrofílico y menos susceptible al ataque nucleofílico que los átomos de carbono carbonílicos en compuestos como los ésteres de carboxilatos. En consecuencia, para promover la ruptura del enlace peptídico, un enzima debe facilitar el ataque nucleofílico sobre un grupo carbonilo normalmente no reactivo.

La quimotripsina posee un residuo de serina sumamente reactivo

En la degradación de proteínas, en el aparato digestivo de mamíferos y de otros organismos, participan un cierto número de enzimas proteolíticos. Uno de esos enzimas, la quimotripsina, rompe selectivamente los enlaces peptídicos contiguos al extremo carboxilo de aminoácidos hidrofóbicos voluminosos, como triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina (Figura 9.1). La quimotripsina es un buen ejemplo del uso de la *catalisis covalente*. El enzima emplea un nucleófilo potente para atacar al grupo carbonilo no reactivo del sustrato. Este nucleófilo se une covalentemente al sustrato por un tiempo breve en el transcurso de la catálisis.

¿Cuál es el nucleófilo que emplea la quimotripsina para atraer al grupo carbonilo del sustrato? Una pista llegó del hecho de que la quimotripsina contiene un residuo de serina extraordinariamente reactivo. Moléculas de quimotripsina tratadas con un organofluorofosfato como el diisopropilfosfofluoridato (DIPF; p. 229) perdían toda

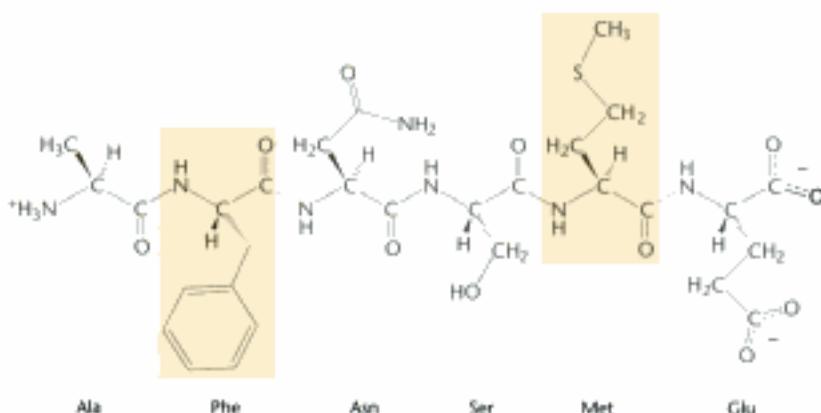


Figura 9.1 Especificidad de la quimotripsina. La quimotripsina rompe a las proteínas sobre el extremo carboxilo de aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos voluminosos (sombreados en naranja). Los enlaces escindidos fácilmente por quimotripsina se indican en rojo.

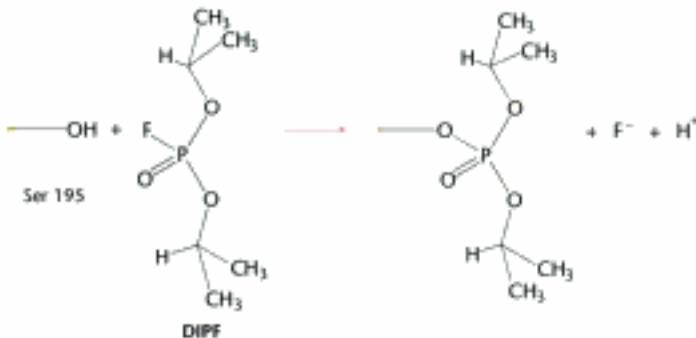


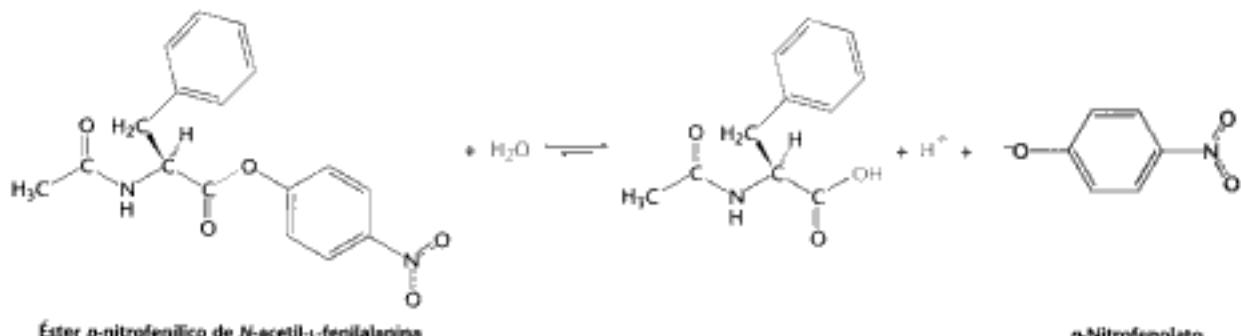
Figura 9.2 Una serina excepcionalmente reactiva de la quimotripsina. La quimotripsina se inactiva por tratamiento con diisopropilofluoridato (DIPF), que reacciona únicamente con el residuo de serina 195, de entre los 28 residuos de serina que existen en el enzima.

la actividad del enzima de modo irreversible (Figura 9.2). Solamente un único residuo, la serina 195, se modificó. Esta *reacción de modificación química* sugirió que este residuo de serina especialmente reactivo desempeña un papel central en el mecanismo catalítico de la quimotripsina.

La acción de la quimotripsina tiene lugar en dos pasos enlazados mediante un intermediario unido covalentemente

Un estudio de la cinética del enzima proporcionó una segunda pista sobre el mecanismo catalítico de la quimotripsina. Las cinéticas de la acción del enzima son a menudo monitorizadas fácilmente cuando el enzima actúa sobre un análogo del sustrato que forma un producto coloreado. Para la quimotripsina, tal sustrato cromogénico es el éster *p*-nitrofenilo de *N*-acetil-L-fenilalanina. Este sustrato es un éster, y no una amida, pero muchas proteasas hidrolizan también a los ésteres. Uno de los productos formados por la ruptura de este sustrato por la quimotripsina es el *p*-nitrofenolato, que tiene color amarillo (Figura 9.3). Las medidas de la absorbancia lumínica revelaron la cantidad de *p*-nitrofenolato producida.

En estas condiciones de estado estacionario, la ruptura de este sustrato obedece a la cinética de Michaelis-Menten con una K_M de 20 μM y una k_{cat} de 77 s^{-1} . La fase inicial de la reacción se examinó utilizando la técnica de flujo detenido. Este



Éster *p*-nitrofenílico de *N*-acetil-L-fenilalanina

p-Nitrofenolato

método permite la mezcla rápida del enzima y el sustrato, y favorece la monitorización de la reacción cada milisegundo. Este método reveló una fase "explosiva" durante la cual se produjo rápidamente el producto coloreado. Después, cuando la reacción alcanza el estado estacionario el producto se genera más lentamente (Figura 9.4). Estos resultados sugieren que la hidrólisis tiene lugar en dos pasos. Con el sustrato se observó la fase "explosiva", ya que el primer paso es mucho más rápido que el segundo.

Los dos pasos se explican por la formación de un intermediario enzima-sustrato enlazado covalentemente (Figura 9.5). En primer lugar, el grupo acilo del sustrato pasa a estar enlazado covalentemente al enzima y se libera como *p*-nitrofenolato (o una amina si el sustrato es una amida en vez de un éster). Al complejo grupo acilo-enzima se le denomina *intermediario acil-enzima*. En segundo lugar, el intermediario acil-enzima se hidroliza para liberar el componente ácido carboxílico del sustrato y regenerar el enzima libre. Así, una molécula de *p*-nitrofenolato se produce rápidamente a partir de cada molécula de enzima cuando se forma el intermediario acil-enzima. Sin embargo, necesita más tiempo para que el enzima pueda reiniciar un nuevo ciclo catalítico, para lo cual requiere la hidrólisis del intermediario acil-enzima. Ambos pasos son necesarios para el recambio del enzima.

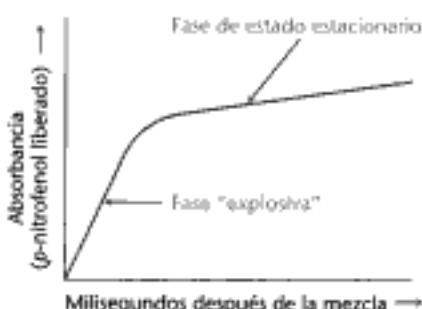


Figura 9.4 Cinética de la catálisis por quimotripsina. En la ruptura del éster *p*-nitrofenilo de *N*-acetil-L-fenilalanina mediante quimotripsina se observan dos etapas: una fase "explosiva" rápida (estado preestacionario) y una fase de estado estacionario.

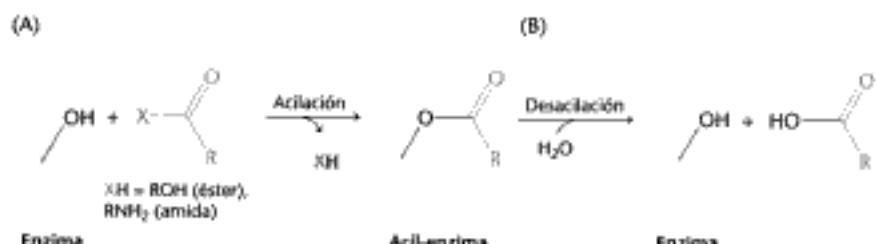


Figura 9.5 Catálisis covalente. La hidrólisis mediante quimotripsina tiene lugar en dos etapas: la acilación (A) para formar el intermediario acil-enzima, seguido por la desacilación (B) para regenerar el enzima libre.

La serina forma parte de una triada catalítica que incluye también a la histidina y al aspartato

La estructura tridimensional de la quimotripsina fue resuelta por David Blow en 1967. En conjunto, la quimotripsina es aproximadamente esférica y consta de tres cadenas polipeptídicas enlazadas por puentes disulfuro. Se sintetiza como un polipéptido único, denominado *quimotripsinógeno*, y se activa por la ruptura proteolítica del polipéptido

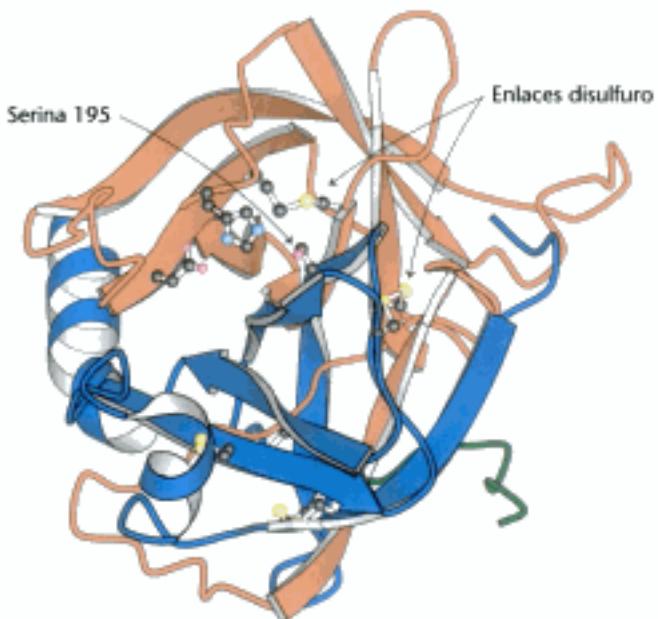


Figura 9.6 Localización del centro activo de la quimotripsina. La quimotripsina consta de tres cadenas que se muestran en forma de cintas de color naranja, azul y verde. Las cadenas laterales de los residuos de la triada catalítica se muestran como modelo de esferas y varillas. Nótese que estas cadenas laterales, incluida la de la serina 195, rodean el centro activo en la parte superior de la estructura. Fíjese también en los dos puentes disulfuro intracatenarios y los dos intermedios situados en diferentes localizaciones a lo largo de la molécula. [Tomado de 1GCT, pdb.]

para proporcionar tres cadenas (p. 289). El centro activo de la quimotripsina, señalado por la serina 195, se encuentra en una hendidura sobre la superficie del enzima (Figura 9.6). La estructura del centro activo explica la especial reactividad de la serina 195 (Figura 9.7). La cadena lateral de la serina 195 forma un puente de hidrógeno con el anillo imidazol de la histidina 57. El grupo $-NH$ de este anillo imidazol se encuentra, a su vez, formando un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato del ácido aspártico 102. Esta constelación de residuos se denomina triada catalítica. ¿Cómo conduce esta disposición de residuos a la alta reactividad de la serina 195? El residuo de histidina se encuentra próximo a la posición de la cadena lateral de serina para polarizar a su grupo hidroxilo dejándolo preparado para su desprotonación. En presencia del sustrato, acepta el protón del grupo hidroxilo de la serina 195. Actuando así, el residuo funciona como un catalizador básico general. La retirada del protón del grupo hidroxilo genera un ion alcóxido que tiene mucho mayor poder nucleofílico que un alcohol. El residuo de aspartato ayuda a orientar al residuo de histidina y lo convierte, a través de efectos electrostáticos, en un mejor acceptor del protón.

Estas observaciones sugieren un mecanismo para la hidrólisis peptídica (Figura 9.8). Después de la unión del sustrato (paso 1), la reacción comienza con el átomo de oxígeno de la cadena lateral de la serina 195 que lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono carbonílico del enlace peptídico diana (paso 2). Ahora hay cuatro átomos enlazados al carbono carbonílico, formando un tetraedro, en vez de tres átomos en una disposición plana. La inestabilidad inherente al *intermediario tetraédrico* formado mantiene una carga negativa formal sobre el átomo de oxígeno derivado del grupo carbonílico. Esta carga se estabiliza mediante interacciones con grupos $-NH$ de la proteína en un centro denominado *cavidad del oxianión* (Figura 9.9). Estas interacciones ayudan también a estabilizar el estado de transición que precede

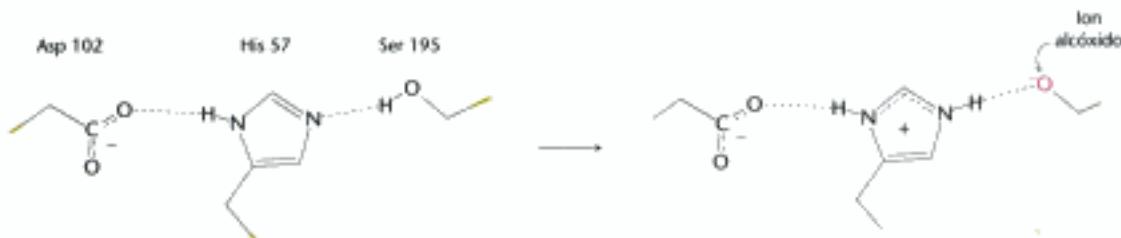


Figura 9.7 La triada catalítica. La triada catalítica, mostrada a la izquierda, convierte a la serina 195 en un potente nucleófilo, tal y como se ilustra a la derecha.

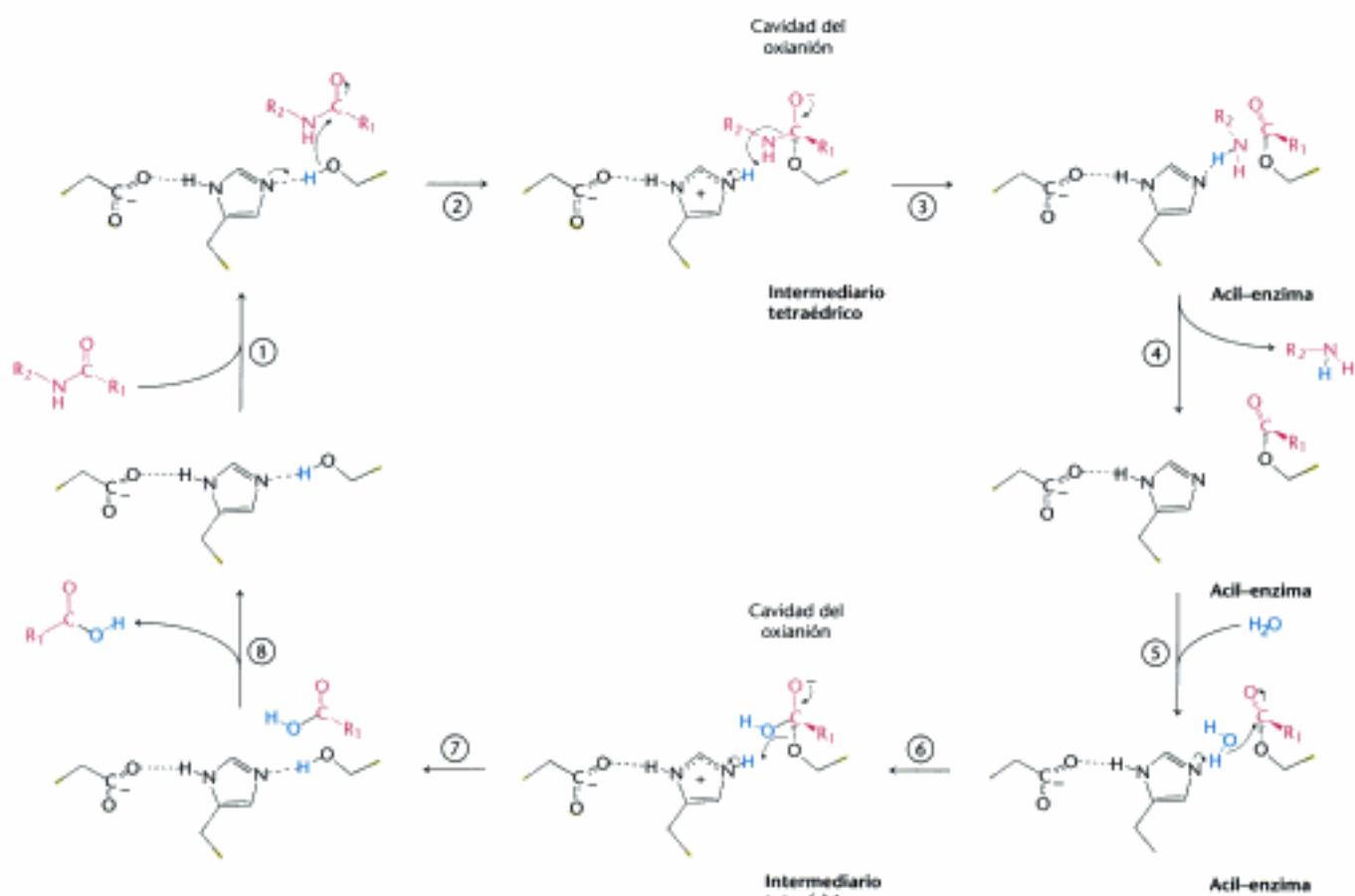


Figura 9.8 Hidrólisis peptídica por quimotripsina. El mecanismo de hidrólisis peptídica ilustra los principios de la catálisis ácido-base y covalente. La reacción transcurre en ocho pasos: (1) unión del sustrato, (2) ataque nucleasefílico de la serina sobre el grupo carbonilo peptídico, (3) el intermediario tetraédrico se colapsa, (4) el componente amina se libera, (5) unión del agua, (6) ataque nucleofílico del agua sobre el intermediario acil-enzima, (7) el intermediario tetraédrico se colapsa, (8) el componente ácido carboxílico se libera. Las líneas verdes de puntos discontinuos indican puentes de hidrógeno.

a la formación del intermediario tetraédrico. Después, este intermediario tetraédrico se colapsa para generar el acil-enzima (paso 3). Este paso se facilita mediante la transferencia de un protón desde el residuo de histidina cargado positivamente al grupo amino formado por la ruptura del enlace peptídico. El componente amino se encuentra ahora libre para apartarse del enzima (paso 4) completando la primera etapa de la reacción hidrolítica o acilación del enzima.

El paso siguiente, la desacilación, comienza cuando una molécula de agua se sitúa en el lugar ocupado anteriormente por el componente amina del sustrato (paso 5). El grupo éster del acil-enzima se hidroliza ahora mediante un proceso que esencialmente es la repetición de los pasos 2, 3 y 4. Ahora, la histidina 57 actúa como un catalizador básico general, separando el protón de la molécula de agua. El ion hidroxido resultante ataca al átomo de carbono carbonilo del grupo acilo, formando un intermediario tetraédrico (paso 6). Esta estructura se descompone para formar el producto ácido carboxílico (paso 7). Finalmente, la liberación del producto ácido carboxílico (paso 8) pone a punto al enzima para desarrollar otro ciclo catalítico.

Este mecanismo explica todas las características de la acción de la quimotripsina excepto la preferencia observada para romper enlaces peptídicos justo después de los residuos con cadenas laterales hidrofóbicas voluminosas. El examen de la estructura tridimensional de la quimotripsina con análogos del sustrato e inhibidores enzimáticos reveló la presencia de un profundo bolsillo relativamente hidrofóbico, llamado bolsillo S₁, en el cual pueden acomodarse las largas cadenas laterales no cargadas de residuos como fenilalanina y triptófano. *La unión de una cadena lateral apropiada*

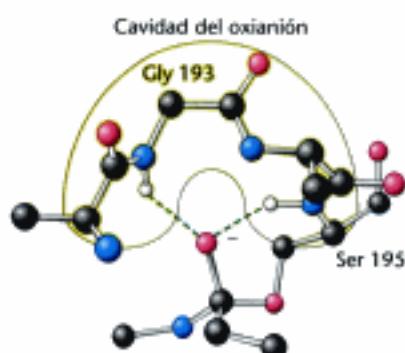
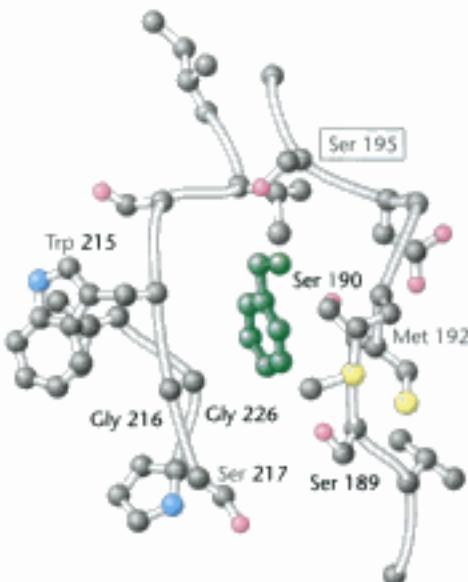


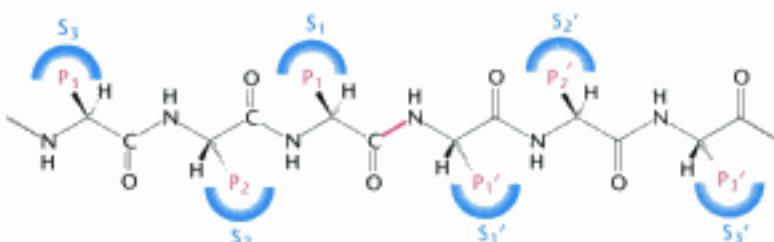
Figura 9.9 La cavidad del oxoanión. La estructura estabiliza el intermediario tetraédrico de la reacción catalizada por quimotripsina. Nótese que los puentes de hidrógeno (en verde) se unen a los grupos --NH peptídicos y al átomo de oxígeno negativamente cargado del intermediario.

Figura 9.10 Especificidad del bolsillo de la quimotripsina. Nótese que este bolsillo relativamente profundo se encuentra alineado con residuos relativamente hidrofóbicos, favoreciendo la unión de los residuos con cadenas laterales largas e hidrofóbicas como la de la fenilalanina (en verde). Nótese también que el residuo de serina del centro activo (serina 195) está posicionado para romper el esqueleto peptídico entre el residuo enlazado en el bolsillo y el siguiente residuo de la secuencia. Los aminoácidos claves que constituyen el centro activo se encuentran marcados.



en el interior de este bolsillo coloca en el centro activo al enlace peptídico adyacente para su ruptura (Figura 9.10). La especificidad de la quimotripsina depende casi completamente de cuál sea el aminoácido situado en el lado amino terminal del enlace peptídico que se va a escindir. Otras proteasas tienen modelos de especificidad más complejos, como se ilustra en la Figura 9.11. Estos enzimas tienen bolsillos adicionales sobre su superficie para el reconocimiento de otros residuos del sustrato. Los residuos sobre el lado amino terminal del enlace escindible (el enlace que se va a romper) se denominan P_1 , P_2 , P_3 , y así sucesivamente, indican su posición con respecto al enlace escindible. Igualmente, los residuos del lado carboxílico del enlace escindible se denominan P'_1 , P'_2 , P'_3 , y así sucesivamente. Los centros correspondientes en el enzima se refieren como S_1 , S_2 , o S'_1 , S'_2 , y así sucesivamente.

Figura 9.11 Nomenclatura para la especificidad de las interacciones proteasa-sustrato. Los centros potenciales de interacción de los sustratos con el enzima se designan como P (en rojo) y los correspondientes centros de unión en el enzima se designan como S . El enlace escindible (también señalado en rojo) es el punto de referencia.



Las triadas catalíticas se encuentran en otros enzimas hidrolíticos

Posteriormente se ha encontrado que otras muchas proteínas contienen triadas catalíticas similares a la descubierta en la quimotripsina. Algunas, como tripsina y elastasa, obviamente son homólogas a la quimotripsina. Las secuencias de estas proteínas son aproximadamente un 40% idénticas a la de la quimotripsina, y sus estructuras en su conjunto son casi las mismas (Figura 9.12). Estas proteínas funcionan mediante mecanismos idénticos a los de la quimotripsina. Sin embargo tienen especificidades muy diferentes por el sustrato. La quimotripsina rompe el enlace peptídico después de residuos con largas cadenas laterales apolares o aromáticas. La tripsina rompe el enlace peptídico después de residuos con largas cadenas laterales cargadas positivamente, a saber, la arginina y la lisina, mientras que la elastasa rompe el enlace peptídico después de aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, como la alanina y la serina. La comparación de los bolsillos S_1 de estos enzimas revela que estas especificidades diferentes se deben a pequeñas diferencias estructurales. En la tripsina, en el fondo del bolsillo S_1 está presente un residuo de aspartato (Asp 189),

en lugar del residuo de serina de la quimotripsina. El residuo de aspartato atrae y estabiliza a un residuo de arginina o lisina del sustrato cargado positivamente. En la elastasa, los dos residuos de la parte superior del bolsillo de la quimotripsina y tripsina se sustituyen por otros de valina más voluminosos (Val 190 y Val 216). Estos residuos cierran la boca del bolsillo, de forma que de esta manera sólo pueden entrar cadenas laterales aminoacídicas pequeñas (Figura 9.13).

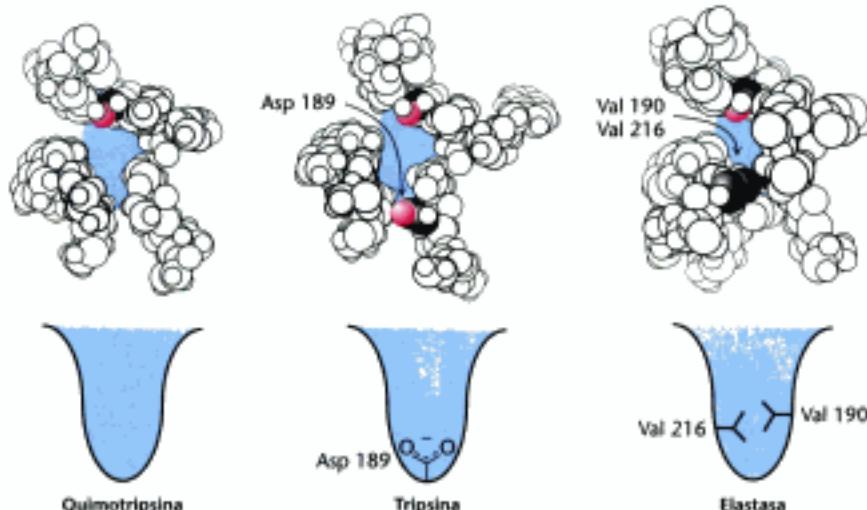


Figura 9.13 Los bolsillos S₁ de quimotripsina, tripsina y elastasa. En la determinación de la especificidad de estos enzimas, algunos residuos desempeñan un papel clave. Las cadenas laterales de estos residuos, así como los residuos de serina del centro activo, se muestran en color.

En el Capítulo 10 se estudian otros miembros de la familia de la quimotripsina incluidos en una serie de proteínas que toman parte en la coagulación de la sangre, así como de antígenos específicos de proteínas prostáticas (PSA, "prostate specific antigen") marcadores de tumores. Además, también pertenecen a este grupo una amplia gama de proteasas encontradas en bacterias, virus y plantas.

Se han encontrado otros enzimas no homólogos a la quimotripsina que contienen centros activos muy similares. Como se describió en el Capítulo 6, la presencia de centros activos muy similares en estas diferentes familias de proteínas es una consecuencia de la evolución convergente. Un ejemplo particular bien caracterizado es la subtilisina, una proteasa de bacterias, como *Bacillus amyloliquefaciens*. El centro activo de este enzima incluye la triada catalítica y la cavidad del oxianión. Sin embargo, uno de los grupos -NH que forman la cavidad del oxianión viene de la cadena lateral de un residuo de asparagina en vez de la misma cadena peptídica (Figura 9.14). La subtilisina es el miembro fundador de otra gran familia de proteasas que incluyen representantes de árqueas, bacterias y eucariotas.

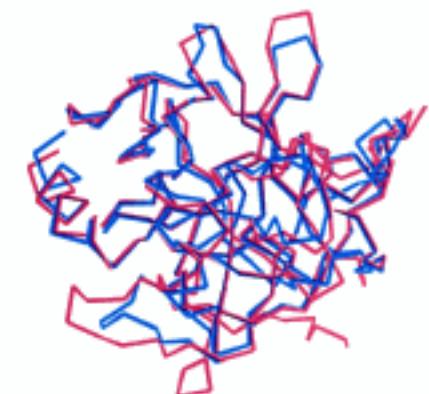
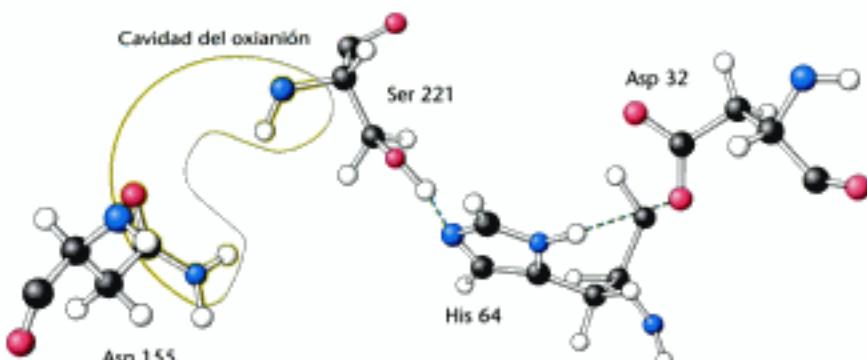


Figura 9.12 Semejanzas estructurales entre tripsina y quimotripsina. La superposición de la estructura de la quimotripsina (en rojo) sobre la de tripsina (en azul) muestra el alto grado de similitud. Sólo se representan las posiciones de los carbonos α . La desviación media correspondiente a la posición entre los átomos de carbonos α es de 1,7 Å. [Tomado de 5PTP.pdb y 1GCT.pdb.]

Figura 9.14 La triada catalítica y la cavidad del oxianión de subtilisina. Nótese que los dos grupos NH del enzima están localizados en la cavidad del oxianión (uno en la estructura del enlace peptídico y el otro en la cadena lateral de Asn 155). El enlace peptídico atacado por el residuo nucleofílico de la serina 221 de la triada catalítica desarrolla una carga negativa que se estabiliza por los dos grupos NH del enzima.

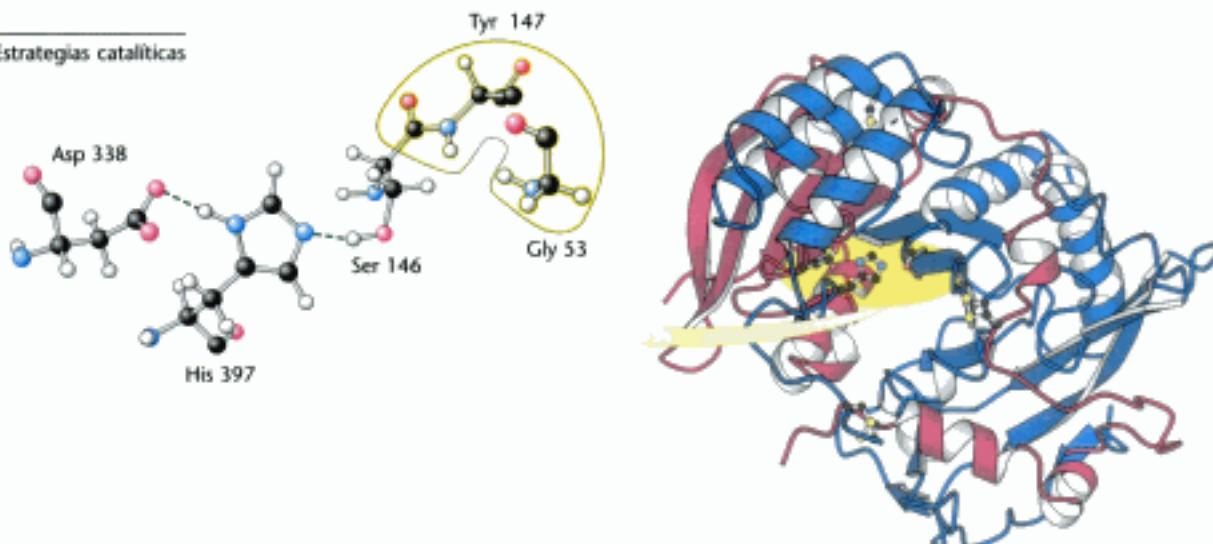


Figura 9.15 Carboxipeptidasa II. La estructura de la carboxipeptidasa II del trigo (derecha) se ilustra con sus dos cadenas (azul y roja). La triada catalítica de la carboxipeptidasa II (izquierda) se compone de los mismos aminoácidos que la quimotripsina, a pesar de que los enzimas no manifiestan ninguna similitud estructural. Los residuos que conforman la cavidad del oxanión están señalados en amarillo. Esta proteína es miembro de una familia de proteínas homólogas muy interesante que incluyen esterasas como la acetilcolina esterase y algunas lipasas. Todos estos enzimas utilizan reactivos nucleófilos de cisteína en vez de serina, pero también utilizan nucleófilos activados de histidina. [Tomado de 1WHS.pdb.]

Otro ejemplo de la triada catalítica se ha encontrado en la carboxipeptidasa II del trigo. La estructura de este enzima no es significativamente parecida a la de quimotripsina o subtilisina (Figura 9.15).

Finalmente, se han descubierto otras proteasas que contienen residuos de serina o treonina en el centro activo y no se activan por la pareja histidina-aspartato sino por un grupo amino primario de la cadena lateral de lisina o por el grupo amino N-terminal de la cadena polipeptídica.

Así, en el curso de la evolución, la triada catalítica de las proteasas ha surgido al menos tres veces. Podemos concluir que esta estrategia catalítica es un planteamiento especialmente eficaz para la hidrólisis de enlaces peptídicos y otros relacionados.

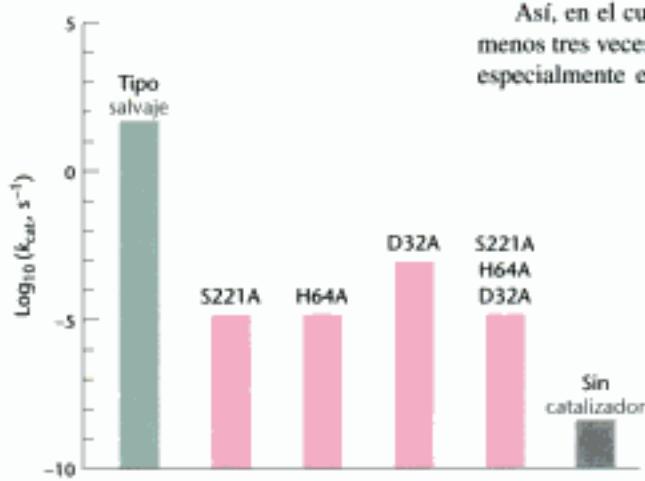


Figura 9.16 Mutagénesis dirigida de la subtilisina. Los residuos de la triada catalítica se mutaron a alanina y se midió la actividad del enzima mutado. Las mutaciones en algún componente de la triada catalítica causaron una pérdida espectacular de la actividad del enzima. Obsérvese que la actividad se expone sobre una escala logarítmica. Las mutaciones se identifican de la siguiente manera: la primera letra corresponde a la abreviatura de una sola letra del aminoácido que ha sido modificado; el número identifica la posición del residuo en la estructura primaria; y la segunda letra es la abreviatura de una sola letra del aminoácido que sustituye al original. Sin catalizador se refiere a la velocidad estimada para la reacción en ausencia del enzima.

La triada catalítica se ha analizado minuciosamente mediante mutagénesis dirigida

¿Cómo se puede asegurar que es correcto el mecanismo propuesto para la triada catalítica? En particular, la mutagénesis dirigida se ha utilizado para probar la contribución de los residuos individuales de los aminoácidos al poder catalítico de una proteasa (Sección 5.2). La subtilisina se ha estudiado exhaustivamente por este método. Cada uno de los residuos de la triada catalítica: el ácido aspártico 32, la histidina 64 y la serina 221, se han convertido individualmente en alanina y así se ha examinado la capacidad de cada enzima mutante para romper un sustrato modelo (Figura 9.16).

Como se esperaba, la sustitución de la serina 221 del centro activo por alanina disminuyó drásticamente el poder catalítico; el valor de k_{cat} disminuyó 10^6 veces su valor con respecto al enzima de tipo salvaje. El valor de K_M esencialmente no varió: su incremento de una a dos veces indicó que la unión del sustrato no está afectada de forma significativa. La mutación de la histidina 64 a alanina tuvo efectos muy similares. La conversión del aspartato 32 en alanina tuvo un efecto menor, aunque el valor de

k_{cat} todavía bajó a menos del 0,005% de su valor en el tipo salvaje. La conversión simultánea de los tres residuos de la triada catalítica en alanina no fue más perjudicial que la conversión de sólo serina o histidina. Estas observaciones apoyan la idea de que la pareja serina-histidina actúa conjuntamente para generar un nucleófilo de suficiente potencia para atraer al grupo carbonilo de un enlace peptídico. A pesar de la reducción en su poder catalítico, los enzimas mutados hidrolizan todavía a los péptidos 1000 veces más rápido que lo hace el amortiguador solo a pH 8,6.

Mediante la mutagénesis dirigida es posible probar la importancia de la cavidad del oxianión para la catálisis. El cambio de la asparragina 155 por glicina sustituye el grupo NH de la cadena lateral en la cavidad del oxoanión de la subtilisina. La sustitución de la asparragina 155 por glicina disminuyó el valor de k_{cat} al 0,2% de su valor en el tipo salvaje, pero aumentó solamente el valor de K_M unas dos veces. Estas observaciones demostraron que el grupo –NH del residuo de asparragina desempeña un papel fundamental en la estabilización del intermediario tetraédrico y del estado de transición que se produce.

Las cisteinoproteasas, aspartilproteasas y metaloproteasas son otras clases importantes de enzimas que escinden péptidos

► No todas las proteasas utilizan estrategias basadas en residuos de serina activados. Se han descubierto otras clases de proteínas que emplean tres opciones alternativas para la hidrólisis de enlaces peptídicos (Figura 9.17). Estas cla-

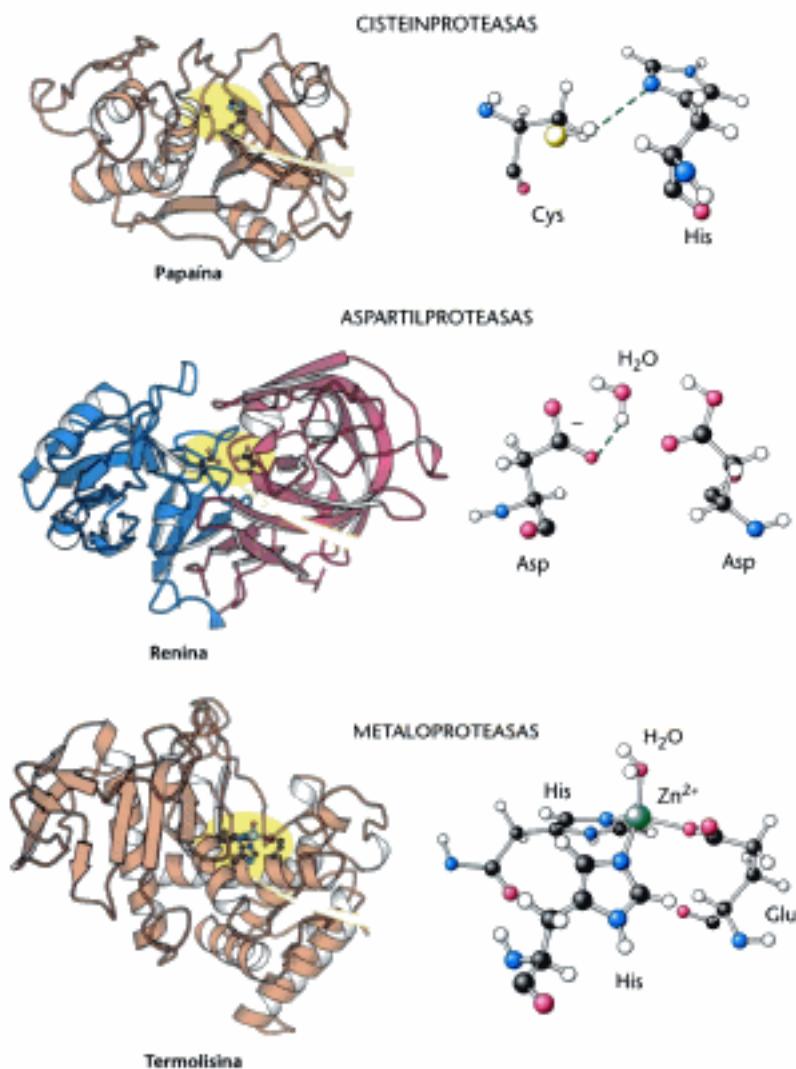


Figura 9.17 Tres clases de proteasas y sus centros activos. Estos ejemplos de una cisteinoproteasa, una aspartilproteasa y una metaloproteasa utilizan como nucleófilo, respectivamente, un residuo de cisteína activado por histidina, una molécula de agua activada por aspartato y una molécula de agua activada por metal. Las dos mitades de la renina se destacan en azul y rojo para subrayar la aproximada simetría binaria de las aspartilproteasas. [Tomado de 1PPN.pdb.; 1HRN.pdb.; 1LND.pdb.]

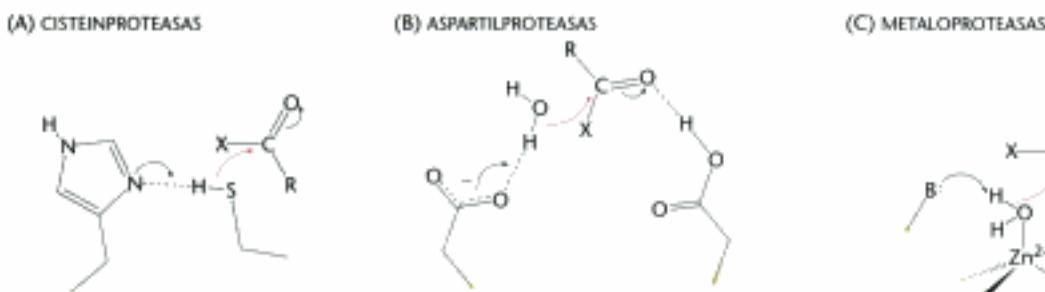


Figura 9.18 Las estrategias de activación para tres clases de proteasas. El grupo carbonilo peptídico recibe el ataque de: (A) una cisteína activada por histidina en las cisteinoproteasas, (B) una molécula de agua activada por aspartato en las aspartilproteasas y (C) una molécula de agua activada por metal en la metaloproteasas. Para las metaloproteasas, la letra B representa una base (a menudo glutamato) que participa en la desprotonación de la molécula de agua enlazada al metal.

ses son: (1) cisteinoproteasas, (2) aspartilproteasas y (3) metaloproteasas. En cada caso, la estrategia consiste en generar un nucleófilo que ataca al grupo carbonilo del péptido (Figura 9.18).

La estrategia utilizada por las cisteinoproteasas es la más similar a la utilizada por la familia de la quimotripsina. En estos enzimas, un residuo de cisteína activado por un residuo de histidina, juega el papel de nucleófilo que ataca al enlace peptídico (Figura 9.18), de forma totalmente análoga a como lo hace el residuo de serina en las serinoproteasas. Un ejemplo ideal de estas proteínas es la papaína, un enzima purificado a partir de la fruta de la papaya. Se han descubierto en mamíferos proteasas homólogas a la papaína, muy especialmente las catepsinas, que son proteínas que desempeñan un papel importante en el sistema inmune y en otros sistemas. El centro activo basado en la cisteína surgió al menos dos veces en el curso de la evolución de forma independiente; las caspasas, enzimas que en la apoptosis (p. 535) tienen centros activos similares a los de papaína, pero sus estructuras globales no están relacionadas en absoluto con ella.

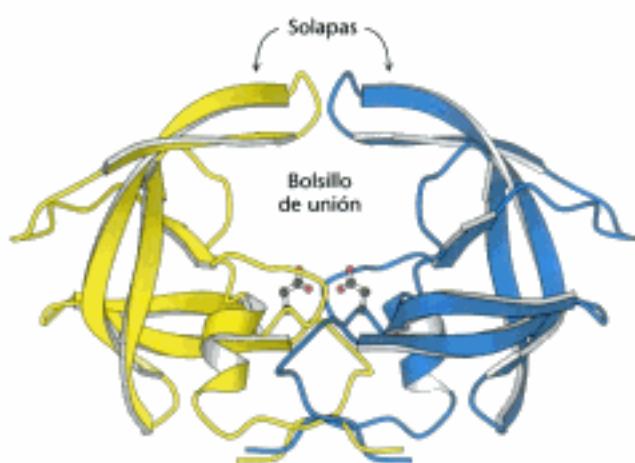


Figura 9.19 Una aspartilproteasa dimérica: la proteasa del HIV. La proteasa es un dímero de subunidades idénticas (en azul y amarillo), que contienen 99 aminoácidos cada una. Nótese la colocación del residuo de ácido aspártico en el centro activo, uno de cada cadena, que se muestran como estructuras de esferas y varillas. Después de la unión del sustrato, las solapas se cierran sobre el bolsillo de unión. [Tomado de 3PHV.pdb.]

La segunda clase comprende a las *aspartilproteasas*. La característica central de los centros activos es una pareja de residuos de ácido aspártico que actúan juntos para favorecer el ataque de una molécula de agua al enlace peptídico. Uno de los residuos de ácido aspártico (en su forma desprotonada) activa a la molécula de agua atacante equilibrándola para su desprotonación. El otro residuo de ácido aspártico (en su forma protonada) polariza el carbonilo peptídico aumentando su susceptibilidad al ataque (ver figura 9.18). Miembros de esta clase incluyen a la renina, un enzima que tiene un papel en la regulación de la presión sanguínea, y a la pepsina, que es un enzima digestivo. Estas proteínas poseen aproximadamente simetría binaria, sugiriendo que las dos mitades están relacionadas evolutivamente. Un argumento probable es que dos copias del gen del enzima ancestral se fusionaron para formar un gen único que codificó un enzima con una sola cadena polipeptídica. Cada copia del gen podría haber contribuido con un residuo de aspartato en el centro activo del enzima. El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y otros retrovirus contienen una aspartilproteasa cuyas cadenas individuales están ahora unidas formando una única cadena (Figura 9.19). Esta observación concuerda con la idea de que el enzima existió originalmente con subunidades separadas.

Las *metaloproteasas* constituyen la última clase principal de enzimas que escinden péptidos. El centro activo de estas proteínas contiene un ion metálico unido, casi siempre zinc, que activa a una molécula de agua para actuar como nucleófilo y atacar al grupo carbonilo del enlace peptídico. El enzima bacteriano termolisinina y el enzima digestivo carboxipeptidasa A son ejemplos clásicos de proteasas con zinc. La termolisinina, pero no la carboxipeptidasa A, es miembro de una familia grande y diversa de proteasas de zinc homólogas que incluyen a las metaloproteasas de la matriz, enzimas que catalizan reacciones de remodelación y degradación de los tejidos.

En cada una de estas tres clases de enzimas, el centro activo incluye características que (1) permiten la activación del agua u otro agente nucleofílico, (2) polarizan el grupo carbonilo del enlace peptídico y (3) estabilizan a un intermediario tetraédrico (Figura 9.18).

Los inhibidores de las proteasas son fármacos importantes

 Algunos fármacos importantes son inhibidores de proteasas. Por ejemplo, el captopril, un inhibidor del enzima convertidor de la angiotensina (ACE, "angiotensin-converting enzyme"), una metaloproteasa, se ha utilizado para regular la presión sanguínea. El retrovir, el indinavir (Crixivan), y otros 20 compuestos más que se utilizan en el tratamiento del SIDA, son inhibidores de la proteasa HIV, una aspartilproteasa. Esta proteasa rompe las proteínas víricas multidominio en sus formas activas; si se bloquea este proceso, se impide que el virus llegue a ser infeccioso (Figura 9.19). Para impedir los efectos secundarios no deseados, los inhibidores de proteasas utilizados como fármacos deben ser específicos para un enzima sin inhibir a otras proteínas del organismo.

El indinavir se asemeja al sustrato peptídico de la proteasa del HIV. Este fármaco se construye en torno a un alcohol que imita al intermediario tetraédrico; tiene otros grupos para unirse a los centros de reconocimiento del enzima S_2 , S_1 , S_1' y S_2' (Figura 9.20). Los resultados de los estudios de cristalografía de rayos X revelan que, en el centro activo, el indinavir adopta una conformación que se aproxima a la simetría binaria del enzima (Figura 9.21). El centro activo de la proteasa del HIV se cubre por dos solapas aparentemente flexibles que se cierran o se abren sobre el inhibidor enlazado. El grupo hidroxilo del alcohol central interacciona con dos residuos de aspartato del centro activo, uno de cada subunidad. Además, los dos grupos carbonilo del inhibidor forman puentes de hidrógeno con una molécula de agua (no se muestra en la Figura 9.21), la cual, a su vez, forma puentes de hidró-

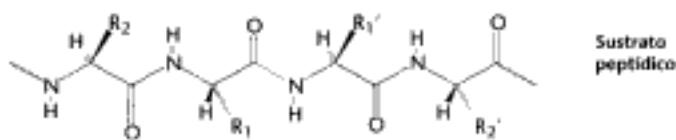
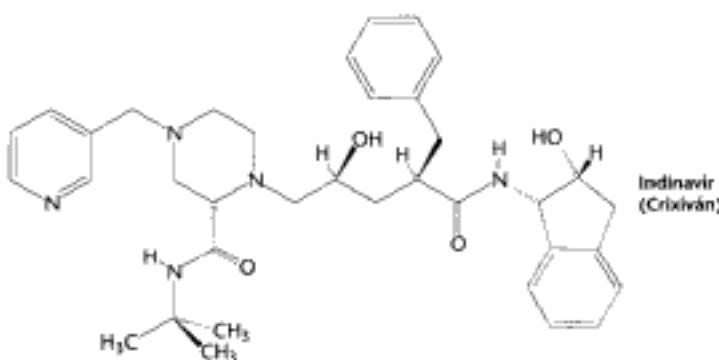


Figura 9.20 El indinavir, un inhibidor de proteasa del HIV. Se muestra la estructura del indinavir (crixiván) en comparación con la proteasa del HIV. El enlace escindible en el sustrato está señalado en rojo.

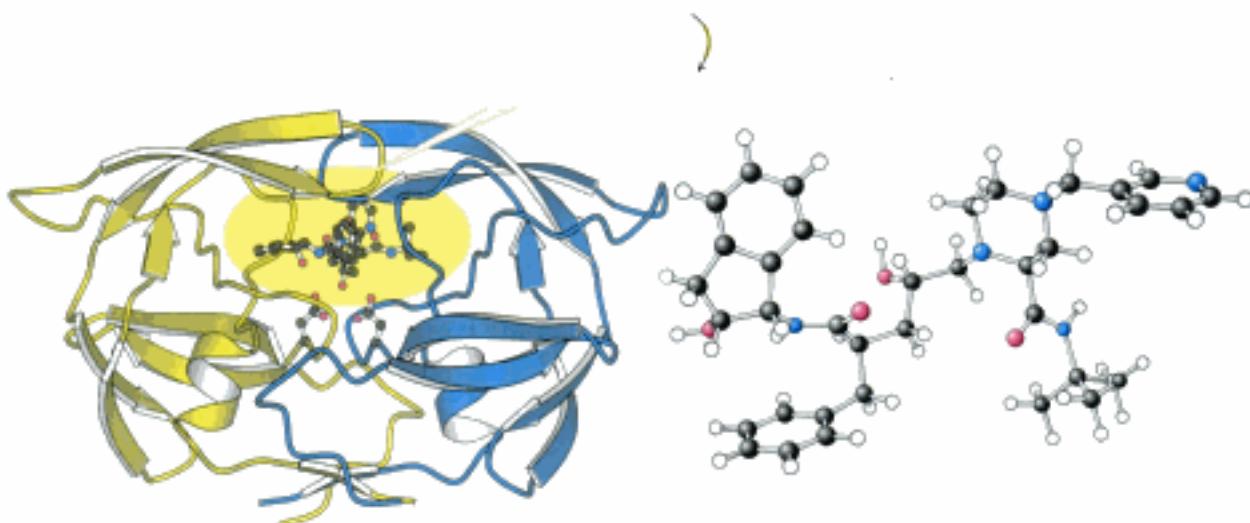
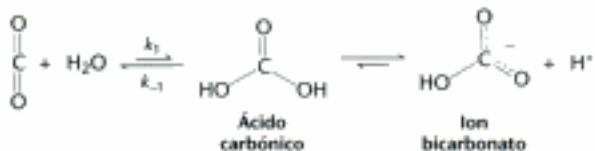


Figura 9.21 Complejo indinavir-proteasa del HIV. (Izquierda) Se muestra la proteasa del HIV con el inhibidor indinavir unido en el centro activo. (Derecha) Se ha girado el fármaco para poner en evidencia su aproximada conformación de simetría binaria. [Tomado de 1HSH, pdb.]

geno con el grupo $-NH$ peptídico en cada una de las solapas. Esta interacción del inhibidor con el agua y el enzima no es posible en las aspartilproteasas celulares como la renina, de forma que contribuye a la especificidad del indinavir por la proteasa del HIV.

9.2 Las anhidrasas carbónicas aceleran una reacción rápida

El dióxido de carbono es el principal producto final del metabolismo aerobio. En mamíferos, el dióxido de carbono se libera a la sangre y se transporta a los pulmones para su exhalación. Mientras está en los hematíes, el dióxido de carbono reacciona con el agua (Sección 7.3). El producto de esta reacción es un ácido moderadamente fuerte, el ácido carbónico ($pK_a = 3,5$), el cual se transforma en bicarbonato (HCO_3^-) mediante la pérdida de un protón.



Esta reacción de hidratación, incluso en ausencia de un catalizador, tiene lugar a un ritmo moderado. A 37°C y cerca de pH neutro, la reacción es de segundo orden y la constante de velocidad k_1 es $0,0027 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor corresponde a una constante de velocidad efectiva de primer orden de $0,15 \text{ s}^{-1}$ en agua ($[\text{H}_2\text{O}] = 55,5 \text{ M}$). De forma similar, la reacción inversa, la deshidratación del bicarbonato es relativamente rápida con una constante de velocidad de $k_{-1} = 50 \text{ s}^{-1}$. Estas velocidades de reacción corresponden a una constante de equilibrio de $K_1 = 5,4 \times 10^{-5}$ y una relación $[\text{CO}_2]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$ de 340:1 en el equilibrio.

Con frecuencia, la hidratación de CO_2 y la deshidratación de HCO_3^- están acoplados a procesos rápidos, especialmente procesos de transporte. Así, casi todos los organismos contienen enzimas, denominados *anhidrasas carbónicas*, que aumentan la velocidad de reacción por encima de la más que razonable velocidad

espontánea. Por ejemplo, el HCO_3^- en la sangre tiene que deshidratarse para formar CO_2 para su liberación cuando la sangre pasa a través de los pulmones. Por el contrario, el CO_2 debe convertirse en HCO_3^- para la generación del humor acuoso del ojo y de otras secreciones. Además, ambos, CO_2 y HCO_3^- , son sustratos y productos para una serie de enzimas, y es necesaria la interconversión rápida de estas especies para asegurar los niveles de sustrato apropiados. Estos enzimas son muy importantes en humanos, y se ha encontrado que las mutaciones en algunas anhidrasas carbónicas causan osteopetrosis (formación excesiva de huesos densos acompañada de anemia) y retraso mental.

Las anhidrasas carbónicas aceleran de forma drástica la hidratación del CO_2 . La mayor parte de los enzimas activos hidratan el CO_2 a velocidades tan altas como $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$, es decir, un millón de veces por segundo. Procesos físicos fundamentales como la difusión y la transferencia de protones limitan normalmente la velocidad de la hidratación y por lo tanto se necesitan estrategias especiales para alcanzar unas velocidades tan prodigiosas.

Las anhidrasas carbónicas contienen un ion zinc esencial para la actividad catalítica

Aproximadamente 10 años después del descubrimiento de la anhidrasa carbónica en 1932, se encontró que el enzima contenía zinc unido y que éste hecho era necesario para la actividad catalítica. Este descubrimiento, extraordinario a la vez, hizo de la anhidrasa carbónica el primer enzima conocido que contenía zinc. En la actualidad se conocen cientos de enzimas que contienen zinc. De hecho, más de una tercera parte de todos los enzimas o bien contienen iones metálicos enlazados o bien requieren la adición de dichos iones para su actividad. La reactividad química de los iones metálicos (asociada con sus cargas positivas, con su capacidad para formar enlaces relativamente fuertes pero cinéticamente lábiles y, en algunos casos, con su capacidad para ser estables en más de un estado de oxidación) explica cuáles son las estrategias catalíticas utilizadas por los iones metálicos que se han adoptado a lo largo de la evolución.

Los resultados de los estudios cristalográficos de rayos X han suministrado la información más detallada y directa sobre el centro de unión del zinc en la anhidrasa carbónica. Al menos siete anhidrasas carbónicas, cada una con su propio gen, están presentes en los seres humanos. Todas ellas son claramente homólogas, como se demostró por los niveles importantes de identidad de secuencias. La anhidrasa carbónica II, componente proteico mayoritario de los hematíes sanguíneos, ha sido el enzima más extensamente estudiado (Figura 9.22). Es también una de las anhidrasas carbónicas más activas.

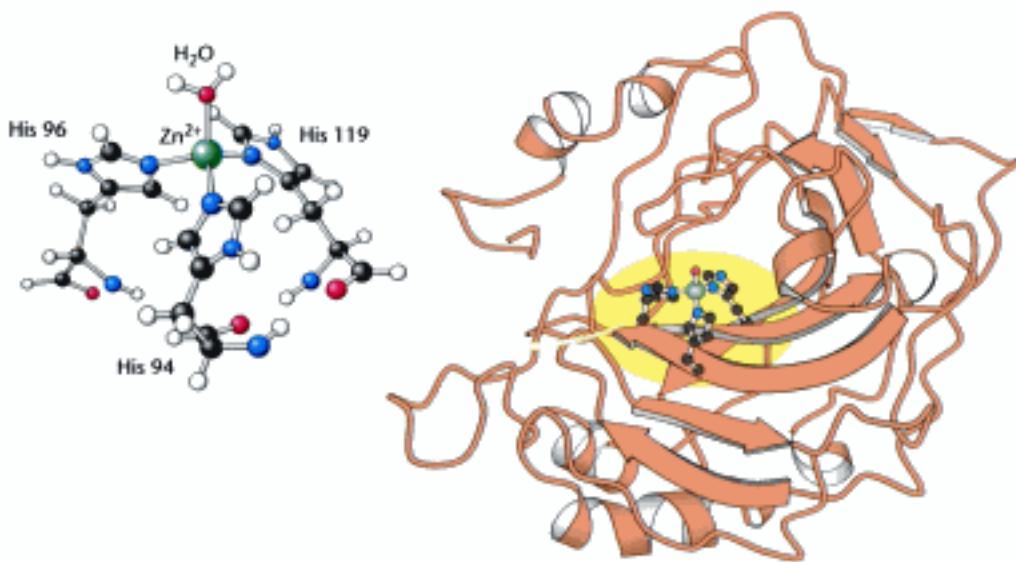


Figura 9.22 Estructura de la anhidrasa carbónica II humana y su centro de unión del zinc. (Izquierda) Nótese que el ion zinc se une a los anillos de imidazol de tres residuos de histidina y además a una molécula de agua. (Derecha) Nótese la localización en el enzima del centro de unión del zinc en una hendidura próxima al centro activo del enzima. [Tomado de 1CA2.pdb.]

En los sistemas biológicos, el zinc se encuentra solamente en el estado de oxidación +2. Un átomo de zinc siempre va unido a cuatro o más ligandos; en la anhidrasa carbónica, tres centros de coordinación están ocupados por los anillos de imidazol de tres residuos de histidina, y un centro de coordinación adicional está ocupado por una molécula de agua (o ion hidróxido, dependiendo del pH). La carga global del complejo $\text{Zn}(\text{His})_3$ permanece como +2, debido a que todas las moléculas que ocupan los centros de coordinación son neutras.

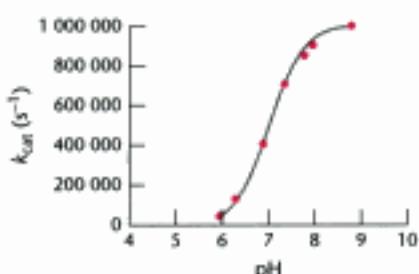


Figura 9.23 Efecto del pH sobre la actividad de la anhidrasa carbónica. Los cambios en el pH modifican la velocidad de hidratación del dióxido de carbono catalizada por la anhidrasa carbónica II. El enzima tiene la máxima actividad a pH alto.

La catálisis supone la activación del agua por el zinc

¿Cómo este complejo de zinc facilita la hidratación del dióxido de carbono? Una pista importante fue el perfil del pH en la hidratación del dióxido de carbono catalizada enzimáticamente (Figura 9.23).

A pH 8, la reacción se encuentra cerca de su velocidad máxima. Cuando el pH disminuye la velocidad de la reacción decrece. El punto medio de esta transición está cerca de pH 7, sugiriendo que un grupo que pierde un protón a pH 7 ($\text{p}K_a = 7$) ejerce un papel importante en la actividad de la anhidrasa carbónica y que la forma desprotonada (a pH alto) de este grupo participa en la catálisis con más eficacia. Aunque algunos aminoácidos, principalmente histidina, tienen valores de $\text{p}K_a$ cercanos a 7, *diversas evidencias sugieren que el grupo responsable de esta transición no es ningún aminoácido, sino la molécula de agua unida al zinc*.

La unión de una molécula de agua al centro de zinc cargando positivamente reduce el $\text{p}K_a$ de la molécula de agua desde 15,7 a 7 (Figura 9.24). Con el pH neutro se genera una concentración importante de ion hidróxido (unido al zinc).

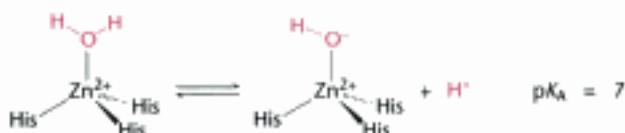


Figura 9.24 $\text{p}K_a$ del agua unida al zinc. La unión al zinc disminuye el $\text{p}K_a$ del agua desde 15,7 hasta 7.

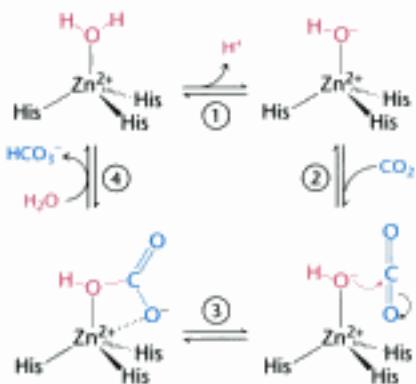


Figura 9.25 Mecanismo de la anhidrasa carbónica. Una característica de la catálisis por ion metálico se manifiesta por la hidratación del dióxido de carbono mediante un mecanismo donde el zinc se encuentra unido al hidróxido. La reacción tiene lugar en cuatro etapas: (1) la desprotonación del agua; (2) la unión del dióxido de carbono; (3) el ataque nucleofílico del hidróxido sobre el dióxido de carbono; y (4) el desplazamiento del ion bicarbonato por el agua.

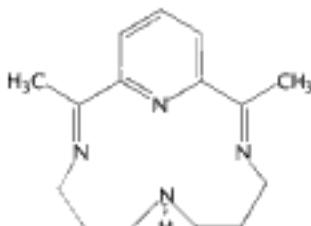
Un ion hidróxido unido al zinc es suficientemente nucleofílico para atacar al dióxido de carbono mucho más rápidamente que lo hace el agua. La importancia de este ion hidróxido unido al zinc sugiere un mecanismo simple para la hidratación del dióxido de carbono (Figura 9.25).

1. El zinc facilita la liberación de un protón de una molécula de agua, lo que genera un ion hidróxido.
2. El sustrato dióxido de carbono se une al centro activo del enzima y se posiciona para reaccionar con el ion hidróxido.
3. El ion hidróxido ataca al dióxido de carbono convirtiéndolo en ion bicarbonato.
4. El centro catalítico se regenera con la liberación del HCO_3^- y la unión de otra molécula de agua.

De este modo, la unión de agua al zinc favorece la formación del estado de transición, conduce a la formación de bicarbonato y facilita la liberación del protón, mediante la atracción de los dos reactantes a una estrecha proximidad.

Una gama de investigaciones apoyan este mecanismo. En particular, los estudios de un sistema modelo con un análogo sintético proporcionan evidencias de su verosimilitud. Como se muestra en la Figura 9.26, un ligando sintético sencillo se une al zinc a través de cuatro átomos de nitrógeno (en comparación con los tres átomos de nitrógeno de histidina en el enzima). En el complejo, una molécula de agua permanece unida al zinc.

(A)



(B)

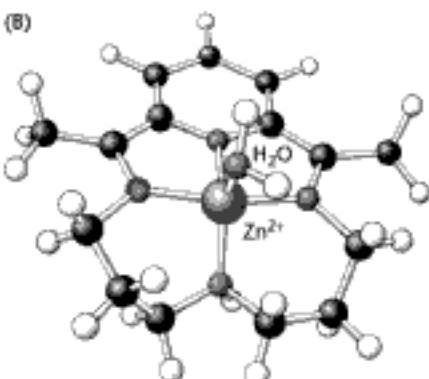


Figura 9.26 Sistema modelo para la anhidrasa carbónica con un análogo sintético. (A) Un compuesto orgánico, capaz de unirse al zinc, se sintetizó como modelo para la anhidrasa carbónica. El complejo de zinc con este ligando acelera más de 100 veces la hidratación del dióxido de carbono, en condiciones apropiadas. (B) Estructura del complejo activo, que muestra el zinc unido al ligando y a una molécula de agua.

nece unida al ion zinc. Medidas directas revelaron que esta molécula de agua tiene un valor de pK_a de 8,7, no tan bajo como el valor para la molécula de agua en la anhidrasa carbónica, pero sustancialmente menor que el valor para el agua libre. A pH 9,2 este complejo acelera la hidratación del dióxido de carbono más de 100 veces. Aunque la velocidad de la catálisis mediante este sistema es mucho menos eficiente que la catálisis por la anhidrasa carbónica, el sistema modelo sugiere firmemente que el mecanismo propuesto del hidróxido unido al zinc, sea probablemente el correcto. La anhidrasa carbónica ha evolucionado para utilizar la reactividad intrínseca del ion hidróxido enlazado al zinc como un catalizador potente.

La regeneración rápida de la forma activa del enzima se facilita mediante una lanzadera de protones

Como anteriormente se indicó, algunas anhidrasas carbónicas hidratan al dióxido de carbono a velocidades tan altas como un millón de veces por segundo (10^6 s^{-1}). La magnitud de esta velocidad se puede comprender a partir de las observaciones siguientes. Al finalizar la reacción de hidratación del dióxido de carbono, la molécula de agua unida al zinc debe perder un protón para regenerar la forma activa del enzima (Figura 9.27). La velocidad de la reacción inversa, es decir, la protonación de ion hidróxido unido al zinc, está limitada por la velocidad de difusión del protón. Los protones difunden muy rápidamente con una constante de velocidad de segundo orden próxima a $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Así, la constante de velocidad inversa, k_{-1} , será menor de $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ya que la constante de equilibrio K es igual a k_1/k_{-1} , la constante de velocidad directa viene dada por $k_1 = K \cdot k_{-1}$. Así pues, si $k_{-1} \leq 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $K = 10^{-7} \text{ M}$ (ya que el $pK_a = 7$), entonces k_1 debe ser menor o igual a 10^4 s^{-1} . En otras palabras, la velocidad de difusión del protón limita la velocidad de liberación del protón a valores menores de 10^4 s^{-1} para un grupo con $pK_a = 7$. Sin embargo, si el dióxido de carbono se hidrata a una velocidad de 10^6 s^{-1} , entonces cada paso del mecanismo (Figura 9.25) tendrá lugar, al menos, con esta rapidez. ¿Cómo se puede resolver esta aparente paradoja?

La respuesta llegó a esclarecerse con la constatación de que *las velocidades más altas para la hidratación del dióxido de carbono requieren la presencia de un amortiguador, sugiriendo que componentes del amortiguador participan en la reacción*. El amortiguador enlaza o libera protones. La ventaja es que, mientras la concentración de protones y de iones hidróxido están limitadas a 10^{-7} M a pH neutro, la concentración de los componentes del amortiguador pueden ser mucho mayores, del orden de varias veces milimolar. Si el componente BH^+ del amortiguador tiene un pK_a de 7 (igual que para la molécula de agua unida al zinc), entonces la constante del equilibrio para la reacción de la Figura 9.28 es 1. La velocidad de sustracción del protón viene dada por

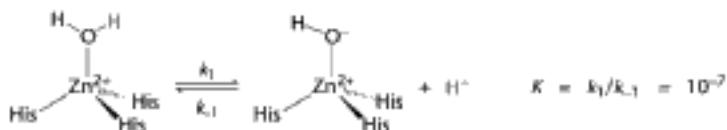
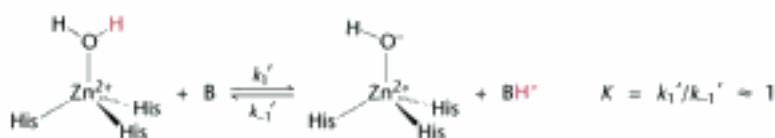


Figura 9.27 Cinética de la desprotonación del agua. Cinética de la desprotonación y protonación de la molécula de agua unida al zinc en la anhidrasa carbónica.

Figura 9.28 Efecto del amortiguador sobre la desprotonación. La desprotonación de la molécula de agua unida al zinc en la anhidrasa carbónica se encuentra favorecida por el componente B del amortiguador.



$k_1' \cdot [B]$. Las constantes de velocidad de segundo orden k_1' y k_{-1}' están limitadas por la difusión del amortiguador a valores menores de aproximadamente $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De esta manera, las concentraciones de amortiguador mayores de $[B] = 10^{-3} \text{ M}$ (1 mM) pueden ser suficientemente elevadas para mantener velocidades de hidratación del dióxido de carbono de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ya que $k_1' \cdot [B] = (10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}) \cdot (10^{-3} \text{ M}) = 10^6 \text{ s}^{-1}$. Esta predicción se confirmó experimentalmente (Figura 9.29).

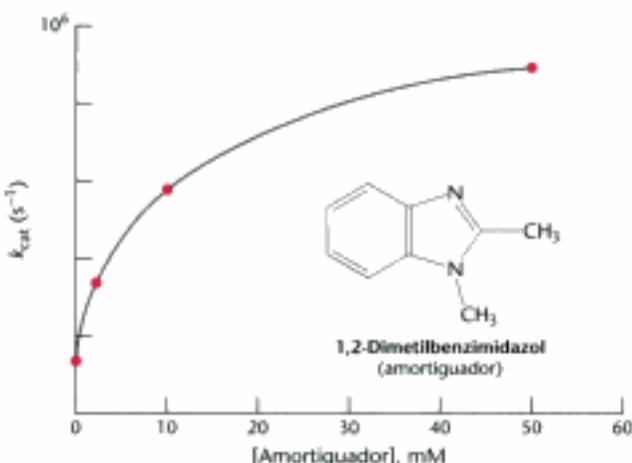


Figura 9.29 Efecto de la concentración del amortiguador en la velocidad de hidratación del dióxido de carbono. La velocidad de hidratación del dióxido de carbono aumenta con la concentración del amortiguador 1,2-dimetilbenzimidazol. El amortiguador permite al enzima alcanzar una velocidad catalítica elevada.

Los componentes moleculares de muchos amortiguadores son demasiado grandes para alcanzar el centro activo de la anhidrasa carbónica. La anhidrasa carbónica II ha desarrollado una *lanzadera de protones* para permitir a los componentes del amortiguador participar en la reacción desde la disolución. El componente primario de esta lanzadera es la histidina 64. Este residuo transfiere protones desde la molécula de agua unida al zinc hasta la superficie de la proteína y después hasta el amortiguador (Figura 9.30). De esta forma, la función catalítica se ha mejorado a través del desarrollo de un sistema que controla la transferencia de protones desde y hacia el centro activo. La manipulación del surtido de protones del centro activo es decisiva para el funcionamiento de muchos enzimas, ya que los protones participan en muchas reacciones bioquímicas, y explica la importancia de la catálisis ácido-base.

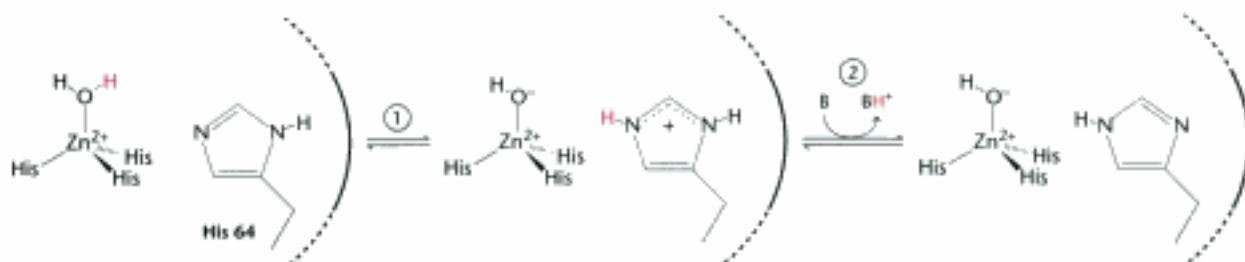


Figura 9.30 La histidina como lanzadera de protones. (1) La histidina 64 capta un protón de la molécula de agua unida al zinc, generando el ion hidróxido nucleófilo y a la histidina protonada. (2) El amortiguador (B) capta el protón de la histidina, regenerando la forma desprotonada.

La evolución convergente ha generado centros activos basados en el zinc en diferentes anhidrasas carbónicas

Las anhidrasas carbónicas homólogas a los enzimas humanos, denominadas *anhidrasas carbónicas α*, son comunes en animales y en algunas bacterias y algas. Además, se han descubierto otras dos familias de anhidrasas carbónicas. Las proteínas de estas familias contienen el zinc requerido para la actividad catalítica,

pero no tienen su secuencia significativamente semejante a las anhidrasas carbónicas α . Las *anhidrasas carbónicas β* se encuentran en plantas superiores y en muchas especies bacterianas, como *E. coli*. Los estudios espectroscópicos y estructurales sugieren que el zinc está enlazado a un residuo de histidina y dos residuos de cisteína. Por otra parte, las estructuras globales de los enzimas no están relacionadas con las de las anhidrasas carbónicas α . Estos enzimas facilitan la acumulación de dióxido de carbono en plantas, etapa crítica del ciclo de Calvin en la fotosíntesis. Se identificó una tercera familia, *las anhidrasas carbónicas γ* , inicialmente en la arquea *Methanococcus thermophila*. La estructura cristalina de este enzima revela tres centros para el zinc sumamente similares a los de las anhidrasas carbónicas α . En este caso, sin embargo, los tres centros del zinc se unen a la interfase entre las tres subunidades del enzima trimérico (Figura 9.31). La estructura muy llamativa de hélice β levógira (una cadena β enrollada en una hélice que gira a la izquierda) presente en este enzima, es también diferente de las estructuras presentes en las anhidrasas carbónicas α y β . Así, la evolución convergente ha generado anhidrasas carbónicas que dependen de iones zinc coordinados en, al menos, tres ocasiones.

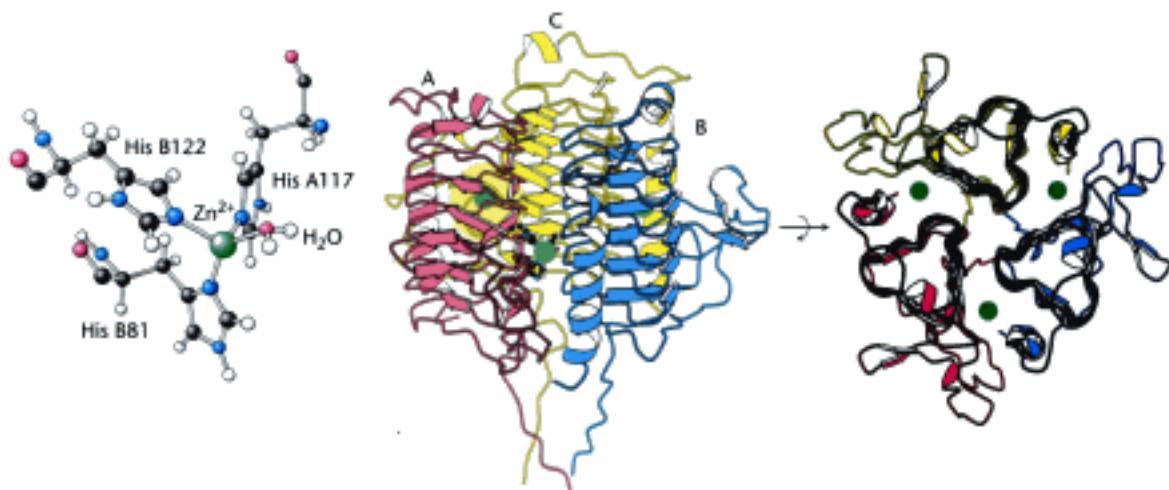


Figura 9.31 Anhidrasa carbónica γ . (Izquierda) El centro de zinc de la anhidrasa carbónica γ . Nótese que el ion zinc unido al agua se encuentra enlazado a tres residuos. (Centro) Estructura trimérica de la proteína (las cadenas individuales se indican como A, B y C). Cada cadena originalmente contiene una hélice β enrollada hacia la izquierda. (Derecha) La proteína se encuentra girada para mostrar una perspectiva de arriba-abajo que pone de manifiesto su simetría ternaria. Nótese la posición de los centros de zinc (verde) en las interfa- ses entre subunidades. [Tomado de 1THJ.pdb.]

9.3 Las enzimas de restricción llevan a cabo la escisión del DNA mediante reacciones muy específicas

Vamos estudiar a continuación una reacción hidrolítica que tiene por resultado la escisión del DNA. Las bacterias y arqueas han desarrollado mecanismos para protegerse por sí mismas de las infecciones víricas. Muchos virus introducen el DNA de su genoma en el interior de las células; una vez dentro, el DNA vírico sequestra la maquinaria celular para impulsar la producción de proteínas víricas y, finalmente, la progenie del virus. A menudo, una infección vírica termina con la muerte de la célula hospedadora. La principal estrategia protectora para el hospedador es el uso de las *endonucleasas de restricción* (enzimas de restricción) que degradan al DNA vírico cuando se introduce en la célula. Estos enzimas reconocen secuencias concretas de bases, llamadas *secuencias de reconocimiento* o *centros de reconocimiento*, en sus DNA diana y escinden al DNA en posiciones definidas. La clase de enzimas de restricción mejor estudiada comprende a los llamados enzimas de restricción de tipo II, que cortan el DNA *dentro* de sus secuencias de reconocimiento. Otros tipos de enzimas de restricción escinden al DNA en posiciones algo distantes de su centro de reconocimiento.

Las endonucleasas de restricción muestran una gran especificidad a dos niveles. Primero, no escinden las moléculas de DNA del hospedador que contienen secuencias de reconocimiento. Segundo, sólo escinden a moléculas de DNA que contienen centros de reconocimiento (en el futuro denominado DNA *afín* o *reconocido*) y no lo hacen a aquellas otras moléculas de DNA que carecen de dichos centros.

¿Cómo pueden arreglárselas estos enzimas para degradar el DNA viríco mientras protegen el suyo propio? La endonucleasa de restricción *EcoRV* (de *E. coli*) corta las moléculas de DNA viríco de doble cadena que contienen la secuencia 5'-GATATC-3', pero dejan intacto al DNA del hospedador que contiene cientos de secuencias semejantes. El DNA hospedador se protege mediante otros enzimas llamados *metilasas*, que metilan las bases de adenina dentro de las secuencias de reconocimiento del hospedador (Figura 9.32). Una endonucleasa de restricción no escindirá al DNA si su secuencia de reconocimiento está metilada. Para cada endonucleasa de restricción la célula hospedadora produce la metilasa correspondiente que marca el DNA propio en el centro de metilación apropiado. Estas parejas de enzimas se denominan *sistemas de modificación-restricción*.

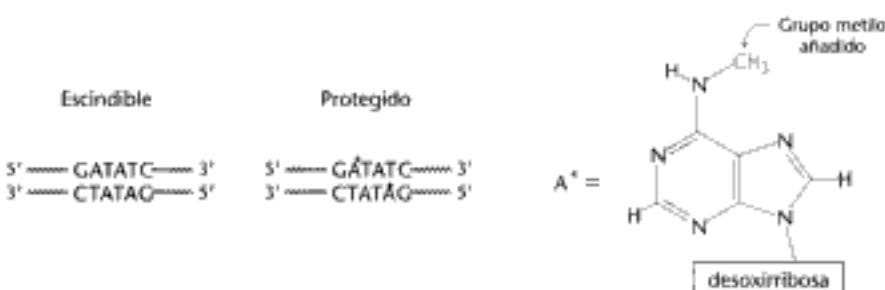


Figura 9.32 Protección mediante metilación. La secuencia de reconocimiento para la endonucleasa EcoRV (izquierda) y los centros de metilación (derecha) en el DNA protegido de la acción catalítica del enzima.

Los enzimas de restricción sólo escinden el DNA en centros de reconocimiento no modificados, sin cortarlo en otros centros. Supongamos que una secuencia de reconocimiento tiene una longitud de seis pares de bases. Ya que existen $4^6 = 4096$ secuencias que tienen seis pares de bases, la concentración de centros que no deben escindirse será aproximadamente 5000 veces mayor que la concentración de centros que deberían escindirse. Así, para preservar del daño al DNA de la célula hospedadora, las endonucleasas cortan a las moléculas de DNA afín de forma 5000 veces más eficaz a como lo hacen en centros no específicos. En segundo lugar, los enzimas de restricción no deben degradar el DNA del hospedador. Volveremos al mecanismo utilizado para alcanzar los niveles necesarios de especificidad, después de considerar la química del proceso de escisión.

La escisión del DNA se realiza por una molécula de agua activada por magnesio, mediante un desplazamiento en línea del oxígeno 3' del fósforo

Una endonucleasa de restricción cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del DNA. Específicamente, se rompe el enlace entre el oxígeno 3' y el átomo de fósforo. Los productos de esta reacción son las cadenas de DNA con un grupo 3'-hidroxilo libre y un grupo 5'-fosforilo en el centro de escisión (Figura 9.33). Esta reacción tiene lugar mediante un ataque nucleofílico al átomo de fósforo. Consideraremos dos tipos

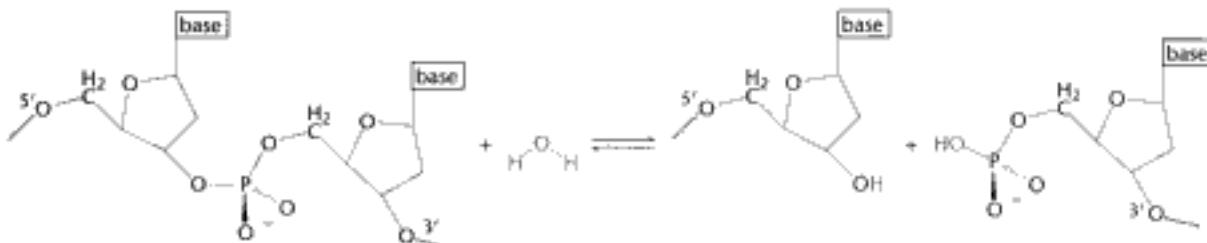
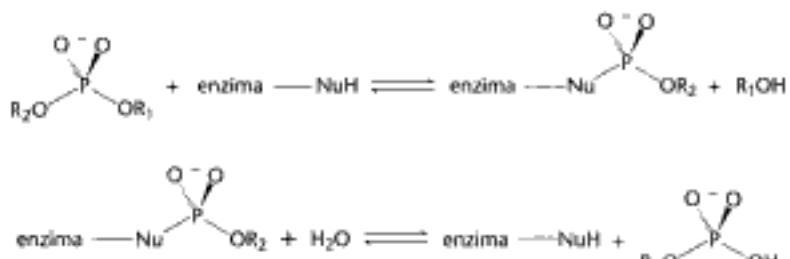


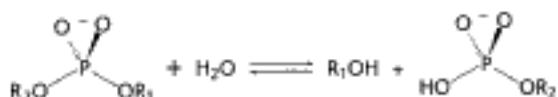
Figura 9.33 Hidrólisis de un enlace fosfodiéster. Todos los enzimas de restricción catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de DNA, dejando un grupo fosforilo unido al extremo 5'. El enlace que se escinde se muestra en rojo.

de mecanismos, como se ha sugerido por analogía con las proteasas. Las endonucleasas de restricción pueden escindir al DNA siguiendo el mecanismo 1, a través de un intermediario covalente, empleando un nucleófilo potente (*Nu*), o siguiendo el mecanismo 2, mediante hidrólisis directa:

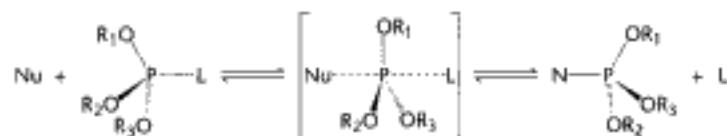
Mecanismo Tipo 1 (intermediario covalente)



Mecanismo Tipo 2 (hidrólisis directa)



Cada mecanismo presupone un nucleófilo diferente para llevar a cabo el ataque sobre el fósforo. En ambos casos, la reacción tiene lugar mediante un *desplazamiento en línea*:



El reactivo nucleófilo entrante ataca al átomo de fósforo y se forma un estado de transición pentacoordinado. Esta especie tiene una geometría bipiramidal trigonal centrada sobre el átomo de fósforo, con el nucleófilo entrante en un vértice de las dos pirámides y el grupo que es desplazado (grupo saliente, L) en el otro vértice. Obsérvese que el desplazamiento invierte la configuración estereoquímica del átomo de fósforo tetraédrico análogamente a la interconversión de las configuraciones R y S de un carbono tetraédrico (Sección 2.1).

Los dos mecanismos difieren en el número de veces que el desplazamiento tiene lugar en el transcurso de la reacción. En el primer tipo de mecanismo, un nucleófilo del enzima (análogo a la serina 195 de la quimotripsina) ataca al grupo fosforilo formando un intermediario covalente. En un segundo paso, este intermediario se hidroliza y produce los productos finales. En el primer mecanismo, tienen lugar dos reacciones de desplazamiento sobre el átomo de fósforo. En consecuencia la configuración final del átomo de fósforo queda retenida, debido a que, como tienen lugar dos desplazamientos consecutivos, la configuración estereoquímica del átomo de fósforo se invertirá de nuevo. En el segundo tipo de mecanismo, análogo a los llevados a cabo por las aspartil y metaloproteasas, una molécula de agua activada ataca directamente al átomo de fósforo. En este mecanismo tiene lugar una reacción de un solo desplazamiento en el átomo de fósforo. Por lo tanto, la configuración estereoquímica del átomo de fósforo se *invierte* después de la ruptura.

Una dificultad radica en que la estereoquímica no se observa fácilmente, ya que dos de los grupos enlazados al átomo de fósforo son átomos de oxígeno sencillo, idénticos entre sí. Esta dificultad se puede obviar sustituyendo un átomo de oxígeno por azufre (produciendo una especie llamada fosforotioato). Vamos a considerar la endo-

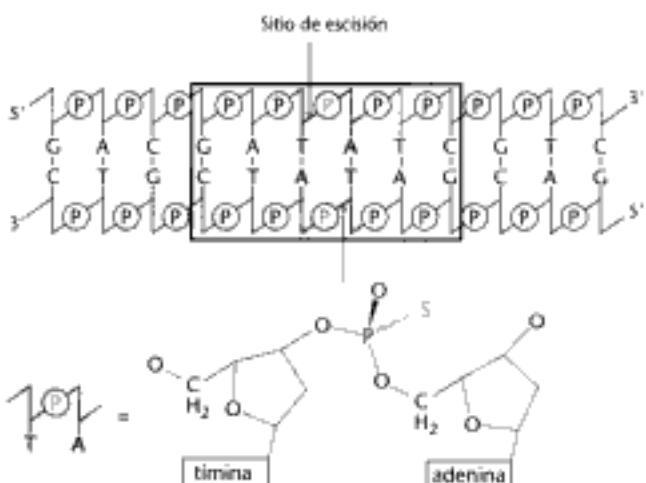


Figura 9.34 Marcaje con fosforotioatos. Para determinar el curso estereoquímico global de una reacción de desplazamiento se marcan centros específicos en la estructura del DNA con fosforotioatos, que son grupos en los cuales uno de los átomos de oxígeno que no forma puentes se sustituye por un átomo de azufre. Aquí se coloca un fosforotioato donde la endonucleasa EcoRV pueda escindirlo.

nucleasa EcoRV. Este enzima escinde el enlace fosfodiéster entre la T y la A en la secuencia 5'-GATATC-3' del centro de reconocimiento. El primer paso consiste en sintetizar un sustrato apropiado para EcoRV que contenga fosforotioatos en el centro de escisión (Figura 9.34). La reacción se realiza después en agua muy enriquecida en ^{18}O para favorecer la entrada del átomo de oxígeno marcado. La situación de marcado del ^{18}O con respecto al átomo de azufre indica si la reacción tiene lugar con estereoquímica de inversión o de retención de la configuración. *El análisis reveló que la configuración estereoquímica del átomo de fósforo en la escisión era invertida una sola vez*. Este resultado concuerda con un ataque directo del agua al fósforo y excluye la formación de un intermediario enlazado covalentemente (Figura 9.35).

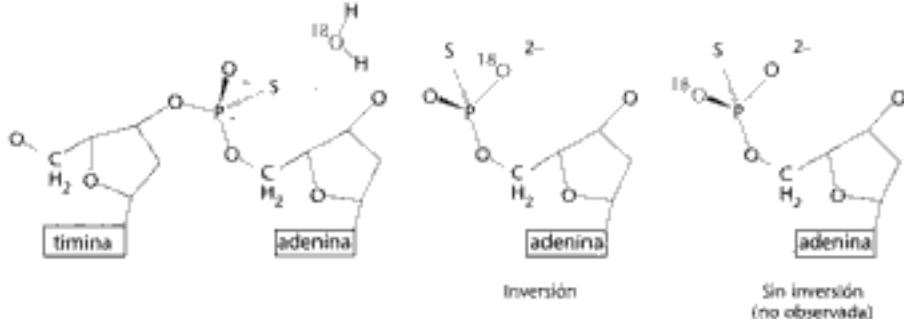


Figura 9.35 Estereoquímica de la ruptura del DNA. La escisión de DNA por la endonucleasa EcoRV tiene por resultado la inversión total de la configuración estereoquímica del átomo de fósforo, tal y como se indicó mediante la estereoquímica del átomo de fósforo enlazado a un átomo de oxígeno puente, un ^{16}O , un ^{18}O y un átomo de azufre. Esta configuración sugiere firmemente que la hidrólisis tiene lugar mediante ataque directo del agua sobre el átomo de fósforo.

Los enzimas de restricción necesitan magnesio para la actividad catalítica

Las endonucleasas de restricción, así como otros muchos enzimas que actúan sobre sustratos que contienen fosfato, necesitan magnesio para su actividad, o algún otro catión divalente similar. ¿Cuál es la función de este metal?

No ha sido posible visualizar directamente el complejo entre la endonucleasa EcoRV y moléculas de DNA en presencia de Mg^{2+} mediante cristalización ya que el enzima escinde el sustrato en estas condiciones. A pesar de ello, ha sido posible visualizar complejos del ion metálico con distintos enfoques. En uno de estos enfoques, se preparan los cristales de la endonucleasa EcoRV enlazada a oligonucleótidos que contienen las secuencias de reconocimiento apropiadas. Estos cristales se han desarrollado en ausencia de magnesio para evitar la escisión; después, una vez generados, los cristales se introducen en disoluciones que contienen este ion. Alternativamente, los cristales se crean con una forma mutada menos activa del enzima. Finalmente, el ion Mg^{2+} puede remplazarse por otros iones, como el Ca^{2+} que se unirán pero que no tendrán mucha

actividad catalítica. En todos estos casos, la escisión no tiene lugar, lo cual permite determinar la localización de los centros de unión para el ion magnesio.

Se han encontrado hasta tres iones metálicos por sitio activo. El papel de estos iones múltiples aún se encuentra en fase de investigación. Un lugar de unión al ion se encuentra ocupado en casi todas las estructuras. Este metal se coordina a la proteína a través de dos residuos de aspartato y de un átomo de oxígeno del grupo fosforilo cerca del lugar de escisión. El ion magnesio mantiene una molécula de agua en una posición desde la cual la molécula de agua puede atacar al átomo de fósforo, lo que ayuda a que se posicione y se active de forma similar a lo que ocurre con el ion Zn^{2+} de la anhidrasa carbónica.

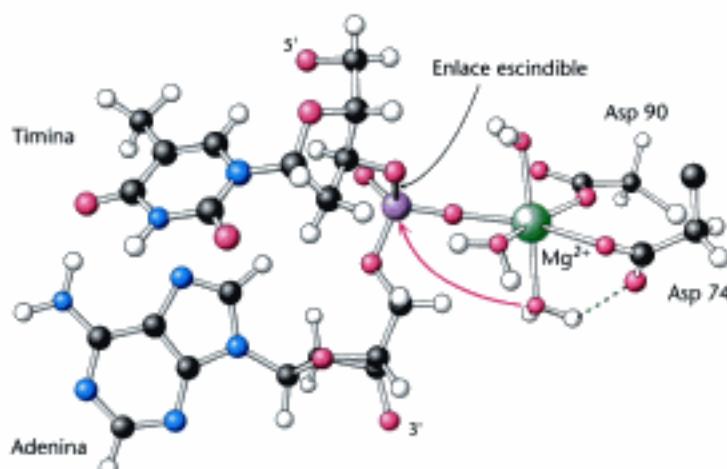


Figura 9.36 Centro de unión para el ion magnesio en la endonucleasa EcoRV. El ion magnesio favorece la activación de una molécula de agua y la coloca de forma que pueda atacar al átomo de fósforo.

El aparato catalítico completo se reúne sólo en los complejos de moléculas de DNA reconocido para asegurar la especificidad

Volvamos ahora al asunto de la especificidad, característica de los enzimas de restricción. Las secuencias de reconocimiento son *repeticiones invertidas* para la mayor parte de las endonucleasas de restricción. Este ordenamiento proporciona una *simetría rotacional binaria* (Figura 9.37) a la estructura tridimensional del centro de reconocimiento.

Los enzimas de restricción manifiestan una simetría conveniente para facilitar el reconocimiento: son dímeros cuyas dos subunidades están también relacionadas mediante una simetría rotacional binaria. El reconocimiento del DNA afín por el enzima se facilita por la simetría que se establece entre la secuencia de reconocimiento y el enzima. Mediante la determinación de la estructura del complejo entre la endonucleasa EcoRV y los fragmentos de DNA que contienen sus secuencias de reconocimiento se ha confirmado la simetría que acompaña a la secuencia de reconocimiento.

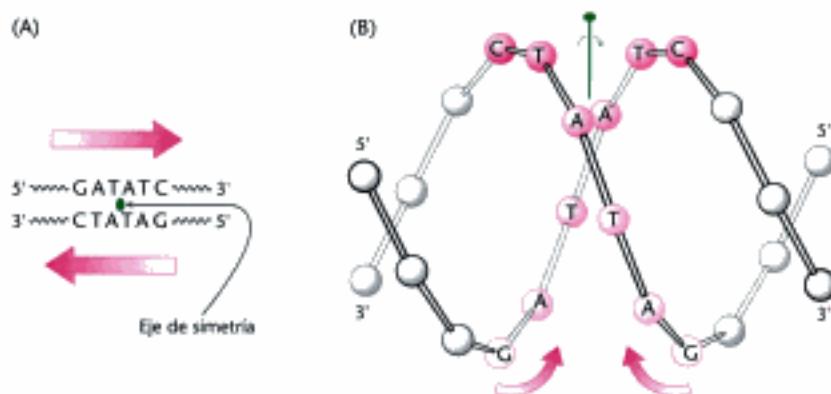


Figura 9.37 Estructura del centro de reconocimiento de la endonucleasa EcoRV. (A) La secuencia del centro de reconocimiento es simétrica alrededor del eje de rotación señalado en verde. (B) La repetición invertida dentro de la secuencia de reconocimiento de EcoRV (y la mayor parte de las endonucleasas de restricción) crea en el centro del DNA una simetría rotacional binaria.

y al enzima (Figura 9.38). El enzima rodea al DNA como en un abrazo muy ajustado.

La especificidad se determina con frecuencia por la afinidad en la unión de un enzima con sus sustratos. Sorprendentemente, sin embargo, los estudios de unión llevados a cabo en ausencia de magnesio han demostrado que la endonucleasa EcoRV se une a todas las secuencias, afines y no afines, con una afinidad aproximadamente idéntica. Entonces, ¿por qué el enzima corta solamente en las secuencias afines? La respuesta establece que entre el enzima y la secuencia de DNA afín existe un conjunto único de interacciones.

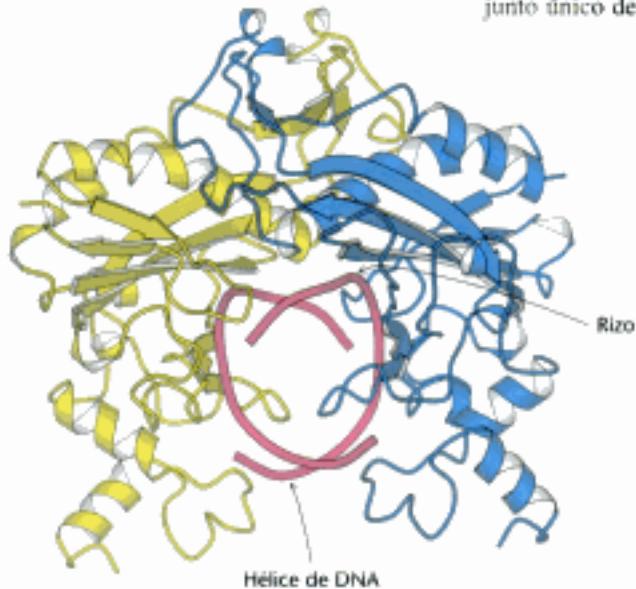


Figura 9.38 EcoRV abraza a la molécula de DNA afín. Esta perspectiva de la estructura de la endonucleasa EcoRV enlazada al fragmento de DNA afín muestra el eje helicoidal del DNA. Las dos subunidades proteicas se muestran en amarillo y azul, y el esqueleto del DNA en rojo. Nótese que los ejes binarios de los dímeros enzymáticos y el DNA se encuentran alineados. [Tomado de 1RVB.pdb.]

Las bases de G y A en el extremo 5' de cada cadena, dentro de la secuencia 5'-GATATC-3', y sus parejas complementarias de Watson-Crick, se ponen en contacto directamente con el enzima mediante puentes de hidrógeno con residuos localizados en los dos lazos que sobresalen de la superficie de cada subunidad enzimática (Figura 9.39). La característica más llamativa de este complejo es la *distorsión del DNA*, el cual se encuentra considerablemente retorcido en el centro (Figura 9.40). Los dos pares de bases TA centrales en la secuencia de reconocimiento desempeñan un papel clave en la producción de un rizo. No tienen contacto con el enzima pero parecen ser necesarios debido a su facilidad para la distorsión. Las secuencias 5'-TA-3' se encuentran en la mayor parte de pares de bases fácilmente deformables.

Las estructuras de los complejos formados con fragmentos de DNA no afín son extraordinariamente diferentes de los formados con DNA afín, es decir, la conformación del DNA no afín no se distorsiona sustancialmente (Figura 9.41). *Esta carencia de distorsión tiene importantes consecuencias con respecto a la catálisis. Ningún fosfato se sitúa suficientemente próximo a los residuos del aspartato del centro activo para completar un centro de unión para el ion magnesio* (ver Figura 9.36). Por tanto, los complejos inespecíficos no enlazan al ion magnesio y el aparato catalítico completo nunca llega a formarse. La distorsión del sustrato y la unión posterior del ion magnesio explican la especificidad.

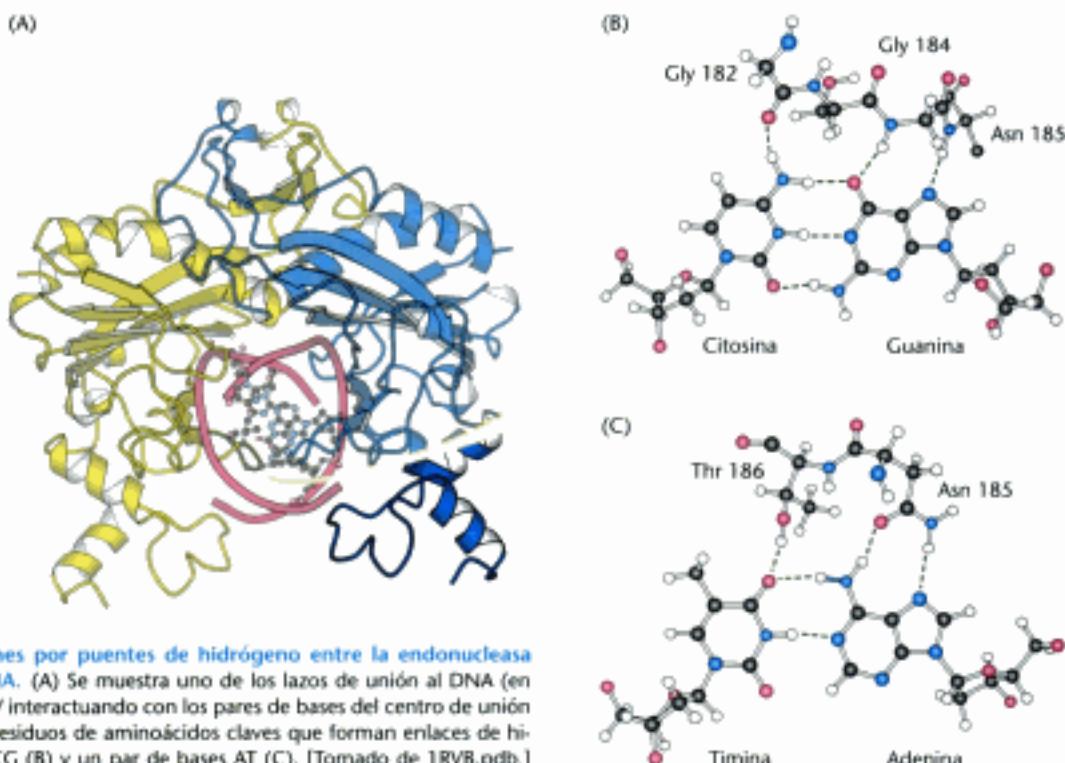


Figura 9.39 Interacciones por puentes de hidrógeno entre la endonucleasa EcoRV y su sustrato DNA. (A) Se muestra uno de los lazos de unión al DNA (en verde) de la endonucleasa EcoRV interactuando con los pares de bases del centro de unión del DNA afín. Se muestran los residuos de aminoácidos claves que forman enlaces de hidrógeno con un par de bases CG (B) y un par de bases AT (C). [Tomado de 1RVB.pdb.]

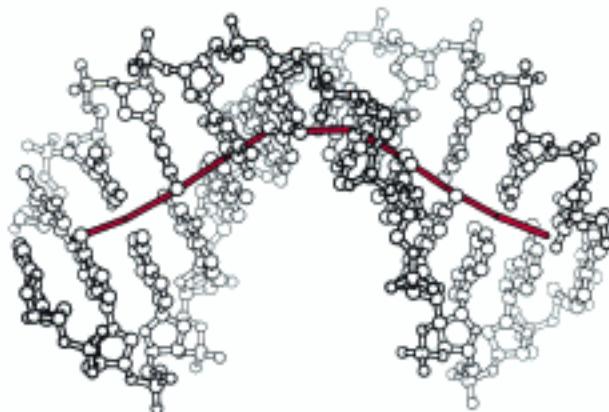


Figura 9.40 Distorsión del centro de reconocimiento. El DNA se representa como un modelo de esferas y varillas. La trayectoria del eje helicoidal del DNA (en rojo) se encuentra esencialmente retorcido en la unión al enzima. En la forma B del DNA el eje debe ser recto (no representado).

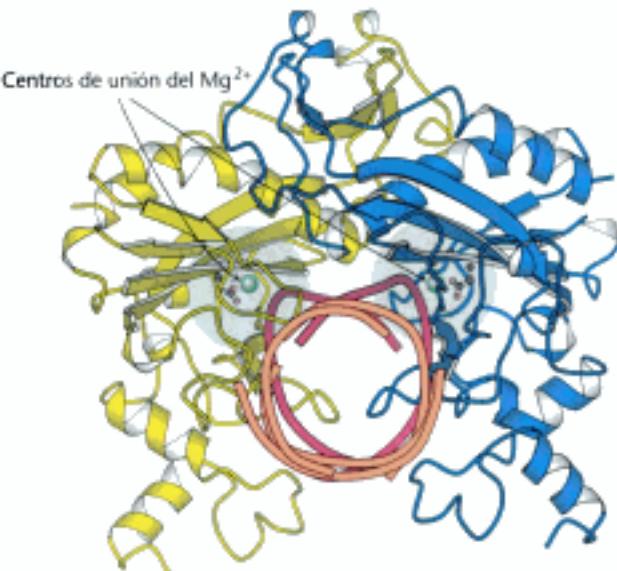


Figura 9.41 DNA afín e inespecífico en la endonucleasa EcoRV. Comparación de las posiciones del DNA inespecífico (en naranja) y afín (en rojo) en el interior de EcoRV. Nótese que, en el complejo inespecífico, el esqueleto del DNA se encuentra demasiado lejos del enzima para completar los centros de unión para el ion magnesio. [Tomado de 1RVB. pdb.]

ciudad catalítica de más de 10^6 veces que se observa para la endonucleasa EcoRV. De esta manera, la especificidad del enzima se puede determinar por la especificidad de la acción enzimática más bien que por la especificidad de la unión al sustrato.

Ahora podemos contemplar el papel de la energía de unión en la estrategia para alcanzar la especificidad catalítica. El DNA se distorsiona de tal manera en la unión al enzima, que se realizan contactos adicionales con el enzima, aumentando la energía de unión. Sin embargo, este incremento se anula mediante el coste energético de la distorsión del DNA desde su conformación relajada (Figura 9.42). De este modo, para la endonucleasa EcoRV, hay una diferencia pequeña en la afinidad de unión para los fragmentos de DNA afín e inespecífico. No obstante, la distorsión en el complejo afín afecta espectacularmente a la catálisis ya que completa el centro de unión para el ion magnesio. Este ejemplo ilustra cómo los enzimas pueden utilizar la energía de unión disponible para deformar a los sustratos y predisponerlos para su transformación química. Las interacciones que tienen lugar dentro del complejo-sustrato distorsionado estabilizan al estado de transición que conduce a la hidrólisis del DNA.

La distorsión del DNA explica cómo la metilación bloquea la catálisis y protege al DNA de la célula hospedadora. El hospedador *E. coli* añade un grupo metilo al grupo

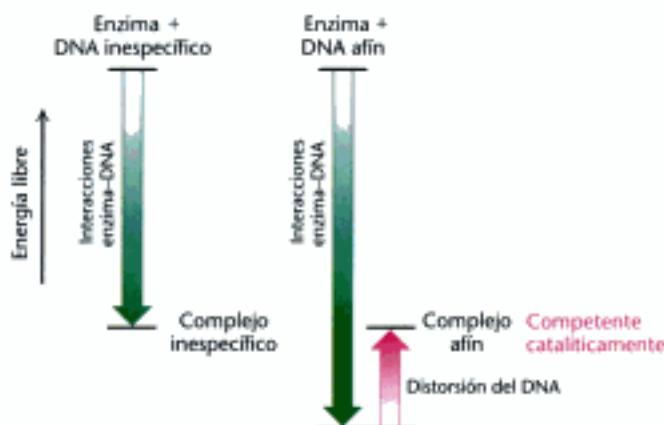


Figura 9.42 La endonucleasa EcoRV enlazada al DNA afín posee una energía de unión mayor que la correspondiente al DNA inespecífico. Las interacciones adicionales entre la endonucleasa EcoRV y el DNA afín incrementan la energía de unión, la cual se utiliza para impulsar las distorsiones en el DNA necesarias para formar un complejo catalítico competente.

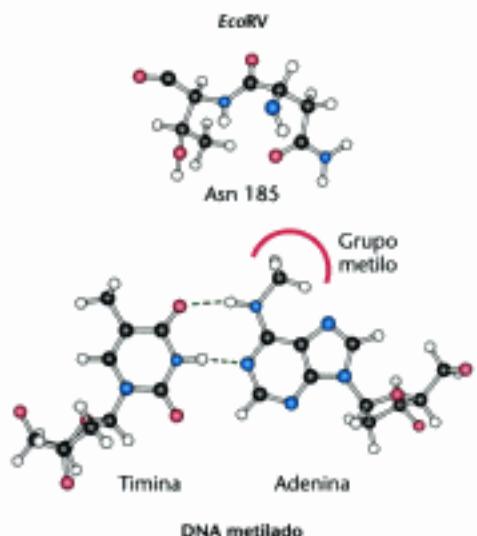


Figura 9.43 Metilación de adenina. La metilación de la adenina bloquea la formación de puentes de hidrógeno entre la endonucleasa EcoRV y las moléculas de DNA afín, e impide su hidrólisis.

amino del nucleótido de adenina en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento. La presencia de este grupo metilo bloquea la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo amino y el grupo carbonilo de la cadena lateral de la aspárragina 185 (figura 9.43). Este residuo de aspárragina se encuentra estrechamente enlazado a otros aminoácidos que forman los contactos específicos con el DNA. La ausencia del puente de hidrógeno interrumpe otras interacciones entre el enzima y el sustrato DNA y, por lo tanto, no tendrá lugar la necesaria distorsión para la escisión del DNA.

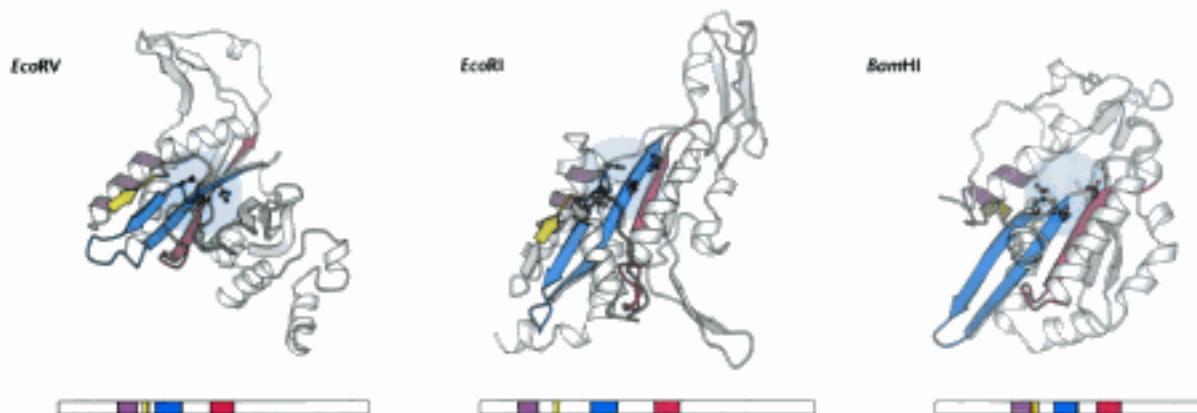
Las endonucleasas de restricción de tipo II tienen un núcleo catalítico común y probablemente están relacionadas mediante transferencia horizontal de genes

Los enzimas de restricción de tipo II son los predominantes en árqueas y bacterias. ¿Qué podemos decir sobre la historia evolutiva de estos enzimas? La comparación de la secuencia de aminoácidos de una serie de endonucleasas de restricción de tipo II mostró semejanzas significativas de secuencia entre la mayor parte de estos enzimas. Sin embargo, un examen detallado de las estructuras tridimensionales, teniendo en cuenta la localización de los centros activos, reveló la presencia de un núcleo estructural conservado en los diferentes enzimas. Esta estructura incluye cadenas β que contienen a los residuos aspartato (o, en algunos casos, glutamato) que conforman los centros de unión para el ion magnesio (Figura 9.44).

Estas observaciones indican que muchos enzimas de restricción de tipo II están en realidad relacionados evolutivamente. Los análisis de las secuencias con mayor detalle sugieren que las bacterias pueden haber obtenido los genes que codifican estos enzimas a partir de otras especies mediante *transferencia horizontal de genes*, pasando entre especies trozos de DNA (tales como plásmidos) que proporcionan una ventaja selectiva en un entorno particular. Por ejemplo, EcoRI (de *E. coli*) y *RsrI* (de *Rhodobacter sphaeroides*) tienen sobre una secuencia de 299 aminoácidos, un 50% idénticos, lo que indica claramente un parentesco evolutivo cercano. Sin embargo, estas especies de bacterias no están relacionadas de cerca, como se deduce de la comparación de las secuencias de otros genes y de otras evidencias. De este modo, *parece ser que estas especies obtuvieron el gen para esta endonucleasa de restricción a partir de un precursor común más reciente que el momento de su divergencia evolutiva*. Además, el gen codificador de la endonucleasa EcoRI utiliza determinados codones para especificar los aminoácidos correctos que son claramente diferentes de los codones utilizados por la mayor parte de los genes de *E. coli*, lo cual sugiere que el gen no se originó en *E. coli*.

La transferencia horizontal de genes puede ser un suceso relativamente común. Por ejemplo, los genes que inactivan antibióticos son transferidos con frecuencia, dando lugar a la transmisión de la resistencia a los antibióticos desde unas especies a otras. A causa de los sistemas de modificación-restricción, la protección contra las infecciones víricas puede haber favorecido la transferencia horizontal de genes.

Figura 9.44 Un núcleo estructural conservado en los enzimas de restricción de tipo II. Cuatro elementos estructurales conservados, incluyendo la región del centro activo (en azul), se señalan en color en estos modelos de un monómero simple para cada enzima dímerico. Las posiciones de las secuencias de aminoácidos que forman estos elementos dentro de cada secuencia total se representan esquemáticamente debajo de cada estructura. [Tomado de 1RVB.pdb; 1ERI.pdb; 1bHM.pdb.]



9.4 Las nucleósido monofosfato quinasas catalizan la transferencia del grupo fosforilo entre nucleótidos sin provocar la hidrólisis

Los últimos enzimas que vamos a considerar son las nucleósido monofosfato quinasas (NMP quinasas), representadas por la adenilato quinasa. Estos enzimas catalizan la transferencia del grupo fosforilo terminal desde un nucleósido trifosfato (NTP), normalmente ATP, al grupo fosforilo de un nucleósido monofosfato (NMP; Figura 9.45). El reto para las NMP quinasas consiste en promover la transferencia del grupo fosforilo desde NTP a NMP sin facilitar la reacción de competición, es decir, la hidrólisis de NTP (transferencia de un grupo fosforilo desde el NTP al agua). Para resolver este problema, veremos a continuación cómo estos enzimas utilizan el ajuste inducido. Además, en la catálisis, el ion metálico desarrolla un papel crucial; pero, en este caso, el metal forma un complejo con el sustrato para aumentar la interacción enzima-sustrato en vez de hacerlo con el enzima.

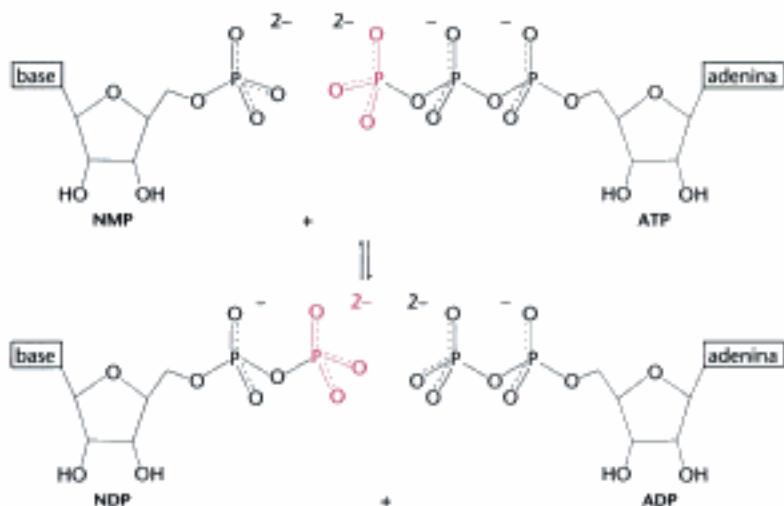


Figura 9.45 Transferencia del grupo fosforilo por las nucleósido monofosfato quinasas. Estos enzimas catalizan la interconversión de un nucleósido trifosfato (aquí, ATP) y un nucleósido monofosfato (NMP) en dos nucleósidos difosfato mediante la transferencia de un grupo fosforilo (en rojo).

Las NMP quinasas son una familia de enzimas que contienen estructuras de bucle P

Los métodos de cristalografía con rayos X han proporcionado la estructura tridimensional de algunas NMP quinasas diferentes libres y unidas a los sustratos o a sus análogos. La comparación de estas estructuras demuestra que estos enzimas forman una familia de proteínas homólogas (Figura 9.46). En concreto, dichas comparaciones revelan la presencia de un dominio de unión del NTP conservado. Este dominio

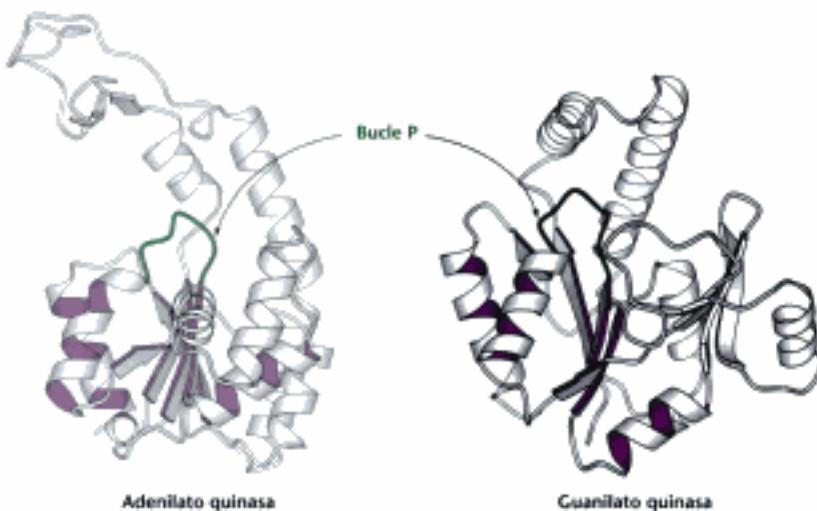


Figura 9.46 Estructuras similares de la adenilato quinasa y de la guanilato quinasa. El dominio de unión para el nucleótido trifosfato es un atributo común en estas y otras nucleótido quinasas homólogas. Nótese que el dominio consiste en una hoja plegada β rodeada por ambos lados de hélices α (señaladas en púrpura) así como por un bucle clave (en verde). [Tomado de HAKE.pdb y 1GKY.pdb.]

consiste en una hoja β central rodeada por ambos lados de hélices α (Figura 9.47). Un rasgo característico de este dominio es un bucle entre la primera cadena β y la primera hélice. Este bucle, que típicamente posee una secuencia de aminoácidos formada por Gly-X-X-X-Gly-Lys, se denomina con frecuencia *bucle P* ya que interacciona con los grupos fosforilo del nucleótido enlazado (Figura 9.48). Como se describirá más adelante, dominios similares que contienen bucles P están presentes en una gran variedad de importantes proteínas que enlazan nucleótidos.

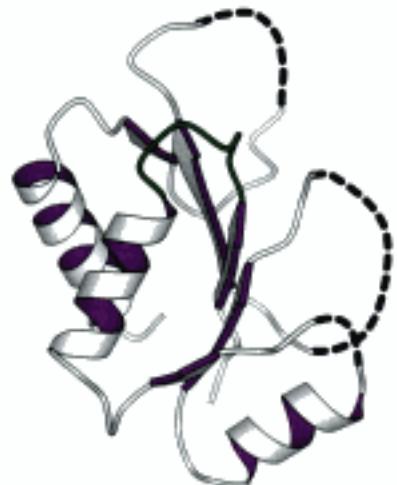


Figura 9.47 El dominio nuclear de las NMP quinasas. El bucle P se muestra en verde. Las líneas discontinuas representan el resto de la estructura proteica. [Tomado de 1GKY.pdb.]

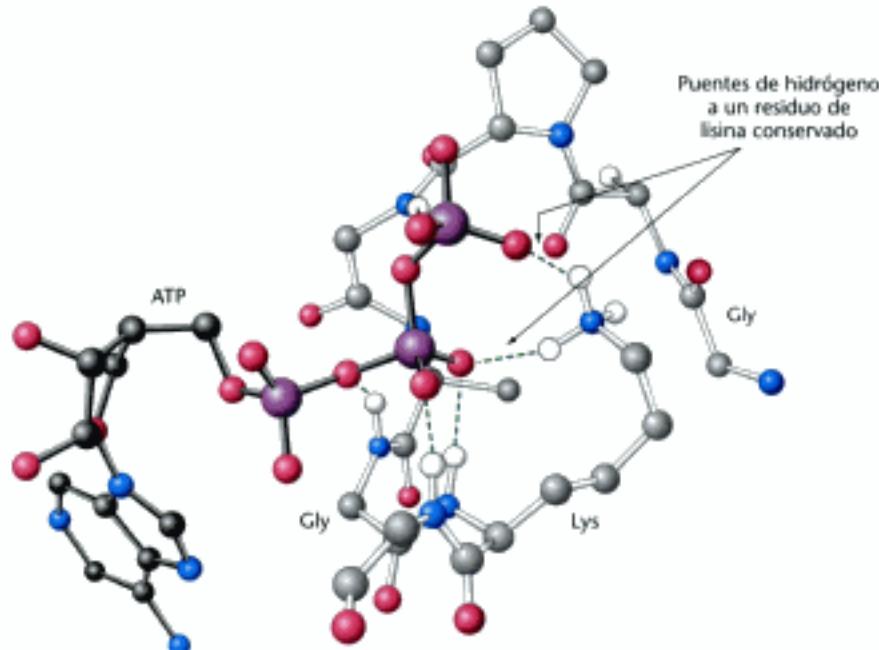


Figura 9.48 Interacción del bucle P con el ATP. El bucle P de la adenilato quinasa interacciona con los grupos fosforilo del ATP (mostrados con enlaces oscuros). Nótese que los puentes de hidrógeno (en verde) unen ATP a los grupos $-NH$ peptídicos, así como al residuo de lisina conservado en las NMP quinasas.

Los auténticos sustratos para prácticamente todos los enzimas dependientes de NTP son los complejos de los nucleósidos trifosfato y el magnesio o manganeso

Estudios cinéticos de las NMP quinasas, así como de muchos otros enzimas que tienen como sustrato ATP u otros nucleósidos trifosfato, revelan que estos enzimas son prácticamente inactivos en ausencia de iones metálicos divalentes tales como magnesio (Mg^{2+}) o manganeso (Mn^{2+}), pero adquieren su actividad normal cuando se adicionan estos iones. En contraste con los enzimas estudiados anteriormente, el metal no es un componente del centro activo. Más bien, los nucleótidos como el ATP se unen a estos iones, y el complejo nucleótido-ion metálico es el auténtico sustrato para estos enzimas. La constante de disociación para el complejo ATP- Mg^{2+} es aproximadamente 0,1 mM, y así, dado que la concentración intracelular de Mg^{2+} típicamente es del orden de milimolar, todos los nucleósidos trifosfato se encuentran presentes como complejos NTP- Mg^{2+} .

¿Cómo afecta a la catálisis la unión del ion magnesio al nucleótido? Las interacciones entre el ion magnesio y los átomos de oxígeno del grupo fosforilo mantienen al nucleótido en la conformación apropiada para que se enlace específicamente al enzima (Figura 9.49). Los iones magnesio están coordinados a seis grupos químicos formando una estructuración octaédrica. Específicamente, dos átomos de oxígeno se encuentran coordinados directamente al ion magnesio, y las posiciones de coordinación restantes están ocupadas con frecuencia por moléculas de agua. Los átomos de oxígeno de los grupos fosforilo α y β , β y γ , o bien α y γ pueden contribuir en la coordinación, dependiendo del enzima. Además, se producen diferentes estereoisóme-

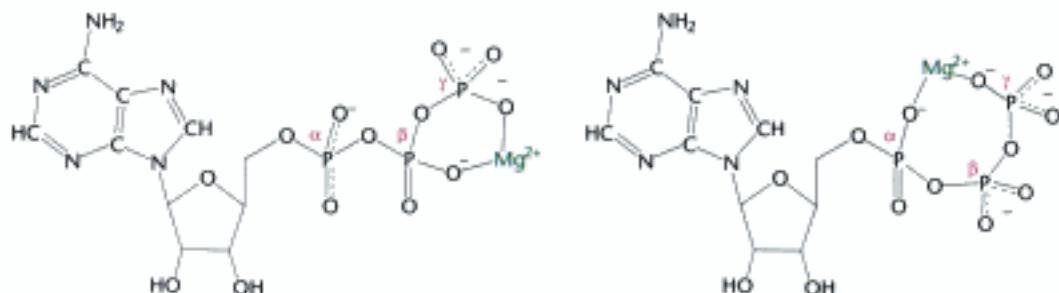


Figura 9.49 Estructuras de dos formas isoméricas del complejo ATP–Mg²⁺. Por razones de claridad se han omitido otros grupos coordinados al ion magnesio. Cada enzima dependiente de ATP se enlazará solamente a una forma isomérica.

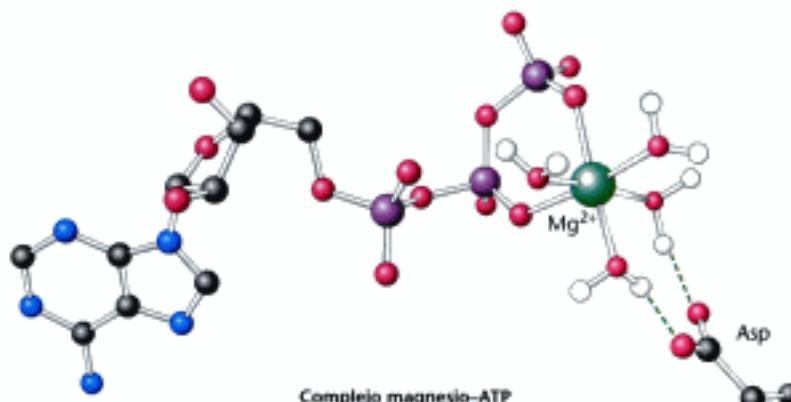


Figura 9.50 Complejo ATP–Mg²⁺ enlazado a la adenilato quinasa. Nótese que el ion magnesio está unido a los grupos fosforilo β y γ , y a cuatro moléculas de agua enlazadas en las posiciones de coordinación restantes. Estas moléculas de agua interaccionan con otros grupos del enzima, tales como un residuo de aspartato conservado. Para más claridad se han omitido otras interacciones.

ros dependiendo de qué átomos de oxígeno concretamente se unan al ion metálico. *El ion magnesio proporciona contactos adicionales de interacción entre el complejo ATP–Mg²⁺ y el enzima, de modo que se incrementa la energía de unión.* En algunos casos, como las DNA polimerasas (Sección 28.3), las cadenas laterales del enzima (con frecuencia residuos de aspartato o glutamato) se unen directamente al ion magnesio. En otros casos, el enzima interacciona directamente con el ion magnesio a través de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua coordinadas (Figura 9.50). Esta interacción se ha observado en la unión de adenilato quinasa a análogos del ATP.

La unión del ATP induce grandes cambios conformacionales

La comparación de la estructura de la adenilato quinasa en presencia y ausencia de un análogo de ATP revela que la unión del sustrato induce grandes cambios estructurales en la quinasa, lo cual proporciona un ejemplo clásico de la utilidad del ajuste inducido (Figura 9.51). El bucle P se cierra sobre la cadena de polifosfato, interaccionando más extensamente con el grupo fosforilo β . El movimiento del bucle P permite al dominio de la parte superior del enzima desplazarse hacia abajo para formar una especie de tapadera por encima del nucleótido enlazado. Con el nucleótido ATP retenido en esta posición, su grupo fosforilo γ se encuentra próximo al centro de unión para el segundo sustrato, el NMP. La unión del segundo sustrato, NMP, induce nuevos cambios conformacionales. Ambos tipos de cambios aseguran que se cree una conformación catalíticamente competente sólo cuando ambos, el dador y el aceptor, se encuentran unidos, impidiendo así la transferencia improductiva del grupo fosforilo al agua.

El movimiento envolvente del dominio tapadera y el bucle P se favorece por la interacción entre residuos básicos (conservados en las NMP quinasas), los grupos NH del esqueleto peptídico y el nucleótido. En resumen, las interacciones directas

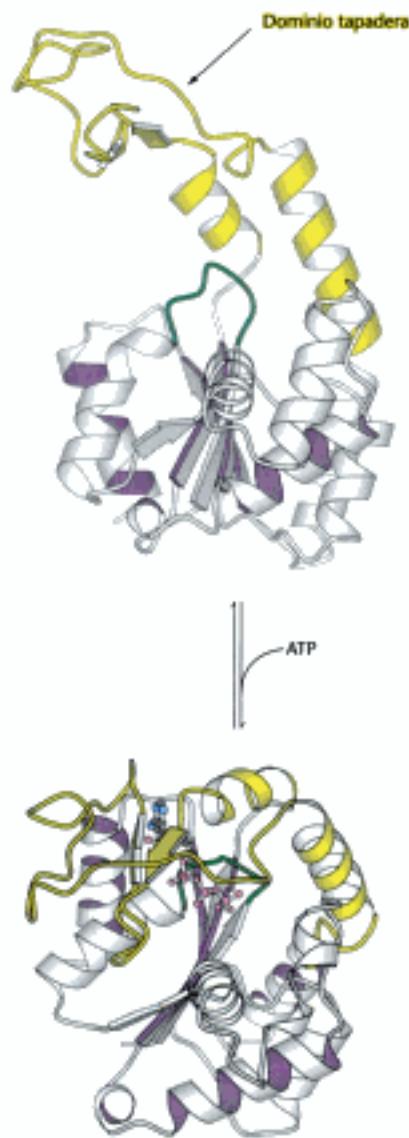


Figura 9.51 Cambios conformacionales en la adenilato quinasa. La unión del ATP a la adenilato quinasa está asociada a grandes cambios conformacionales. El bucle P en cada estructura se muestra en verde. Nótese que el dominio tapadera señalado en amarillo se cierra sobre el sustrato. [Tomado de 4AKE.pdb y 1AKE.pdb.]

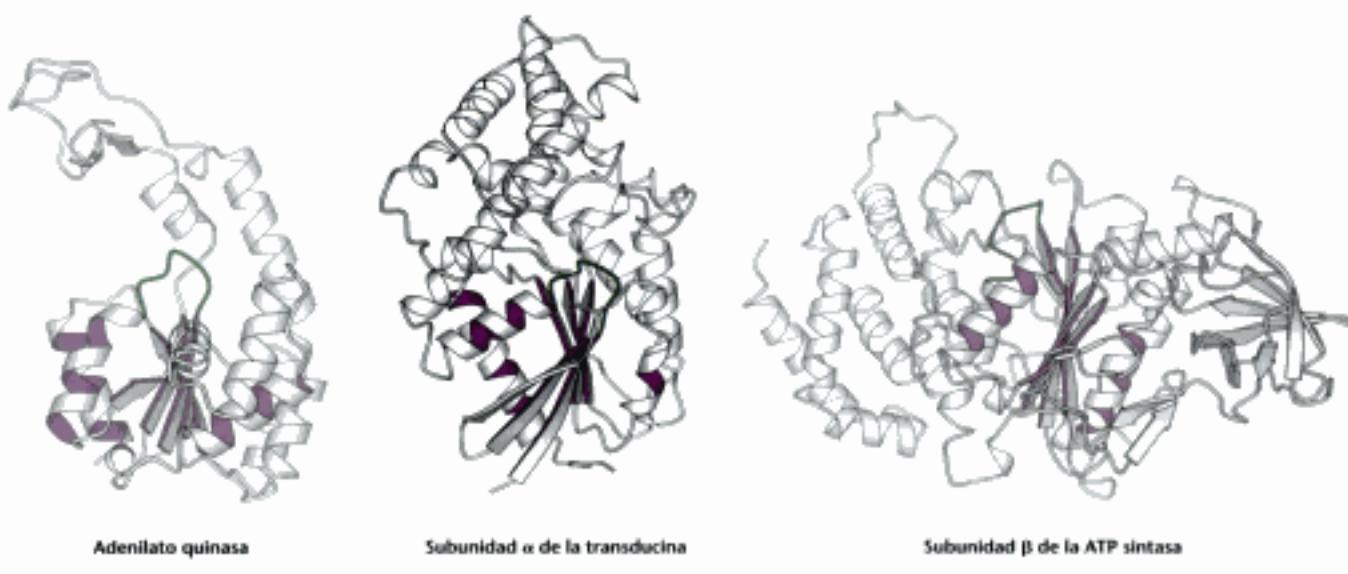
con el sustrato nucleotídico conducen a reordenamientos estructurales locales en el enzima (desplazándose el bucle P), lo cual permite que se produzcan sucesivamente cambios más profundos (como el cierre del dominio tapadera). Como consecuencia de estos cambios, el enzima mantiene muy juntos a sus dos sustratos y en una orientación apropiada para estabilizar el estado de transición que conduce a la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP hasta el NMP. Este es un ejemplo de *catalisis por aproximación*. En el estudio de la bioquímica con frecuencia veremos ejemplos parecidos de centros activos catalíticamente competentes que solamente se generan cuando el enzima se une al sustrato.

Los dominios NTPasa con bucles P están presentes en una serie de proteínas importantes

 Similares dominios a los encontrados en las NMP quinasas (y la mayoría ciertamente homólogos) están presentes en una amplísima serie de proteínas, muchas de las cuales participan en procesos bioquímicos esenciales. Ejemplos de estas proteínas incluyen a la ATP sintasa, el enzima clave responsable de la generación de ATP; otras son motores moleculares, como la miosina; otras proteínas son señales de transducción, como la transducina; otras son esenciales para la traducción del mRNA en proteínas, como el factor de elongación Tu; y las helicasas que desenrollan el DNA y el RNA. La amplia utilidad de los dominios NTPasa con bucles P se explica tal vez mejor por su capacidad para experimentar cambios conformacionales importantes cuando se une el nucleótido trifosfato y en la hidrólisis. Estos dominios (en el futuro denominados NTPasas de bucle P) los encontraremos a lo largo del presente texto y podremos observar sus funciones como muelles, motores o relojes. Para facilitar el reconocimiento de estos dominios, al igual que los dominios de unión de las NMP quinasas, serán representados en un diagrama de cintas, con las superficies internas de la cinta expuestas en color púrpura y los bucles P en verde (Figura 9.52).



Figura 9.52 Tres proteínas que contienen los dominios NTPasa con bucles P. En los dominios conservados, las superficies internas de las cintas se muestran en púrpura y los bucles P en verde. [Tomado de 4AKE.pdb; 1TND.pdb; 1BMF.pdb.]



Resumen

Los enzimas adoptan conformaciones que son estructural y químicamente complementarias de los estados de transición de las reacciones que catalizan. Algunos residuos de aminoácidos interactivos generan centros con estructura y propiedades químicas especiales necesarias para estabilizar el estado de transición. Los enzimas pueden utilizar cinco estrategias básicas para formar y estabilizar el estado de transición: (1) empleo de la energía de unión, (2) la catálisis covalente,

(3) la catálisis ácido-base general, (4) la catálisis por ion metálico y (5) la catálisis por aproximación. De los enzimas examinados en este capítulo, tres grupos de enzimas catalizan la adición de agua a sus sustratos pero tienen diferentes requisitos de especificidad y velocidad catalítica y se acoplan a otros procesos. El cuarto grupo impide la adición de agua al sustrato mediante el ajuste inducido.

9.1 Las proteasas facilitan una reacción especialmente difícil

La ruptura del enlace peptídico por la quimotripsina se inicia por el ataque de un residuo de serina sobre el grupo carbonilo peptídico. El grupo hidroxilo atacante se activa mediante la interacción con un grupo imidazol de un residuo de histidina, que a su vez se une a un residuo de aspartato. Esta triada catalítica Ser-His-Asp genera un nucleófilo potente. El producto inicial de esta reacción es un intermediario covalente formado por el enzima y un grupo acilo derivado del sustrato enlazado. La hidrólisis de este intermediario acil-enzima completa el proceso de ruptura. El intermediario tetraédrico formado en estas reacciones tiene una carga negativa sobre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo peptídico. Esta carga negativa se estabiliza mediante interacciones con grupos NH peptídicos en una región del enzima llamada la cavidad del oxianión.

Otras proteasas emplean también la misma estrategia catalítica. Algunas de estas proteasas como la tripsina y la elastasa, son homólogas de la quimotripsina. En otras proteasas, como la subtilisina, mediante evolución convergente, ha surgido otra triada catalítica muy similar. Otras clases de proteasas presentan triadas catalíticas que se diferencian en las estructuras de sus centros activos. Estas clases utilizan una serie de estrategias catalíticas que en cada caso generan un nucleófilo suficientemente potente para atacar al grupo carbonilo peptídico. En algunos enzimas el nucleófilo procede de una cadena lateral, mientras que en otros, una molécula de agua activada ataca directamente al carbonilo peptídico.

9.2 Las anhidrasas carbónicas aceleran una reacción rápida

Las anhidrasas carbónicas catalizan la reacción del agua con el dióxido de carbono para generar ácido carbónico. La catálisis es extremadamente rápida: algunas anhidrasas carbónicas hidratan al dióxido de carbono a velocidades tan altas como un millón de veces por segundo. Un componente decisivo de estos enzimas es el ion zinc enlazado fuertemente en sus centros activos. Cada ion zinc se une a una molécula de agua y promueve su desprotonación para generar a pH neutro el ion hidróxido. Este ion hidróxido ataca al dióxido de carbono para formar ion bicarbonato, HCO_3^- . La velocidad es esencial para este enzima, a causa de las funciones fisiológicas de los iones bicarbonato y del dióxido de carbono. Las anhidrasas carbónicas más activas han desarrollado una lanzadera de protones para transferir protones a un amortiguador, de modo que superan las limitaciones impuestas por la velocidad de transferencia del protón desde la molécula de agua enlazada al zinc.

9.3 Las enzimas de restricción llevan a cabo la escisión del DNA mediante reacciones muy específicas

La clave para una función biológica es a menudo el alto nivel de especificidad del enzima por el sustrato. Las endonucleasas de restricción que rompen el DNA en secuencias de reconocimiento específicas discriminan entre las moléculas que contienen estas secuencias de reconocimiento y aquellas otras que no las contienen. Dentro del complejo enzima-sustrato, el sustrato DNA se distorsiona de forma que genera un centro de unión para el ion magnesio entre el enzima y el DNA. El ion magnesio se une y activa a una molécula de agua, la cual ataca al enlace fosfodiéster.

Algunos enzimas discriminan entre diferentes sustratos potenciales enlazándolos con diferentes afinidades. Otros se pueden unir a muchos sustratos posibles, pero sólo promueven reacciones químicas eficaces en moléculas específicas. Las endonucleasas de restricción, como la endonucleasa EcoRV, em-

plean este segundo mecanismo. Solamente las moléculas que contienen la secuencia de reconocimiento apropiada no se distorsionan, de forma que permiten la unión del ion magnesio y, por lo tanto, la catálisis. Los enzimas de restricción no actúan sobre el DNA de la célula hospedadora, debido a la metilación de centros clave dentro de sus secuencias de reconocimiento. Los grupos metilo añadidos bloquean las interacciones específicas entre los enzimas y el DNA, de tal forma que no se produce la distorsión necesaria para la ruptura.

9.4 Las nucleósido monofosfato quinasas catalizan la transferencia del grupo fosforilo entre nucleótidos sin provocar la hidrólisis

Finalmente, las NMP quinasas ilustran que el ajuste inducido (alteración de la estructura del enzima cuando se une al sustrato) favorece la transferencia de fosforilo entre nucleótidos en vez de transferirlo a una molécula de agua. Esta clase de enzimas manifiesta un motivo estructural llamado el bucle P del dominio de la NTPasa que se encuentra presente en un gran número de proteínas que unen nucleótidos. El cierre del bucle P sobre el sustrato nucleósido trifosfato enlazado permite al dominio principal del enzima formar una especie de tapadera sobre el nucleótido enlazado. En este ejemplo de catálisis por aproximación la rotación estructural coloca al trifosfato cerca del monofosfato con el que reaccionará posteriormente. Estos enzimas dependen de iones metálicos, pero los iones se unen al sustrato, en vez de unirse directamente al enzima. La unión del ion metálico al nucleósido trifosfato aumenta la especificidad de las interacciones enzima-sustrato mediante la retención del nucleótido en una conformación bien definida y proporcionando puntos de interacción adicionales, incrementando de esta forma la energía de la unión.

Términos clave

energía de unión (p. 242)
ajuste inducido (p. 242)
catálisis covalente (p. 242)
catálisis ácido-base general (p. 242)
catálisis por ion metálico (p. 242)
catálisis por aproximación (p. 242)

reacción de modificación química (p. 244)
tríada catalítica (p. 245)
cavidad del oxianión (p. 247)
inhibidor de proteasas (p. 253)
lanzadera de protones (p. 258)
secuencia de reconocimiento (p. 259)

metilasas (p. 260)
sistema de modificación-restricción (p. 260)
desplazamiento en línea (p. 261)
transferencia horizontal de genes (p. 266)
bucle P (p. 268)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Stroud, R. M., 1974. A family of protein-cutting proteins. *Sci. Am.* 231(1):74-88.
 Kraut, J., 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:331-358.
 Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* 74:1-20.
 Jeltsch, A., Alves, J., Maass, G. y Pingoud, A., 1992. On the catalytic mechanism of EcoRI and EcoRV: A detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *FEBS Lett.* 304:4-8.
 Yam, H. y Tsai, M.-D., 1999. Nucleoside monophosphate kinases: Structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73:103-134.
 Lolis, E. y Petsko, G. A., 1990. Transition-state analogues in protein crystallography: Probes of the structural source of enzyme catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 59:597-630.

Libros

- Fersht, A., 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company.
 Silverman, R. B., 2000. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press.
 Page, M. y Williams, A., 1997. *Organic and Bio-organic Mechanisms*. Addison Wesley Longman.

Quimotripsina y otras serinoproteasas

- Fastrez, J. y Fersht, A. R., 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and amides by chymotrypsin. *Biochemistry* 12:2025-2034.
 Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W. y Henderson, R., 1968. Structure of crystalline-chymotrypsin II: A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J. Mol. Biol.* 35:143-164.

- Kossiakoff, A. A. y Spencer, S. A., 1981. Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: Neutron structure of trypsin. *Biochemistry* 20:6462-6474.
- Carter, P. y Wells, J. A., 1988. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332:564-568.
- Carter, P. y Wells, J. A., 1990. Functional interaction among catalytic residues in subtilisin BPN'. *Proteins* 7:335-342.
- Koepke, J., Emmer, U., Wirkentin, E., Wenzl, G. y Flecker, P., 2000. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution: Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J. Mol. Biol.* 298:477-491.
- Gaboriaud, C., Rossi, V., Bally, I., Asfaud, G. J. y Fomecilla-Camps, J. C., 2000. Crystal structure of the catalytic domain of human complement C1s: A serine protease with a handle. *EMBO J.* 19:1755-1765.

Otras proteasas

- Vega, S., Kang, L. W., Velazquez-Campoy, A., Kiso, Y., Amzel, L. M. y Freire, E., 2004. A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease. *Proteins* 55:594-602.
- Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swart, M. B. y Drent, J., 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 179:233-256.
- Kamphuis, I. G., Drent, J. y Baker, E. N., 1985. Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.* 182:317-329.
- Sivarajan, J., Nagler, D. K., Zhang, R., Menard, R. y Cygler, M., 2000. Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the pro-region covalently linked to the active site cysteine. *J. Mol. Biol.* 295:939-951.
- Davies, D. R., 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Chem.* 19:189-215.
- Dorsey, B. D., Levin, R. B., McDowell, S. L., Vacca, J. P., Guare, J. P., Durke, P. L., Zugay, J. A., Emini, E. A., Schleif, W. A., Quintero, J. C., et al., 1994. L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 37:3443-3451.
- Chen, Z., Li, Y., Chen, E., Hall, D. L., Durke, P. L., Culberson, C., Shafer, J. A. y Kuo, L. C., 1994. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J. Biol. Chem.* 269:26344-26348.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolov, E., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., et al., 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197-211.

Anhidrasa carbónica

- Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G. y Rees, D. C., 2001. Crystal structure of the "cab"-type beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermophilum*. *J. Biol. Chem.* 276:10299-10305.
- Lindskog, S. y Coleman, J. B., 1973. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2505-2508.
- Kannan, K. K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lovgren, S., Ohlsson, A. y Petef, M., 1975. Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B: Three-dimensional structure at a nominal 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:51-55.
- Borlaack-Sjodin, P. A., Zeitlin, S., Chen, H. H., Crenshaw, L., Gross, S., Dantamayana, A., Delgado, P., May, J. A., Dean, T. y Christianson, D. W.,

1998. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein Sci.* 7:2483-2489.
- Wooley, P., 1975. Models for metal ion function in carbonic anhydrase. *Nature* 258:677-682.
- Jonsson, B. H., Steiner, H. y Lindskog, S., 1976. Participation of buffer in the catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *FEBS Lett.* 64:310-314.
- Sly, W. S. y Hu, P. Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.* 64:375-401.
- Maren, T. H., 1988. The kinetics of HCO_3^- synthesis related to fluid secretion, pH control y CO_2 elimination. *Annu. Rev. Physiol.* 50:695-717.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G. y Rees, D. C., 1996. A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanococcus thermophila*. *EMBO J.* 15:2323-2330.

Enzimas de restricción

- Selvaraj, S., Kono, H. y Sarai, A., 2002. Specificity of protein-DNA recognition revealed by structure-based potentials: Symmetric/asymmetric and cognate/non-cognate binding. *J. Mol. Biol.* 322: 907-915.
- Winkler, F. K., Banner, D. W., Oefner, C., Tserngou, D., Brown, R. S., Heathman, S. P., Bryan, R. K., Martin, P. D., Petratos, K. y Wilson, K. S., 1993. The crystal structure of EcoRV endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments. *EMBO J.* 12:1781-1795.
- Kosmewa, D. y Winkler, F. K., 1995. Mg^{2+} binding to the active site of EcoRV endonuclease: A crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry* 34:683-696.
- Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P. A., Wilson, K. S. y Kakkinidis, M., 1994. Crystal structure of Pvull endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV. *Nat. Struct. Biol.* 1:469-475.
- Sam, M. D. y Perona, J. J., 1999. Catalytic roles of divalent metal ions in phosphoryl transfer by EcoRV endonuclease. *Biochemistry* 38:6576-6586.
- Jentsch, A. y Pingoud, A., 1996. Horizontal gene transfer contributes to the wide distribution and evolution of type II restriction-modification systems. *J. Mol. Evol.* 42:91-96.

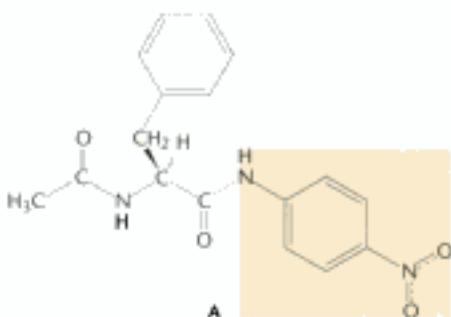
NMP quinasas

- Krishnanarthy, H., Lou, H., Kimple, A., Vieille, C. y Cukier, R. I., 2005. Associative mechanism for phosphoryl transfer: A molecular dynamics simulation of *Escherichia coli* adenylyl kinase complexed with its substrates. *Proteins* 58:88-100.
- Byeon, L., Shi, Z. y Tsai, M. D., 1995. Mechanism of adenylyl kinase: The "essential lysine" helps to orient the phosphates and the active site residues to proper conformations. *Biochemistry* 34:3172-3182.
- Dreusick, D. y Schulz, G. E., 1986. The glycine-rich loop of adenylyl-ate kinase forms a giant anion hole. *FEBS Lett.* 208:301-304.
- Pai, E. F., Sachsenheimer, W., Schremer, R. H. y Schulz, G. E., 1977. Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylyl kinase. *J. Mol. Biol.* 114:37-45.
- Schlauderer, G. J., Proba, K. y Schulz, G. E., 1996. Structure of a mutant adenylyl kinase ligated with an ATP-analogue showing domain closure over ATP. *J. Mol. Biol.* 256:223-227.
- Vomrhein, C., Schlauderer, G. J. y Schulz, G. E., 1995. Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. *Structure* 3:483-490.
- Muller-Dieckmann, H. J. y Schulz, G. E., 1994. The structure of uridylyl kinase with its substrates, showing the transition state geometry. *J. Mol. Biol.* 236:361-367.

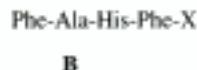
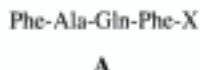
Problemas

1. Sin explosión. El examen de la ruptura del sustrato amida cromógeno, A, por la quimotripsina mediante el uso de los métodos cinéticos de flujo detenido revela la no existencia de la fase explosiva.

La reacción se monitoriza mediante el color producido por la liberación de la parte amina del sustrato (destacado en naranja). ¿Por qué no se observa la fase explosiva?



2. *Contribuyendo a su propia desaparición*. Considerar los sustratos A y B de la subtilisina.



Estos sustratos se rompen (entre Phe y X) mediante la subtilisina nativa prácticamente a la misma velocidad. Sin embargo, el mutante de subtilisina con la sustitución de la His 64 por Ala, rompe al sustrato B más de 1000 veces más rápido que al sustrato A. Proporcionar una explicación.

3. $I + I \neq 2$. Considerar el argumento siguiente. En la subtilisina, la mutación de la Ser 221 por Ala origina una disminución en la actividad de 10^6 veces. La mutación de la His 64 por Ala origina una disminución similar de 10^6 veces. Por lo tanto, la mutación simultánea de Ser 221 por Ala e His 64 por Ala deberían originar una reducción de la actividad de $10^6 \times 10^6 = 10^{12}$ veces. ¿Es este razonamiento correcto? ¿Por qué?

4. *Añadir una carga.* Se construyó un mutante de quimotripsina cambiando la Ser 189 por Asp, en el fondo del bolsillo específico para la unión del sustrato. ¿Qué efecto se podría predecir para esta mutación de Ser 189 → Asn 189?

5. Resultados condicionales. La mutación, en la anhidrasa carbónica II, del residuo de His 64 por Ala en la lanzadera de protones se supuso que daría lugar a una disminución de la velocidad catalítica máxima. Sin embargo, en amortiguadores con componentes moleculares de pequeño tamaño, como el imidazol, no se observó una disminución de la velocidad. En amortiguadores con componentes moleculares más voluminosos se observó una reducción significativa de la velocidad. Proponer una explicación.

6. *¿Cuántos centros?* Un investigador ha aislado una endonucleasa de restricción que rompe en un solo centro particular de 10 pares de bases. ¿Se podría utilizar este enzima para proteger a las células de las infecciones víricas, teniendo en cuenta que un genoma vírico típico tiene una longitud de 50 000 pares de bases? Explicarlo.

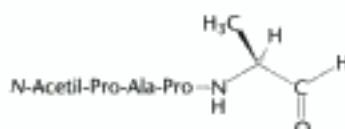
7. ¿Más rápido es mejor? En general, las endonucleasas de restricción son enzimas bastante lentos con un número de recambio típico de 1 s^{-1} . Suponer que las endonucleasas fueran más rápidas con números de recambio similares a los de la anhídrua carbónica (10^6 s^{-1}). ¿Este incremento en la velocidad podría beneficiar a las

células hospedadoras, suponiendo que los enzimas rápidos tuvieran niveles de especificidad similares?

8. *Adopción de un nuevo gen.* Suponer que una especie de bacteria, mediante una transferencia horizontal de genes, ha generado un gen que codifica una endonucleasa de restricción. ¿Se podría esperar que esta adquisición le sea beneficiosa?

9. *Terapia por quelación.* El tratamiento de la anhidrasa carbónica con elevadas concentraciones de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), un quelante de metales, produce la pérdida de la actividad del enzima. Proponer una explicación.

10. Un inhibidor aldehídico. La elastasa se inhibe específicamente por un aldehído derivado de uno de sus sustratos:

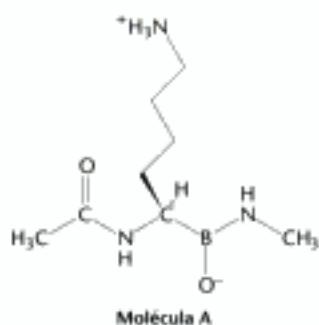


- (a) ¿Cuál es el residuo que tiene más probabilidad de formar un enlace covalente con este aldehído en el centro activo de la elastasa?
 (b) ¿Qué tipo de enlace covalente se forma?

11. *Predecir el producto.* La adenilato quinasa de incubó con adenosina difosfato (ADP).

- (a) ¿Qué productos se generarán?
 (b) Si la concentración inicial de ADP es 1 mM, predecir las concentraciones de ADP y de los productos de la parte (a), después de incubar con la adenosilato quinasa durante mucho tiempo.

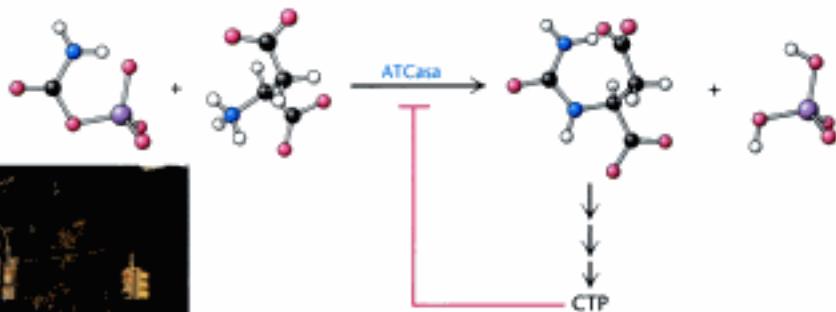
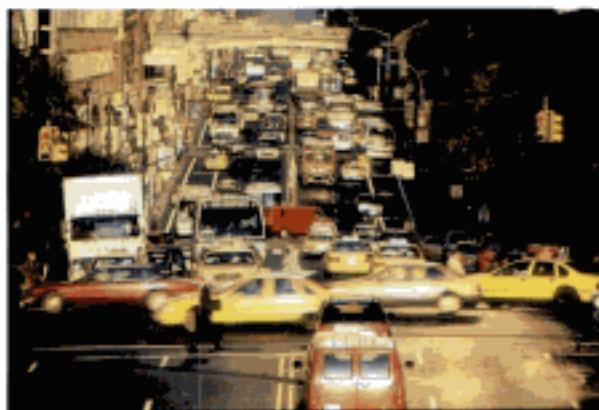
12. *Identificar al enzima.* Considerar la estructura de la molécula A. ¿Qué enzima de los descritos en este capítulo se piensa que será inhibido más eficazmente por la molécula A?



Problema de mecanismos

13. *Completar el mecanismo.* Sobre la base de la información proporcionada en la Figura 9.18, completar los mecanismos de ruptura del enlace peptídico por (a) una cisteína proteasa, (b) una aspartilproteasa y (c) una metaloproteasa.

Estrategias reguladoras



Al igual que el tráfico rodado, las vías metabólicas fluyen con mayor eficacia cuando están reguladas por señales. El CTP, producto final de una ruta con muchas etapas, controla el flujo a través de esta vía inhibiendo una etapa clave catalizada por la aspartato transcarbamilasa (ATCasa). [(A la izquierda) Foto Richard Baven-holtz/The Stock Market.]

A menudo, la actividad de los enzimas debe regularse de modo que funcione en el tiempo y lugar adecuados. Esta regulación es clave para coordinar el gran número de procesos bioquímicos que suceden en un instante en cualquier organismo. La actividad enzimática se regula de cuatro maneras principales:

1. *Control alostérico*. Las proteínas alostéricas contienen distintos centros reguladores y múltiples centros funcionales. La unión de pequeñas moléculas-señal a los centros reguladores constituye una forma significativa de controlar la actividad de estas proteínas. Más aún, las proteínas alostéricas exhiben una propiedad denominada *cooperatividad*, por la que la actividad de un centro funcional afecta la actividad de los demás. Las proteínas que muestran control alostérico son, por tanto, transductoras de información: su actividad puede modificarse en respuesta a moléculas-señal o a información compartida entre los centros activos. Este capítulo estudia una de las proteínas alostéricas mejor conocidas: el enzima *aspartato transcarbamilasa* (ATCasa). Este enzima cataliza la primera etapa en la síntesis de pirimidinas que se inhibe a través de citidina trifosfato, el producto final de la biosíntesis. Esta inhibición constituye un ejemplo representativo de *retroinhibición* (o *inhibición "feedback"*). Ya hemos estudiado una proteína alostérica, la hemoglobina, que es la proteína transportadora de oxígeno en la sangre (Capítulo 7).

2. *Múltiples formas enzimáticas*. Los isozimas, o isoenzimas, aportan una vía para regular de modo diverso la misma reacción en diferentes localizaciones o tiempos. Los isozimas son enzimas homólogos dentro de un mismo organismo que catalizan

Contenido

- 10.1 La aspartato transcarbamilasa se inhibe allostéricamente por el producto final de su propia vía
- 10.2 Los isozimas aportan modos específicos de regulación a los diferentes tejidos y en distintas fases del desarrollo
- 10.3 La modificación covalente es una forma de regular la actividad enzimática
- 10.4 Muchos enzimas se activan por escisiones proteolíticas específicas

la misma reacción pero presentan ligeras diferencias en su estructura y, más lógicamente, en los valores de sus K_M y V_{max} , así como en sus propiedades reguladoras. A menudo, los isozimas se expresan en un tejido u órgano diferente, o bien en distintas fases del desarrollo del individuo.

3. *Modificación covalente reversible*. Las propiedades catalíticas de muchos enzimas se alteran notablemente por la unión covalente de un grupo químico que los modifica, habitualmente un grupo fosforilo. El ATP actúa como dador de fosforilo en las reacciones catalizadas por *proteína quinasas*. La eliminación de los grupos fosforilo por hidrólisis está catalizada por *proteína fosfatases*. En este capítulo se estudia la estructura, especificidad y control de la *proteína quinasa A* (PKA), un enzima eucariótico omnipresente que regula diversas proteínas diana.

4. *Activación proteolítica*. Los enzimas controlados por alguno de estos mecanismos oscilan de forma cíclica entre sus formas activa e inactiva. Se utiliza un modo diferente de regulación para convertir *de manera irreversible* un enzima inactivo en otro activo. Muchos enzimas se activan por hidrólisis de unos pocos o incluso un solo enlace peptídico de sus precursores inactivos, llamados *zimógenos* o *proenzimas*. Este mecanismo regulador genera enzimas digestivos, tales como la quimotripsina, la tripsina y la pepsina. La coagulación sanguínea se debe a una asombrosa cascada de activaciones de zimógenos. Los enzimas activos de la digestión y de la coagulación sanguínea se desactivan al unirse irreversiblemente con proteínas inhibidoras específicas que actúan como cebores irresistibles para sus presas moleculares.

5. *Control de la cantidad de enzima presente*. La actividad enzimática también puede regularse ajustándose la cantidad de enzima presente. Este importante modo de regulación tiene lugar habitualmente durante la transcripción. Estudiaremos el control de la transcripción de genes en el Capítulo 31.

Para empezar, estudiaremos los principios del alosterismo estudiando el enzima aspartato transcarbamilasa.

10.1 La aspartato transcarbamilasa se inhibe alostéricamente por el producto final de su propia vía

La aspartato transcarbamilasa cataliza la primera etapa de la biosíntesis de pirimidinas: la condensación de aspartato y carbamilfosfato para formar *N*-carbamilaspartato y ortofosfato (Figura 10.1). Esta reacción es un paso obligado de la vía que al final proporciona nucleótidos pirimidínicos, como la citidina trifosfato (CTP). ¿Cómo se regula este enzima para generar exactamente la cantidad de CTP que necesita la célula?

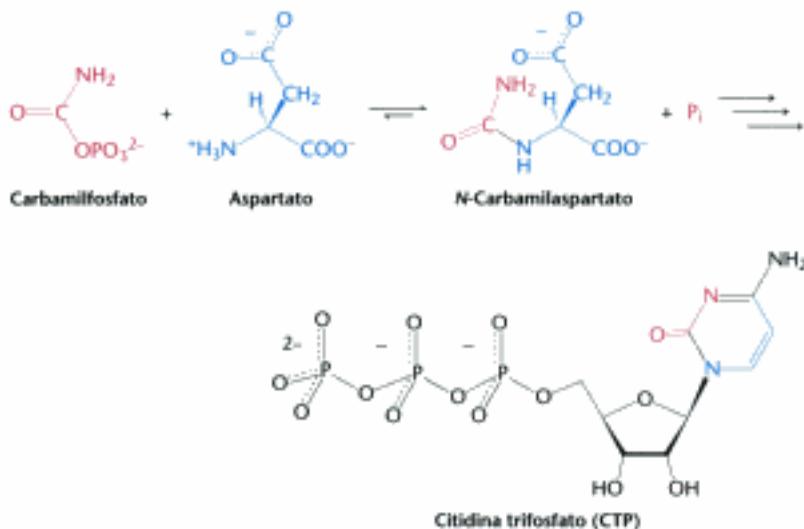


Figura 10.1 Reacción de la ATCase. La aspartato transcarbamilasa cataliza una etapa necesaria para la síntesis de pirimidinas, la condensación de aspartato y carbamilfosfato, para formar *N*-carbamilfosfato.

John Gerhart y Arthur Pardee descubrieron que la ATCasa se inhibe por CTP, el producto final de la vía iniciada por la propia ATCasa. La velocidad de reacción catalizada por la ATCasa es rápida a bajas concentraciones de CTP, pero disminuye a medida que aumenta la concentración de CTP (Figura 10.2). De este modo, la vía sigue produciendo nuevas pirimidinas hasta que se acumulan cantidades suficientes de CTP. La inhibición de la ATCasa por CTP constituye un ejemplo de la denominada *retroinhibición*, la inhibición de un enzima por el producto final de la vía. La retroinhibición causada por CTP asegura que cuando abundan las pirimidinas no se produzcan innecesariamente ni *N*-carbamilaspartato ni los siguientes compuestos intermedios.

Resulta llamativa la capacidad inhibitoria del CTP, dado que *el CTP es muy distinto estructuralmente a los sustratos de la reacción* (véase Figura 10.1). Esto supone que el CTP debe unirse a un centro distinto del centro activo donde se unen los sustratos. Tales centros se llaman *alostéricos* o *centros reguladores*. El CTP es un ejemplo de *inhibidor alostérico*. En la ATCasa (cosa que no ocurre en todos los enzimas regulados allostéricamente), los centros catalíticos y los reguladores están situados en distintas cadenas polipeptídicas.

Los enzimas regulados allostéricamente no siguen cinéticas de Michaelis-Menten

Los enzimas alóstéricos se distinguen por su respuesta a los cambios en la concentración de sustrato, además de por su susceptibilidad a ser regulados por otras moléculas. Examinemos la velocidad de formación de producto por la ATCasa en función de la concentración de sustrato (Figura 10.3). La curva difiere de la esperada para un enzima que sigue una cinética de Michaelis-Menten. La curva obtenida se denomina *sigmoidea* porque se parece a una "S". La gran mayoría de enzimas alóstéricos muestran cinéticas sigmoidales. Recuérdese, de la discusión de la hemoglobina, que las curvas sigmoidales se deben a la existencia de cooperatividad entre subunidades: la unión de sustrato a un centro activo de la molécula aumenta la probabilidad de que más sustrato se una a otros centros activos. Para entender las bases de la cinética enzimática sigmoidal y de la inhibición por CTP, primero necesitamos examinar la estructura de la ATCasa.

La ATCasa consta de subunidades catalíticas y reguladoras separables

¿Qué pruebas tenemos de que la ATCasa posee centros catalíticos y reguladores diferentes? La ATCasa puede literalmente dissociarse en subunidades reguladoras (*r*) y catalíticas (*c*) por tratamiento con un compuesto mercurial, como el *p*-hidroximercuribenzoato que reacciona con los grupos sulfhidrilo (Figura 10.4). Los estudios

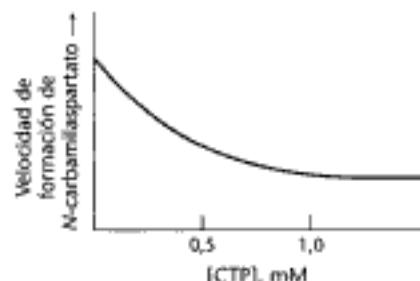


Figura 10.2 El CTP inhibe la ATCasa. La citidina trifosfato, uno de los productos finales de la vía que sintetiza pirimidinas, inhibe la aspartato transcarbamila, a pesar de tener escasa semejanza estructural con los reactantes o con los productos.

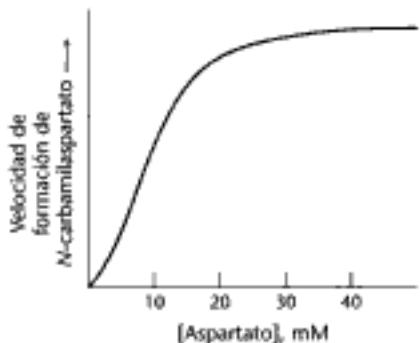


Figura 10.3 La ATCasa muestra cinética sigmoidal. Una representación de la formación de producto en función de la concentración de sustrato proporciona una curva sigmoidal porque la unión de sustrato a un centro activo aumenta la actividad de los demás centros activos. Por este motivo, el enzima muestra cooperatividad.

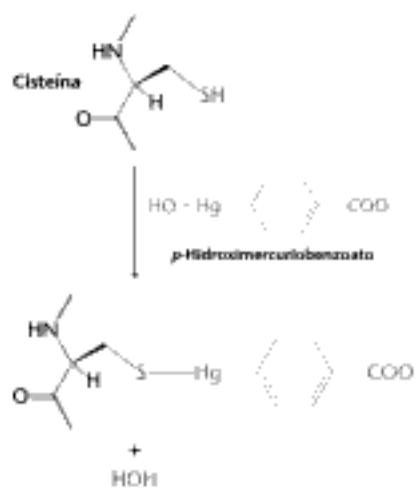


Figura 10.4 Modificación de los residuos de cisteína. El *p*-hidroximercuribenzoato reacciona con residuos de cisteína cruciales de la aspartato transcarbamila.

de ultracentrifugación realizados por John Gerhart y Howard Schachman demostraron que los mercuriales disocian la ATCasa en dos clases de subunidades (Figura 10.5). Las subunidades pueden separarse fácilmente por cromatografía de intercambio iónico, porque difieren notablemente en su carga, o por centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa, porque difieren en su tamaño. Estas diferencias en tamaño se reflejan en los coeficientes de sedimentación: el del enzima nativo es 11,6S, mientras que los coeficientes de las subunidades disociadas son 2,8S y 5,8S. Los grupos de *p*-mercuriobenzoato unidos pueden liberarse de las subunidades separadas por adición de mercaptoetanol en exceso, proporcionando subunidades aisladas para su posterior estudio.

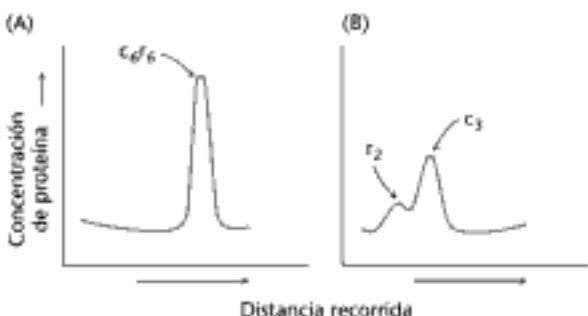
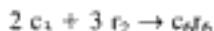


Figura 10.5 Estudios de ultracentrifugación de la ATCasa. Los patrones de las velocidades de sedimentación de la ATCasa nativa (A), y del enzima después del tratamiento con *p*-hidroximercurobenzoato (B), muestran que el enzima se ha disociado en sus subunidades catalíticas y reguladoras. [Tomado de J. C. Gerhart y H. K. Schachman. *Biochemistry* 4(1965):1054-1062.]

La subunidad mayor se llama *subunidad catalítica*. Esta subunidad presenta actividad catalítica pero no se ve afectada por el CTP y no muestra cinética sigmaidea. La subunidad menor aislada puede enlazar CTP pero no tiene actividad catalítica. En consecuencia, esta subunidad se llama *subunidad reguladora*. La subunidad catalítica (c_3) consta de tres cadenas (de 34 kd cada una), y la subunidad reguladora (r_2) consta de dos cadenas (de 17 kd cada una). Cuando se mezclan, las subunidades catalítica y reguladora se combinan con rapidez. El complejo resultante tiene la misma estructura, c_6r_6 , que el enzima nativo: dos trímeros catalíticos y tres dímeros reguladores.



Sorprendentemente, el enzima así reconstituido tiene las mismas propiedades alostéricas que el enzima nativo. Así pues, la ATCasa consta de subunidades catalíticas y reguladoras distintas, y la *interacción de las subunidades en el enzima nativo origina sus propiedades reguladoras y catalíticas*.

Las interacciones alostéricas en la ATCasa están mediadas por grandes cambios en su estructura cuaternaria

¿Qué interacciones entre subunidades son responsables de las propiedades de la ATCasa? La determinación de la estructura tridimensional de la ATCasa realizada por primera vez en el laboratorio de William Lipscomb mediante cristalográfica por rayos X, ha aportado pistas significativas de diversa índole. Los dos trímeros catalíticos están apilados, uno encima del otro, unidos por tres dímeros de cadenas reguladoras (Figura 10.6). Existen contactos significativos entre las subunidades catalíticas y reguladoras: así, cada cadena r de un dímero regulador interacciona con una cadena c del trímero catalítico. La cadena c está en contacto con un dominio estructural de la cadena r que está estabilizado por un ion zinc que se une a cuatro residuos de cisteína. La capacidad del *p*-hidroximercurobenzoato para disociar las subunidades catalíticas y reguladoras está relacionada con la afinidad del mercurio para

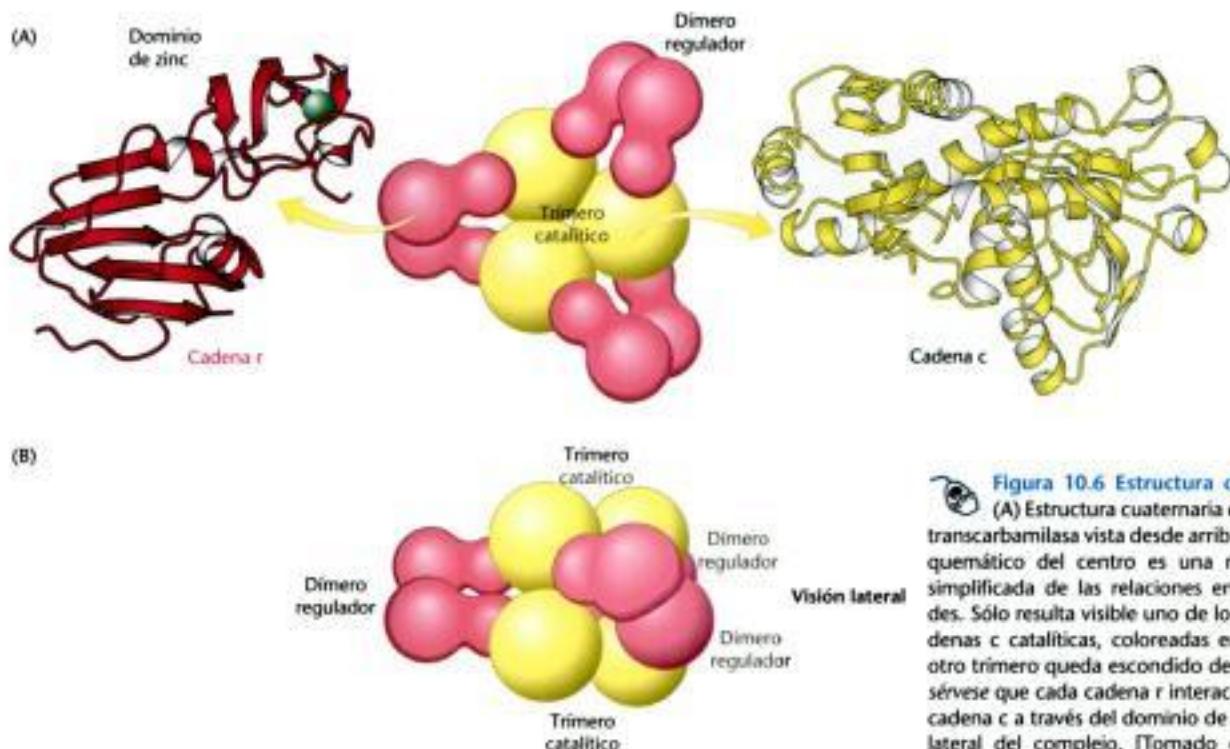


Figura 10.6 Estructura de la ATCasa.
 (A) Estructura cuaternaria de la aspartato transcarbamila vista desde arriba. El dibujo esquemático del centro es una representación simplificada de las relaciones entre subunidades. Sólo resulta visible uno de los trimeros [cadenas c catalíticas, coloreadas en amarillo]. El otro trímero queda escondido detrás de él. Obsérvese que cada cadena r interacciona con una cadena c a través del dominio de zinc (B) Visión lateral del complejo. [Tomado de 1RAI.pdb.]

unirse fuertemente a los residuos de cisteína, desplazando al zinc y desestabilizando este dominio de la subunidad r.

Para localizar los centros activos, se cristalizó el enzima en presencia de *N*-(fosfonacetyl)-l-aspartato (PALA), un análogo bisustrato (es decir, un análogo de los dos sustratos del enzima) que se parece a un intermediario de la catálisis (Figura 10.7). El PALA es un potente inhibidor competitivo de la ATCasa; se une a los centros activos y los bloquea. La estructura del complejo ATCasa-PALA revela que el PALA se une a centros situados en la interfase de las parejas de cadenas c, dentro de cada trímero catalítico (Figura 10.8). Cada trímero catalítico aporta tres centros activos al enzima completo. Un examen más detallado del complejo ATCasa-PALA revela que al unirse el PALA tiene lugar un cambio importante en la estructura cuaternaria del enzima. Los dos trimeros catalíticos se desplazan unos 12 Å, alejándose uno del otro,

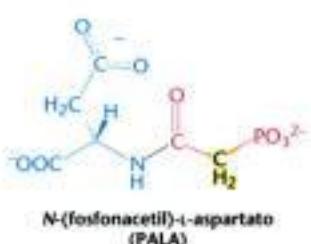
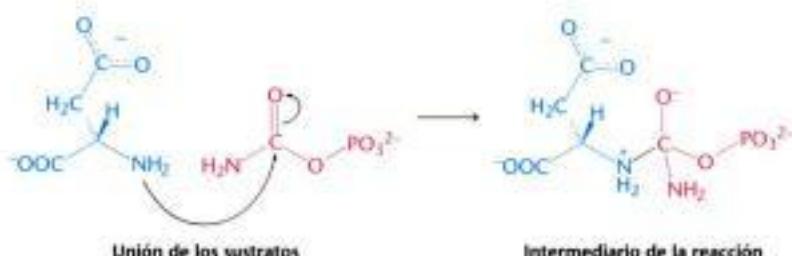


Figura 10.7 El PALA, un análogo bisustrato.
 (Arriba) El ataque nucleofílico del grupo amino del aspartato sobre el carbono carbonílico del carbamilo-fosfato genera un intermediario en el proceso de formación de *N*-carbamilaspartato. (Abajo) El *N*-(fosfonacetyl)-l-aspartato (PALA) es un análogo de este intermediario de reacción y resulta ser un potente inhibidor competitivo de la aspartato transcarbamila.

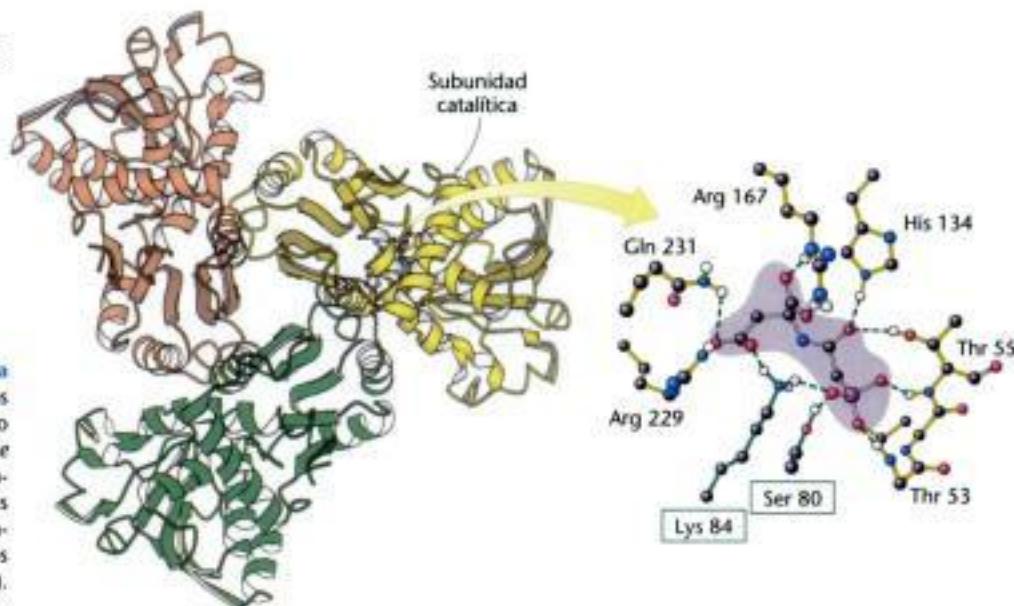


Figura 10.8 Centro activo de la ATCasa. Se representan algunos residuos cruciales del centro activo uniéndose al inhibidor PALA. Obsérvese que el centro activo está formado principalmente por residuos de una de las subunidades, pero la subunidad adyacente también contribuye con residuos importantes (enmarcados en verde). [Tomado de 8ATC.pdb.]

y girando aproximadamente 10 grados alrededor de su eje ternario de simetría común. Además, los dímeros reguladores giran aproximadamente unos 15 grados para acomodarse a este desplazamiento (Figura 10.9). Al unirse al PALA, el enzima literalmente se expande. En resumen, la ATCasa presenta dos formas diferentes de estructura cuaternaria: una que predomina en ausencia de sustratos o sus análogos, y otra que predomina cuando están unidos los sustratos o los análogos. Estas formas se denominan, respectivamente, estado T (tenso) y estado R (relajado), términos que ya usamos para los dos estados cuaternarios de la hemoglobina.

¿Cómo podemos explicar la cinética sigmoidea del enzima en base a las observaciones de su estructura? Como sucedía con la hemoglobina (p. 188), el enzima está en equilibrio entre los estados T y R. En ausencia de sustrato, casi todas las moléculas del enzima están en estado T. El estado T tiene escasa afinidad por el sustrato y, por consiguiente, muestra baja actividad catalítica. La unión ocasional de una molécula de sustrato a un centro activo del enzima aumenta la probabilidad de que el enzima completo se desplace al estado R aumentando su afinidad en la unión. La adición de más sustrato tiene dos efectos. Primero, aumenta la probabilidad de que cada molécula del enzima una otra nueva molécula de sustrato. Segundo, aumenta el promedio de moléculas de sustrato unidas a cada enzima. La presencia de más sustrato aumentará la fracción de moléculas de enzima en el estado R más activo, porque *la posición del equilibrio depende del número de centros activos que estén ocupados por sustrato*. Ya hemos tratado esta propiedad, denominada *cooperatividad*.

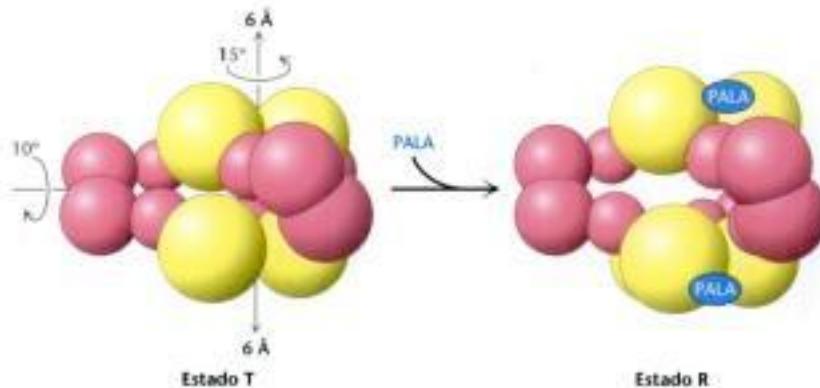


Figura 10.9 Transición del estado T al R en la ATCasa. La aspartato transcarbamilasa presenta dos conformaciones: una compacta, relativamente inactiva, llamada tensa (T) y otra expandida llamada relajada (R). Obsérvese que la estructura de la ATCasa cambia drásticamente de forma durante la transición del estado T al R. La unión del PALA estabiliza el estado R.

porque las subunidades cooperan entre sí, cuando estudiamos la curva sigmoidea obtenida para la unión del oxígeno a la hemoglobina.

Este mecanismo para la regulación alostérica se denomina *mecanismo concertado* debido a que el cambio del enzima es "todo o nada": el enzima completo se convierte de T a R, afectando por igual a todos los centros catalíticos (p. 189). Por el contrario, el *modelo secuencial* supone que la unión de ligando a un centro del complejo puede afectar a los centros vecinos, sin obligar a que todas las subunidades tengan que experimentar la transición de T a R. Aunque el mecanismo concertado explica satisfactoriamente el comportamiento de la ATCasa, otros muchos enzimas allostéricos muestran características de ambos modelos.

La curva sigmoidea para la ATCasa puede considerarse como una curva compuesta por dos curvas de Michaelis-Menten, una que correspondería al estado T y la otra al estado R. Un aumento en la concentración de sustrato favorecería la transición de la curva del estado T a la correspondiente del estado R (Figura 10.10). Obsérvese que este comportamiento sigmoideo presenta una consecuencia adicional: en el intervalo de concentración en el que transcurre la transición entre T y R, la curva depende de forma muy pronunciada de la concentración de sustrato. El enzima cambia de un estado menos activo a un estado más activo en un estrecho intervalo de concentraciones de sustrato. Este comportamiento es beneficioso cuando es fisiológicamente importante responder a pequeñas variaciones en la concentración de sustrato. Los efectos de los sustratos en los enzimas alóstéricos se denominan *efectos homotrópicos* (del Griego *homós*, "el mismo").

En estudios realizados con el trímero catalítico aislado, la subunidad catalítica muestra una curva hiperbólica característica de la cinética de Michaelis-Menten, que no se distingue de la curva deducida para el estado R (véase la Figura 10.10). De este modo, el término *tensio* es adecuado: ya que en el estado T, los dímeros reguladores mantienen los trímeros catalíticos lo suficientemente cercanos entre sí para que colisionen bucles clave de sus superficies e intervengan en los ajustes conformacionales necesarios para conseguir una elevada afinidad por el sustrato y por la catálisis.

Los reguladores alóstéricos modulan el equilibrio entre T y R

Volvamos ahora a los efectos del CTP. Hemos visto que el CTP inhibe la actividad de la ATCasa. Los estudios por rayos X de la ATCasa en presencia de CTP han demostrado que (1) el enzima se une al CTP cuando está en estado T y (2) que hay un centro de unión para este nucleótido en cada cadena reguladora, en un dominio que no interacciona con la subunidad catalítica (Figura 10.11). Cada centro activo está situado a más de 50 Å del centro de unión a CTP más próximo. Se plantea de inmediato la cuestión de cómo el CTP puede inhibir la actividad catalítica del enzima si no interacciona con las cadenas catalíticas.

Los cambios en la estructura cuaternaria observados al unirse el enzima a un análogo del sustrato sugieren un mecanismo para la inhibición por CTP (Figura 10.12). La unión del inhibidor CTP desplaza el equilibrio hacia el estado T, disminuyendo la actividad neta del enzima. La unión de CTP dificulta que la unión de sustrato con-



Figura 10.10 Fundamento de la curva sigmoidea. La aparición de una curva sigmoidea debida a la existencia de cooperatividad puede entenderse imaginándose un enzima alóstérico como una mezcla de dos enzimas que presentan cinéticas de Michaelis-Menten, una con un elevado valor de K_M (que correspondería al estado T) y otra con un bajo valor de K_M (que correspondería al estado R). Conforme aumenta la concentración de sustrato, el equilibrio se desplaza del estado T al R, lo que se traduce en un pronunciado aumento de actividad con respecto a la concentración de sustrato.

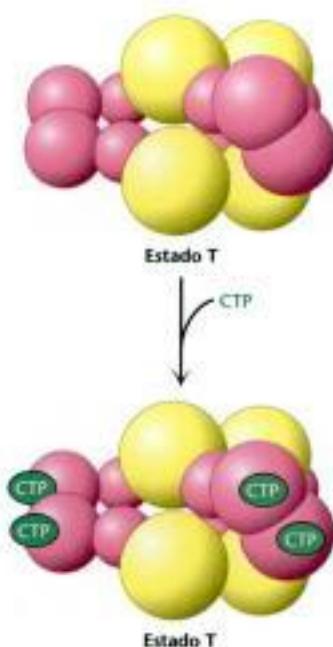


Figura 10.11 El CTP estabiliza el estado T. La unión de CTP a la subunidad reguladora de la aspartato transcarbamilasa estabiliza el estado T.

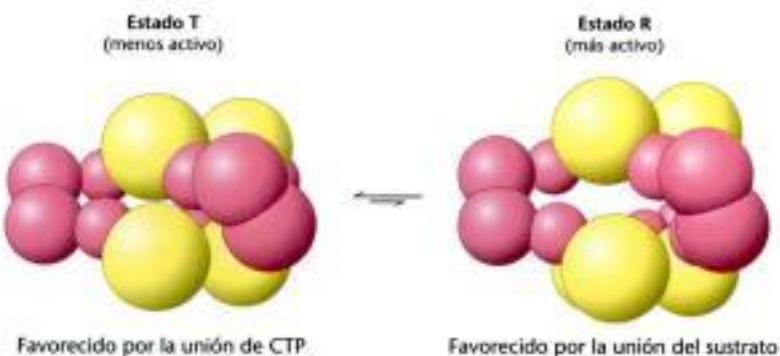


Figura 10.12 Los estados R y T están en equilibrio. Aún en ausencia de cualquier sustrato o regulador, la aspartato transcarbamilasa está en equilibrio entre los estados R y T. En estas condiciones, el estado T está favorecido unas 200 veces.

vierta el enzima al estado R. En consecuencia, el CTP alarga la fase inicial de la curva sigmoidal (Figura 10.13). Se requiere más sustrato para alcanzarse una velocidad de reacción determinada.

Curiosamente, el ATP también es un efecto alostérico de la ATCasa. Sin embargo, el efecto del ATP consiste en aumentar la velocidad de reacción a una determinada concentración de aspartato (Figura 10.14). A elevada concentración de ATP, el perfil de la cinética muestra un comportamiento sigmoidal menos pronunciado. El ATP compite con el CTP por unirse a los centros reguladores. En consecuencia, niveles elevados de ATP impiden que el CTP inhiba al enzima. Los efectos de moléculas que no son sustratos de los enzimas alostéricos (tales como el CTP y el ATP en la ATCasa) se denominan *efectos heterotrópicos* (del Griego *heteros*, “diferente”).

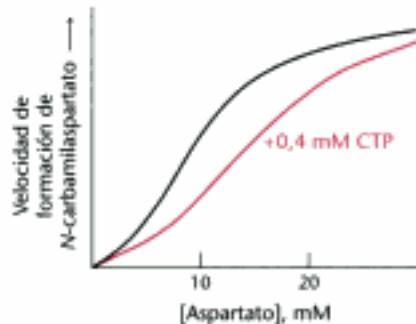


Figura 10.13 Efecto del CTP en la cinética de la ATCasa. La citidina trifosfato (CTP) estabiliza el estado T de la aspartato transcarbamila, haciendo más difícil que la unión de sustrato permita al enzima pasar al estado R. El resultado es que la curva se desplaza hacia la derecha, como se muestra en rojo.

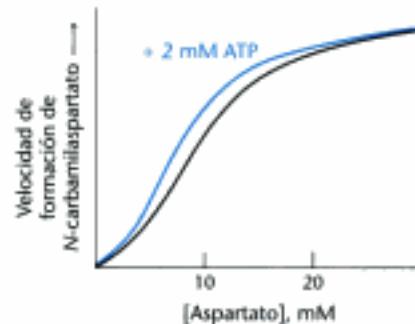


Figura 10.14 Efecto del ATP en la cinética de la ATCasa. El ATP es un activador alostérico de la aspartato transcarbamila porque estabiliza el estado R, facilitando la unión del sustrato al enzima. El resultado es que la curva se desplaza a la izquierda, como se muestra en azul.

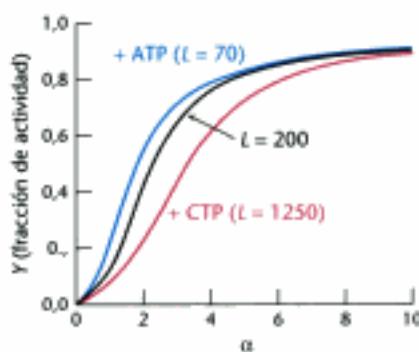


Figura 10.15 Descripción cuantitativa del modelo MWC. En esta descripción del modelo MWC (Monod, Wyman y Changeux), la fracción de actividad, Y, corresponde a la fracción de centros activos ocupados por sustrato y es directamente proporcional a la velocidad de reacción; α es el cociente entre la $[S]$ y la constante de disociación de S con el enzima en el estado R; L es el cociente entre la concentración del enzima en los estados T y R. La unión de los reguladores ATP y CTP a la ATCasa modifica el valor de L y, por ello, la respuesta a la concentración de sustrato. Para dibujar estas curvas se ha empleado la fórmula de la página 200, dando a c el valor de 0,1 y a n el de 6.

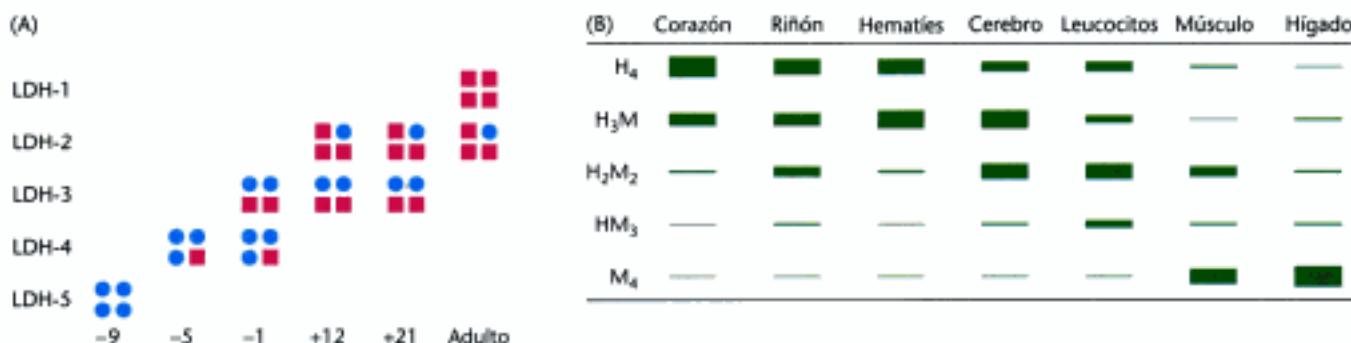
El aumento de la actividad ATCasa en respuesta al incremento de la concentración de ATP tiene dos posibles explicaciones fisiológicas. La primera es que las elevadas concentraciones de ATP denotan una alta concentración de nucleótidos púricos en la célula; el aumento de la actividad ATCasa tenderá a equilibrar los depósitos de purinas y de pirimidinas. La segunda, una alta concentración de ATP indica que en la célula existe suficiente energía almacenada para promover la síntesis de mRNA y la replicación del DNA y dirige la síntesis de pirimidinas necesarias para estos procesos.

En el Apéndice del Capítulo 7, se ha desarrollado una descripción cuantitativa del modelo concertado. Aunque se ha desarrollado para describir un proceso de unión, el modelo también sirve para la actividad enzimática, ya que la fracción de centros activos del enzima unidos a sustrato es proporcional a la actividad enzimática. Un aspecto clave de este modelo es el equilibrio que se establece entre los estados T y R (p. 200). Se define L como la constante de equilibrio entre las formas R y T.

$$R \rightleftharpoons T \qquad L = \frac{[T]}{[R]}$$

En este modelo pueden simularse los efectos del CTP y ATP simplemente cambiando el valor de L . Así, para la forma saturada de CTP, el valor de L aumenta hasta 1250. De este modo, se necesita más sustrato para desplazar el equilibrio de forma significativa hacia la forma R. Para la forma saturada de ATP, el valor de L disminuye hasta 70 (Figura 10.15).

De este modo, el modelo concertado nos da una buena descripción del comportamiento cinético de la ATCasa en presencia de sus reguladores clave.



10.2 Los isozimas aportan modos específicos de regulación a los diferentes tejidos y en distintas fases del desarrollo

Los *isozimas* o *isoenzimas* son enzimas que difieren en sus secuencias aminoacídicas, pero catalizan la misma reacción. Normalmente, estos enzimas presentan diferentes parámetros cinéticos, tales como la K_m , o responden a distintas moléculas reguladoras. Están codificados por genes distintos, que normalmente aparecen por duplicación génica y posterior divergencia. A menudo, los isozimas pueden distinguirse uno de otro por sus propiedades bioquímicas, tales como su movilidad electroforética.

La existencia de isozimas permite el ajuste fino del metabolismo para satisfacer las necesidades particulares de un tejido o una etapa determinada del desarrollo. Consideremos el ejemplo de la lactato deshidrogenasa (LDH), un enzima que cataliza una etapa del metabolismo anaeróbico de la glucosa y de la síntesis de glucosa. Los humanos disponemos de dos cadenas polipeptídicas isoenzimáticas para este enzima: el isozima H, que se expresa abundantemente en el músculo cardíaco y el isozima M que lo hace en el músculo esquelético. Sus secuencias aminoacídicas son idénticas en un 75%. El enzima funcional es tetramérico y en él pueden darse diferentes combinaciones de cadenas polipeptídicas isoenzimáticas. El isozima H₄, presente en el corazón, tiene mayor afinidad por los sustratos que el isozima M₄. Ambos isozimas también difieren en que altos niveles de piruvato inhiben alostéricamente a H₄, pero no a M₄. Las otras combinaciones, tales como H₃M, presentan propiedades intermedias. Veremos el contexto biológico de estos enzimas en el Capítulo 16.

El isozima M₄ funciona de forma óptima en un entorno anaeróbico de duro trabajo como ocurre en el músculo esquelético, mientras que H₄ lo hace en el ambiente aeróbico del músculo cardíaco. De hecho, la proporción de ambos enzimas se modifica durante el desarrollo del corazón de rata, sobretodo cuando ese tejido pasa de un entorno anaeróbico a otro aeróbico (Figura 10.16A). La figura 10.16B muestra las formas de la lactato deshidrogenasa específicas para cada tejido en rata adulta.

La aparición en sangre de algunos isozimas es indicativa de lesiones tisulares y es de utilidad en el diagnóstico clínico. Así, por ejemplo, un aumento en sangre de H₄ respecto a H₃M indica que un infarto de miocardio, o ataque al corazón, ha dañado las células del músculo cardíaco provocando la liberación de material celular.

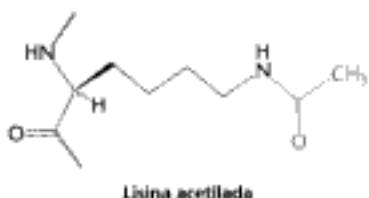
10.3 La modificación covalente es una forma de regular la actividad enzimática

La unión covalente de otra molécula puede modificar la actividad de los enzimas y la de otras muchas proteínas. En estos casos, una molécula dadora aporta un fragmento funcional que modifica las propiedades de la proteína receptora. La mayoría de las modificaciones son reversibles. La fosforilación y la desfosforilación son las

Figura 10.16 Isoenzimas de la lactato deshidrogenasa. (A) El perfil del isozima de LDH de corazón de rata cambia durante el desarrollo. El isozima H se representa por cuadrados y el M por círculos. Los números negativos y positivos representan, respectivamente, los días anteriores y después del nacimiento. (B) El contenido de LDH varía en los diversos tejidos. [(A) Tomado de W.-H. Li, *Molecular Evolution* (Sinauer, 1977), p. 283; (B) tomado de K. Urich, *Comparative Animal Biochemistry* (Springer Verlag, 1990), p. 542.]

TABLA 10.1 Modificaciones covalentes comunes de la actividad de proteínas

Modificación	Molécula dadora	Ejemplo de proteína modificada	Función de la proteína
Fosforilación	ATP	Glucógeno fosforilasa	Regulación de la glucosa; transducción de energía
Acetilación	Acetil-CoA	Histonas	Empaquetado del DNA; transcripción
Miristilación	Miristil-CoA	Src	Transducción de señales
ADP-ribosilación	NAD	RNA polimerasa	Transcripción
Farnesilación	Farnesilpirofosfato	Ras	Transducción de señales
γ -Carboxilación	HCO_3^-	Trombina	Coagulación de la sangre
Sulfatación	3'-Fosfoadenosina-5'-fosfatosulfato	Fibrinógeno	Formación del coágulo sanguíneo
Ubiquitinación	Ubiquitina	Ciclina	Control del ciclo celular



más habituales, pero no son las únicas modificaciones covalentes. La unión de grupos acetilo y su eliminación constituye otro ejemplo frecuente. Las histonas, proteínas que se empaquetan con el DNA en los cromosomas, se acetilan y desacetilan *in vivo* con suma rapidez (Sección 31.3). Las histonas más densamente acetiladas están asociadas a los genes que se transcriben más activamente. Los enzimas que catalizan las acetilaciones (acetiltransferasas) y desacetilaciones (desacilasas) están sometidos a regulación por fosforilación, demostrando que la modificación covalente de una proteína puede controlarse por medio de modificación covalente de los enzimas que a su vez la modifican.

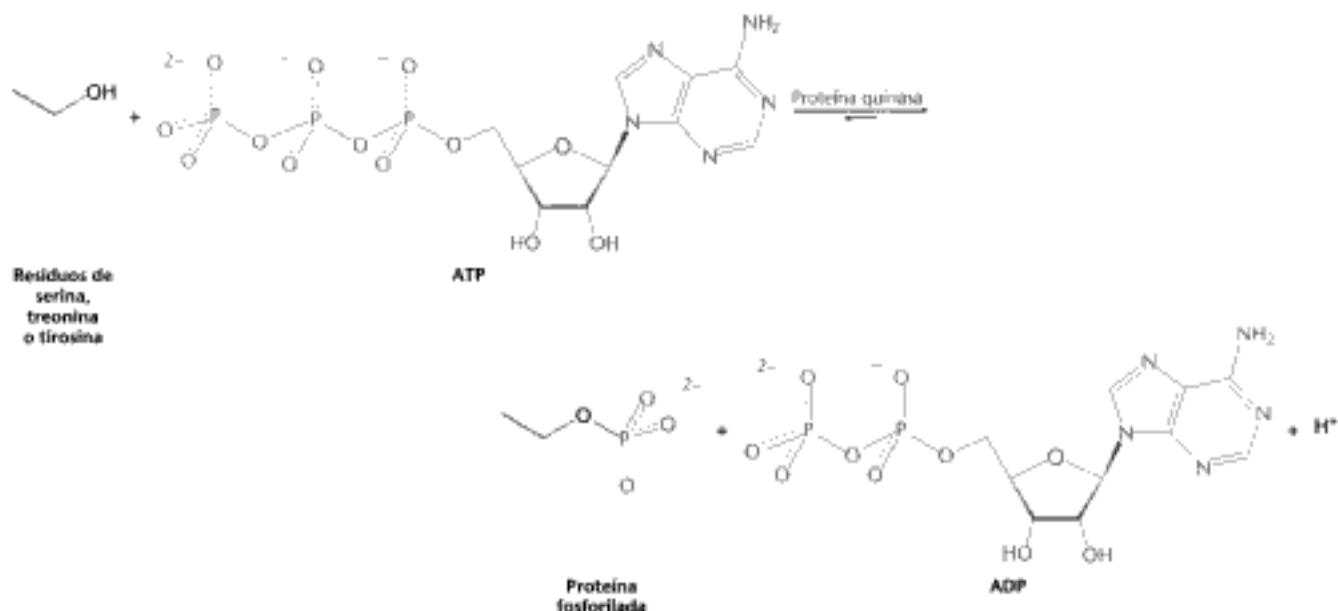
En ocasiones, la modificación covalente no resulta fácilmente reversible. Algunas proteínas implicadas en las vías de transducción de señales, tales como Ras (una GTPasa) y Src (una proteína quinasa) se unen en la cara de la membrana plasmática que da al citoplasma, gracias a la unión irreversible de un grupo lipídico. Una vez fijadas en esta localización, las proteínas tienen más capacidad para recibir y transmitir la información que circula a lo largo de las vías de señalización (Capítulo 14). Las mutaciones tanto de Ras como de Src son habituales en muchos tipos de cáncer. La unión de una proteína pequeña, la ubiquitina, es la señal de que una proteína va a ser destruida, la etapa última de su regulación (Capítulo 23). La proteína ciclina debe unirse a la ubiquitina (esto es, ubiquitinarse) y ser destruida antes de que la célula entre en anafase y continúe el ciclo celular.

Prácticamente todos los procesos metabólicos que vamos a estudiar están regulados, en parte, por modificaciones covalentes. De hecho, las propiedades alostéricas de muchos enzimas se modifican por reacciones covalentes. En la Tabla 10.1 se recogen algunas de las modificaciones covalentes más comunes.

La fosforilación es un medio muy eficaz para regular las actividades de proteínas diana

Vamos a ver ahora que la fosforilación se emplea como un mecanismo de regulación en prácticamente todos los procesos metabólicos de las células eucarióticas. De hecho, el 30% de las proteínas eucarióticas están fosforiladas. Los enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación se llaman *proteína quinasas* y constituyen una de las mayores familias conocidas, con más de 100 enzimas homólogos en levaduras y más de 550 en seres humanos. Esta multiplicidad enzimática permite que la regulación se ajuste finamente según el tejido, el tiempo o el sustrato específicos.

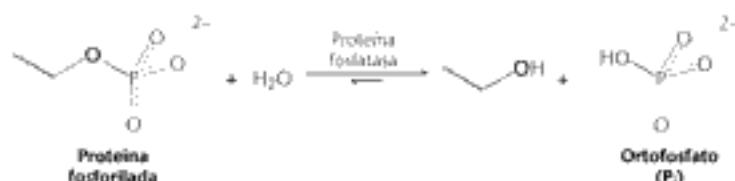
El ATP es el dador de grupos fosforilo más universal. Su grupo fosforilo terminal (denominado γ) se transfiere a un aminoácido específico, que en eucariotas, siempre es uno de los tres que contiene un grupo hidroxilo en su cadena lateral. La transferencia a residuos de *serina* y *treonina* la cataliza una clase de proteína quinasas, mientras que a residuos de *tirosina* lo hace otra clase. Las tirosina quinasas, que son exclusivas de los organismos pluricelulares, desempeñan un papel central en la re-



gulación del crecimiento, y las mutaciones de estos enzimas son habituales en células tumorales.

La Tabla 10.2 recoge algunas de las proteína quinasas conocidas. En las reacciones de fosforilación de proteínas, los aceptores están localizados en el interior celular donde abunda el ATP, el dador de fosforilos. Las proteínas enteramente extracelulares no se regulan por fosforilación reversible.

Las *proteína fosfatases* invierten los efectos de las quinasas, al catalizar la eliminación hidrolítica de los grupos fosforilo unidos a proteínas.

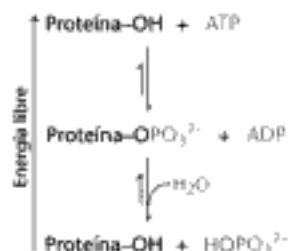


De este modo, se regenera la cadena lateral sin modificar que contiene el grupo hidroxilo, a la vez que se libera ortofosfato (P_i). Estos enzimas desempeñan un papel clave en las células porque desconectan las vías de señalización activadas por las quinasas. Una clase muy conservada de fosfatasa, la denominada PP2A, suprime la actividad promotora de cáncer de algunas quinasas.

TABLA 10.2 Ejemplos de serina y treonina quinasas y sus señales de activación

Señal	Enzima
Nucleótidos cíclicos	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico Proteína quinasa dependiente de GMP cíclico
Ca^{2+} y calmodulina	Ca^{2+} -calmodulina proteína quinasa
AMP	Fosforilasa quinasa o glucógeno sintasa
Diacilglicerol	Quinasa activada por AMP
Intermediarios metabólicos y otros efectores "locales"	Proteína quinasa C Muchos enzimas específicos de diana, tales como la quinasa de la piruvato deshidrogenasa y la quinasa de la cetoácido deshidrogenasa de cadenas ramificadas

Tomado de D. Fell, *Understanding the Control of Metabolism* (Portland Press, 1997), Table 7.2.



Es importante resaltar aquí que la fosforilación y la desfosforilación no son procesos inversos uno del otro, como pudiera parecer; ya que en condiciones fisiológicas cada uno de ellos es prácticamente irreversible. Además, ambas reacciones, tendrían lugar a velocidades inapreciables en ausencia de enzimas apropiados. Por consiguiente, la fosforilación de un sustrato proteico solamente se consigue por acción de una proteína quinasa específica y a expensas de la escisión de ATP; en cambio, la desfosforilación se consigue por acción de una fosfatasa. El resultado final es que una proteína diana alterna unidireccionalmente entre sus formas fosforilada y desfosforilada. La velocidad de alternancia entre los estados fosforilado y desfosforilado depende de las actividades relativas de las quinasas y fosfatases.

La fosforilación es un modo muy eficaz de controlar la actividad de las proteínas por diferentes razones, entre las que destacan las siguientes:

1. Un grupo fosforilo añade dos cargas negativas a la proteína que modifica. La presencia de estas cargas en la proteína receptora permite romper interacciones electrostáticas anteriores y establecer otras nuevas. Tales cambios estructurales pueden alterar de forma notable la unión del sustrato y la actividad catalítica.
2. El grupo fosforilo puede establecer tres o más enlaces por puentes de hidrógeno. La geometría tetraédrica del fosforilo hace que estos enlaces estén muy orientados, facilitando interacciones específicas con dadores de hidrógenos-puente.
3. La energía libre de la fosforilación es grande. De los -50 kJ mol^{-1} ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$) aportados por el ATP, alrededor de la mitad se utilizan para hacer irreversible la fosforilación; la otra mitad se conserva en la proteína fosforilada. Recordemos que un cambio de energía libre de $5,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) repercute en un factor de 10 veces en la constante de equilibrio (p. 210). Por consiguiente, la fosforilación puede alterar el equilibrio conformacional entre los diferentes estados funcionales de la proteína por un factor muy grande, del orden de 10^4 .
4. La fosforilación y la desfosforilación pueden tener lugar en menos de un segundo o en varias horas. Por esta razón, la cinética puede ajustarse para sincronizarse según se necesite en cada proceso fisiológico.
5. A menudo, la fosforilación desencadena efectos *enormemente amplificados*. Una sola quinasa activada puede fosforilar centenares de proteínas diana en un breve intervalo de tiempo. Si estas proteínas diana, a su vez, son enzimas, puede tener lugar una amplificación ulterior, porque cada una de ellas puede transformar un gran número de moléculas de sustrato.
6. El ATP es la divisa celular de la energía (Capítulo 15). El uso de este compuesto como dador de fosforilos, conecta el estado energético celular con la regulación del metabolismo.

Las proteína quinasas difieren en sus grados de especificidad. Así, las *proteína quinasas especializadas* fosforilan una única proteína o unas pocas muy emparentadas. Por el contrario, las *proteína quinasas multifuncionales* modifican diversas dianas; tienen un gran campo de actuación y pueden coordinar procesos muy diversos. La comparación de las secuencias aminoácidas de muchos centros de fosforilación demuestran que una quinasa multifuncional reconoce una serie de secuencias emparentadas. Así, por ejemplo, la *secuencia consenso* de la proteína quinasa A es Arg-Arg-X-Ser-Z, o bien, Arg-Arg-X-Thr-Z, en las que X es un residuo pequeño, Z es uno grande e hidrofóbico y Ser o Thr es el punto en que se realiza la fosforilación. Debería advertirse que no se requiere esta secuencia de un modo invariable. Por ejemplo, una de las argininas puede sustituirse por lisina, pero entonces se pierde algo de afinidad. Los péptidos cortos que contienen una secuencia consenso casi siempre son fosforilados por proteína quinasas de serina o treonina. Así pues, el *principal determinante de la especificidad es la secuencia de aminoácidos que flanquea a la serina o a la treonina del punto de fosforilación*. No obstante, algunos residuos alejados

también contribuyen a la especificidad. Por ejemplo, los cambios de conformación de la proteína pueden alterar la accesibilidad a un posible centro de fosforilación.

El AMP cíclico activa la proteína quinasa A mediante la alteración de su estructura cuaternaria

Ante una situación de excitación o peligro, la respuesta "huye o pelea" es muy frecuente en el mundo animal. En ese mismo instante, los músculos se preparan para la acción. Esta inmediata puesta a punto es el resultado de la actividad de una proteína quinasa especial. En este caso, la hormona adrenalina desencadena la formación de AMP cíclico (cAMP), un mensajero intracelular que se origina al ciclarse el ATP. Más tarde, el AMP cíclico activa a un enzima clave, la *proteína quinasa A* (PKA). Esta quinasa altera las actividades de proteínas diana al fosforilarles residuos específicos de serina o treonina. El hallazgo más sorprendente es que *la mayoría de los efectos del cAMP en células eucarióticas se produce a través de la activación de la PKA por el cAMP*.

Tal como veremos, la PKA es una clara muestra de la integración existente entre regulación alostérica y fosforilación. La PKA se activa a concentraciones de cAMP del orden de 10 nM. El mecanismo de activación recuerda al de la aspartato transcarbamila. Al igual que aquel enzima, la PKA muscular consta de dos clases de subunidades: una subunidad reguladora (R) de 49 kd y una subunidad catalítica (C) de 38 kd. En ausencia de cAMP, las subunidades reguladora y catalítica forman un complejo R_2C_2 que es catalíticamente inactivo (Figura 10.17). La unión de dos moléculas de cAMP a cada una de las subunidades reguladoras provoca la disociación de R_2C_2 en una subunidad R₂ y dos subunidades C. Las subunidades catalíticas, ahora libres, ya son catalíticamente activas. Por consiguiente, *la unión de cAMP a la subunidad reguladora desinhibe a la subunidad catalítica*. La PKA, así como la mayoría de quinasas, presenta formas isozímicas para realizar una regulación precisa que permita satisfacer las necesidades de una célula o una etapa del desarrollo determinadas.

¿Cómo la unión del cAMP activa la quinasa? Cada cadena R contiene la secuencia Arg-Arg-Gly-Ala-Ile, que coincide con la secuencia consenso para la fosforilación, exceptuando la presencia de alanina en vez de serina. En el complejo R_2C_2 , la secuencia pseudosustrato de R ocupa el centro catalítico de C, evitando así la entrada de los verdaderos sustratos proteicos (ver la Figura 10.17). La unión del cAMP a las cadenas R desplaza alostéricamente las secuencias pseudosustrato fuera de los centros catalíticos. Las cadenas C liberadas están, entonces, ya disponibles para unirse a las proteínas sustrato y fosforilarlas.

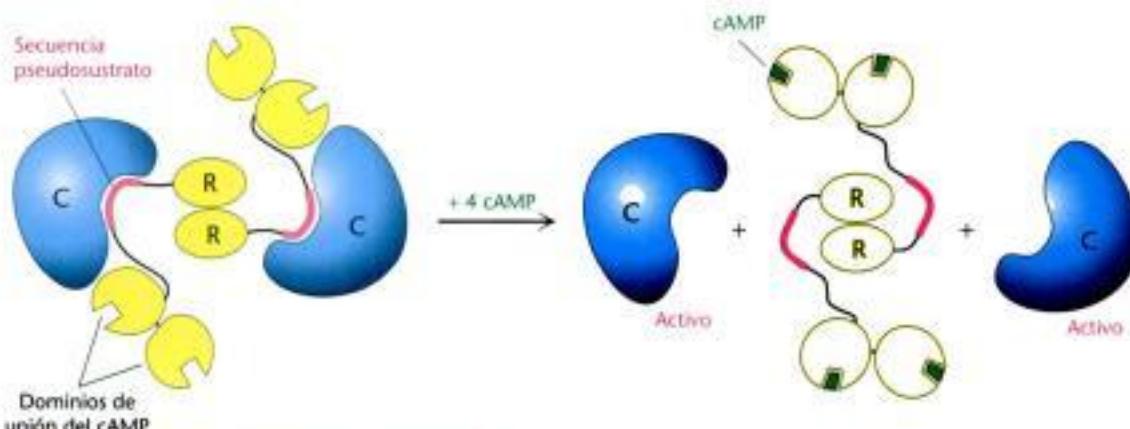
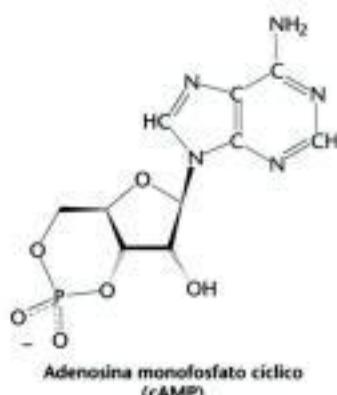


Figura 10.17 Regulación de la proteína quinasa A. La unión de cuatro moléculas de cAMP activa la proteína quinasa A porque disocia al holoenzima inhibido (R_2C_2) en una subunidad reguladora (R_2) y dos subunidades catalíticamente activas (C). Cada cadena R incluye dominios para unirse el cAMP y una secuencia pseudosustrato.

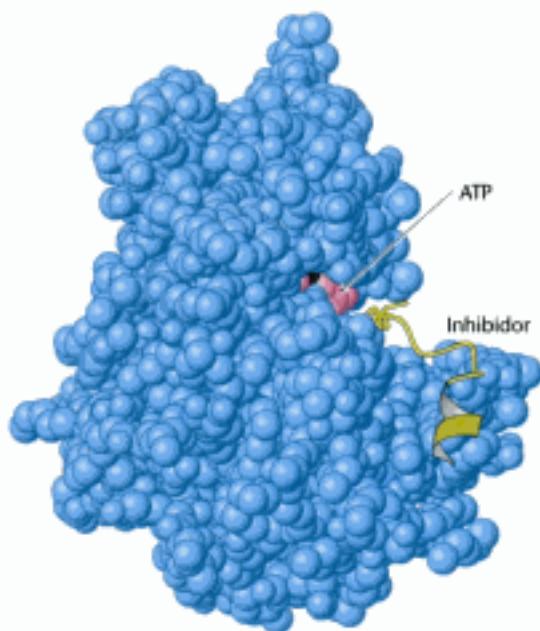


Figura 10.18 La proteína quinasa A unida a un inhibidor. Este modelo tridimensional muestra el complejo formado por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A y un inhibidor que contiene una secuencia pseudosustrato. Obsérvese que el inhibidor (en amarillo) se une a una hendidura situada entre los dominios del enzima. El ATP unido (en rojo) está en el centro activo adyacente al inhibidor. [Tomado de 1ATP.pdb]

El ATP y la proteína diana se unen a una profunda hendidura de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A

 La cristalografía de rayos X permitió determinar la estructura tridimensional de un complejo entre la subunidad catalítica de la PKA con un péptido inhibidor de 20 residuos de aminoácidos. La subunidad catalítica, formada por 350 residuos, consta de dos lóbulos (Figura 10.18). El ATP y una parte del inhibidor llenan la profunda hendidura que existe entre los lóbulos. El lóbulo menor establece varios contactos con el ATP-Mg²⁺, mientras que el mayor se une al péptido y aporta los residuos esenciales para la catálisis. Como ocurre en otras quinasas (p. 269), al unirse el sustrato los dos lóbulos se aproximan entre sí; los mecanismos que restringen este cierre de los dominios aportan una forma de regular la actividad de la proteína quinasa. *La estructura de la PKA tiene un amplio significado porque los residuos comprendidos entre el 40 y el 280 constituyen un núcleo catalítico conservado, que es prácticamente universal en todas las proteínas quinasas conocidas.* Vemos aquí un ejemplo de cómo una solución bioquímica eficaz a un problema (en este caso la fosforilación de proteínas) se utiliza muchas veces a largo de la evolución.

En el cristal, el péptido unido ocupa el centro activo porque contiene la secuencia pseudosustrato Arg-Arg-Asn-Ala-Ile (Figura 10.19). La estructura del complejo revela las interacciones por las que el enzima reconoce la secuencia consenso. El grupo guanidino del primer residuo de arginina forma un par iónico con el carboxilato de la cadena lateral de un residuo de glutamato (el Glu 127) del enzima. Igualmente, la segunda arginina interacciona con otros dos grupos carboxilato. El extremo apolar de la cadena lateral de isoleucina, que corresponde a la posición Z de la secuencia consenso (p. 285), encaja cómodamente en el surco también hidrofóbico que forman dos residuos de leucina del enzima.

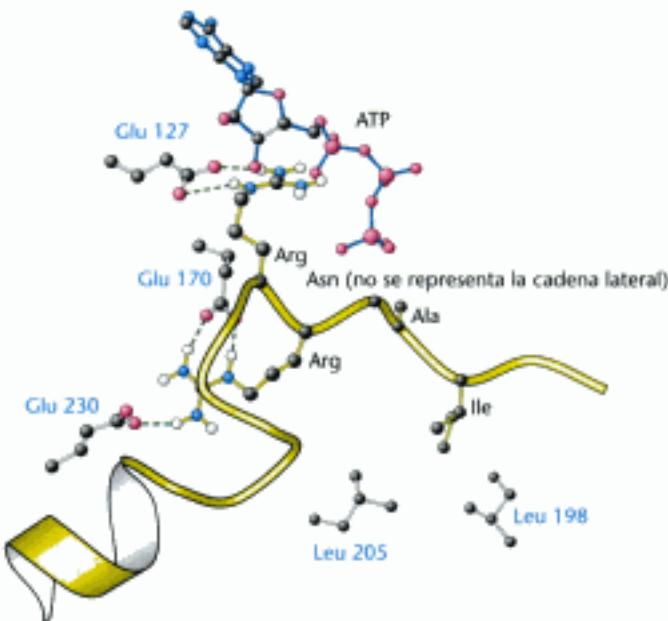


Figura 10.19 Unión de un pseudosustrato a la proteína quinasa A. Obsérvese que el inhibidor contacta con el enzima en varios sitios. Las cadenas laterales de dos argininas del pseudosustrato forman puentes salinos con tres grupos carboxilato de sendos glutamatos. En el reconocimiento del sustrato también son importantes las interacciones hidrofóbicas. El residuo de isoleucina del pseudosustrato está en contacto con un par de leucinas del enzima.

10.4 Muchos enzimas se activan por escisiones proteolíticas específicas

Veamos ahora un mecanismo diferente de regulación enzimática. Muchos enzimas adquieren su plena actividad enzimática cuando se pliegan espontáneamente en sus formas tridimensionales específicas. Por el contrario, las formas plegadas de otros

TABLA 10.3 Zimógenos gástricos y pancreáticos

Lugar de la síntesis	Zimógeno	Enzima activo
Estómago	Pepsinógeno	Pepsina
Páncreas	Quimotripsinógeno	Quimotripsina
Páncreas	Tripsinógeno	Tripsina
Páncreas	Procarboxipeptidasa	Carboxipeptidasa
Páncreas	Proelastasa	Elastasa

enzimas permanecen inactivas hasta que se activan por escisión de uno o varios enlaces peptídicos específicos. El precursor inactivo se llama *zimógeno* o *proenzima*. Para que se produzca la escisión no se necesita una fuente de energía, como el ATP. Por consiguiente, a diferencia de la regulación reversible por fosforilación, por este mecanismo pueden activarse incluso los enzimas situados fuera de la célula. Otra diferencia notable es que la activación proteolítica, en contraste con el control alostérico y la modificación covalente reversible, sólo tiene lugar una vez en la vida de la molécula enzimática.

La proteólisis específica es una forma corriente de activar enzimas y otras proteínas en los seres vivos. Como ejemplo, podemos mencionar:

1. Los enzimas digestivos que hidrolizan proteínas se sintetizan como zimógenos en el estómago o en el páncreas (Tabla 10.3).
2. La coagulación sanguínea está mediada por una cascada de activaciones proteolíticas que aseguran una respuesta rápida y amplificada a la lesión.
3. Algunas hormonas proteicas se sintetizan como precursores inactivos. Así, por ejemplo, la *insulina* se deriva de la *proinsulina* mediante la separación proteolítica de un péptido.
4. La proteína fibrosa *colágeno*, el principal componente de la piel y de los huesos, procede del *procollágeno*, un precursor soluble.
5. Muchos procesos del desarrollo están controlados por la activación de zimógenos. Por ejemplo, en la metamorfosis de renacuajo a rana, se reabsorben grandes cantidades de colágeno de la cola del renacuajo en el transcurso de unos pocos días. Igualmente, en los mamíferos se degrada mucho colágeno uterino después del parto. La conversión de *procollagenasa* en *collagenasa*, la proteasa activa, se sincroniza con precisión durante estos procesos de remodelado.
6. La muerte celular programada o *apoptosis* está mediada por unos enzimas proteolíticos llamados *caspasas*, que se sintetizan en forma de precursores, las *procaspasas*. Cuando las caspasas actúan, después activarse por varias señales, provocan la muerte celular en la mayoría de organismos, desde *C. elegans* hasta el ser humano. La apoptosis aporta un mecanismo para decidir la morfología de las distintas partes del cuerpo durante el desarrollo y también es una manera de eliminar células dañadas o infectadas.

Ahora vamos a estudiar la activación y el control de zimógenos, utilizando como ejemplos varios enzimas digestivos y la coagulación sanguínea.

El quimotripsinógeno se activa por la escisión específica de un solo enlace peptídico

La *quimotripsina* es un enzima digestivo que hidroliza proteínas en el intestino delgado. En el Capítulo 9, ya se estudió con detalle su mecanismo de acción. Su precursor inactivo, el *quimotripsinógeno*, se sintetiza en el páncreas, al igual que otros zimógenos y enzimas digestivos. De hecho, el páncreas es uno de los órganos más activos en la síntesis y secreción de proteínas. Los enzimas y zimógenos se sintetizan en las células acinares del páncreas y se almacenan en gránulos rodeados de membrana (Figura 10.20). Los gránulos de zimógeno se acumulan en el ápice de las células acinares; cuando estas células se estimulan por una señal hormonal o un impulso nervioso, se libera el contenido de esos gránulos a un conducto que lo lleva al duodeno.

10.4 Activación por ruptura proteolítica

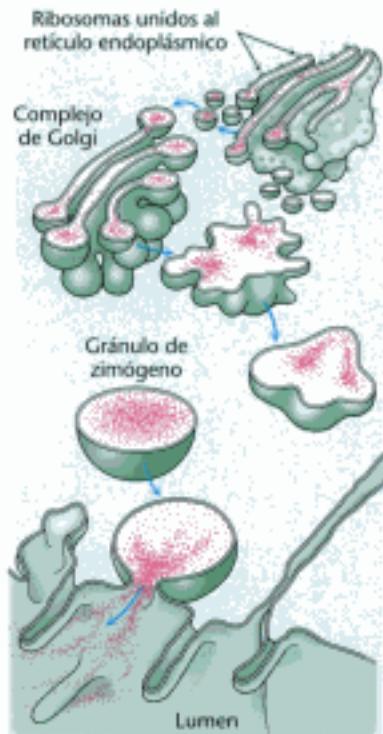


Figura 10.20 Secrección de zimógenos por una célula acinar del páncreas.

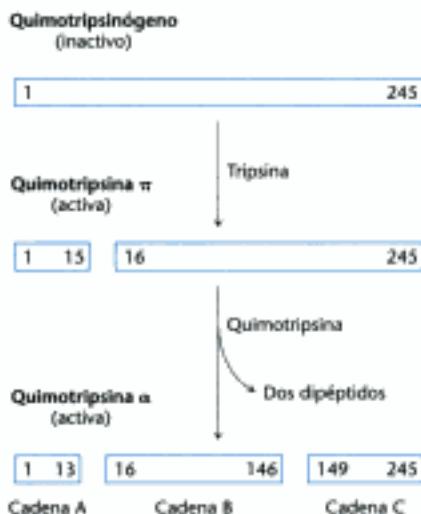


Figura 10.21 Activación proteolítica del quimotripsinógeno. Las tres cadenas de la quimotripsina α están unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios (A con B y B con C).

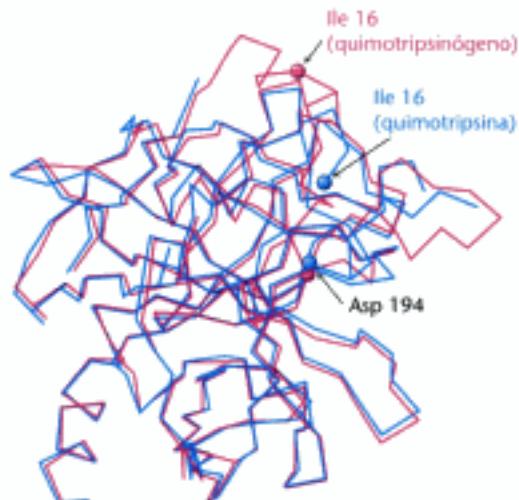
El quimotripsinógeno, formado por una única cadena polipeptídica de 245 residuos de aminoácidos, está prácticamente desprovisto de actividad enzimática. Cuando la tripsina corta el enlace peptídico que une la arginina 15 con la isoleucina 16, el zimógeno se convierte en un enzima completamente activo (Figura 10.21). El enzima resultante, llamado ahora quimotripsina π , actúa después sobre otras moléculas de quimotripsina π , separando dos dipéptidos y originando quimotripsina α , que es la forma estable del enzima. Las tres cadenas resultantes que componen la quimotripsina α permanecen unidas entre sí por dos puentes disulfuro intercatenarios. El aspecto más llamativo de este proceso de activación es que *la escisión de un único enlace peptídico específico convierte a la proteína desde una forma catalíticamente inactiva a otra plenamente activa*.

La activación proteolítica del quimotripsinógeno da lugar a la formación de un centro para unir sustrato

¿Cómo puede activar al zimógeno la escisión de un enlace peptídico? La escisión del enlace peptídico entre los aminoácidos 15 y 16 desencadena cambios conformacionales cruciales, que se pusieron de manifiesto al averiguar la estructura tridimensional del quimotripsinógeno.

1. El grupo amino terminal recién formado de la isoleucina 16 gira hacia el interior y forma un enlace iónico con el aspartato 194 del interior de la molécula de quimotripsina (Figura 10.22).

 **Figura 10.22 Conformaciones del quimotripsinógeno (en rojo) y de la quimotripsina (en azul).** Nótese el cambio de posición de la isoleucina 16 en la quimotripsina. La interacción electrostática entre el grupo α -amino de la isoleucina 16 y el carboxilato del aspartato 194, que es esencial para la estructura de la quimotripsina activa, sólo es posible en la molécula escindida. [Tomado de 1GC.pdb y 2GCA.pdb.]



2. Esta interacción electrostática desencadena diversos cambios conformacionales. La metionina 192 se desplaza desde una posición profundamente encajada en el interior del zimógeno hasta la superficie del enzima activo, y los residuos 187 y 193 aparecen más extendidos. Estos cambios dan como resultado la formación de un *centro de unión específico para sustratos* con grupos aromáticos y apolares voluminosos. Uno de los lados de este centro está formado por los residuos desde el 189 hasta el 192. *Esta capacidad para unirse a una parte del sustrato no está plenamente formada en el zimógeno.*
3. El estado de transición tetraédrico durante la catálisis por quimotripsina se estabiliza mediante puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno carbonílico cargados negativamente del sustrato con dos grupos NH de la cadena principal del enzima (p. 247). Uno de estos grupos NH no está ubicado adecuadamente en el quimotripsinógeno, de modo que *en el zimógeno está incompleto el hueco para el oxianión*.
4. Los cambios conformacionales en el resto de la molécula son insignificantes. Así pues, *la puesta en marcha de la actividad enzimática de una proteína puede lograrse por cambios conformacionales discretos y localizados, desencadenados por hidrólisis de un solo enlace peptídico*.

La generación de tripsina a partir de tripsinógeno conduce a la activación de otros zimógenos

Los cambios estructurales que acompañan la activación del *tripsinógeno*, el precursor del enzima proteolítico tripsina, son algo diferentes de los que conducían a la activación del quimotripsinógeno. Los análisis con rayos X han mostrado que en la activación se altera profundamente la conformación de cuatro hebras polipeptídicas, que constituyen alrededor del 15% de la molécula. *Estas regiones, conocidas como el dominio de activación, son muy flexibles en el zimógeno, mientras que tienen una conformación muy bien definida en la tripsina.* Además, el hueco para el oxianión en el tripsinógeno (p. 247) queda demasiado lejos de la histidina 57 como para facilitar la formación del estado de transición tetraédrico.

La digestión de proteínas en el duodeno requiere la acción concertada de varios enzimas proteolíticos, debido a que cada uno de ellos sólo es específico para un número limitado de cadenas laterales de aminoácidos. Así pues, deben activarse a la vez varios zimógenos. El control coordinado se consigue por acción de la *tripsina como el activador común de todos los zimógenos pancreáticos*: el tripsinógeno, el quimotripsinógeno, la proelastasa, la procarboxipeptidasa y la prolipasa, un enzima que degrada lípidos. Para producir tripsina activa, las células que revisten el duodeno secretan un enzima, la *enteropeptidasa*, que hidroliza un único enlace peptídico lisina-isoleucina del tripsinógeno, al tiempo que este zimógeno entra en el duodeno procedente del páncreas. La pequeña cantidad de tripsina producida de este modo, activa a más tripsinógeno y a los demás zimógenos (Figura 10.23). Así pues, *la formación de tripsina por acción de la enteropeptidasa es la etapa decisiva de esta activación.*

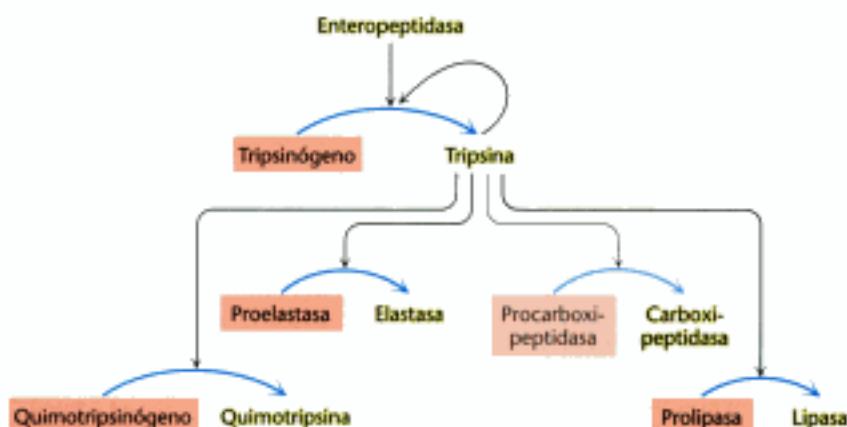


Figura 10.23 Activación de zimógenos mediante escisiones proteolíticas. La enteropeptidasa inicia la activación de los zimógenos pancreáticos activando la tripsina, la cual activa después a los demás zimógenos. Los enzimas activos se representan en amarillo; los zimógenos en anaranjado.

Algunos enzimas proteolíticos tienen inhibidores específicos

La conversión de un zimógeno en una proteasa activa por escisión de un solo enlace peptídico es una forma precisa de poner en marcha la actividad enzimática. Sin embargo, esta etapa de activación es irreversible, de modo que se requiere un mecanismo diferente para detener la proteólisis. Esta labor la realizan inhibidores específicos de proteasas. Así, por ejemplo, el *inhibidor de la tripsina pancreática*, una proteína de 6 kd, inhibe la tripsina porque se une con gran firmeza a su centro activo. La constante de disociación del complejo es 0,1 pM, lo que corresponde a una energía libre estándar de enlace de unos -75 kJ mol^{-1} ($-18 \text{ kcal mol}^{-1}$). A diferencia de casi todas las asociaciones de proteínas conocidas, este complejo no se disocia en sus cadenas constituyentes al ser tratado con agentes desnaturalizantes, tales como la urea 8 M o el hidrocloruro de guanidinio 6 M.

La razón de esta excepcional estabilidad del complejo, es que el inhibidor de la tripsina pancreática es un análogo del sustrato muy efectivo. Los análisis de rayos X demuestran que el inhibidor se sitúa en el centro activo del enzima, posicionado

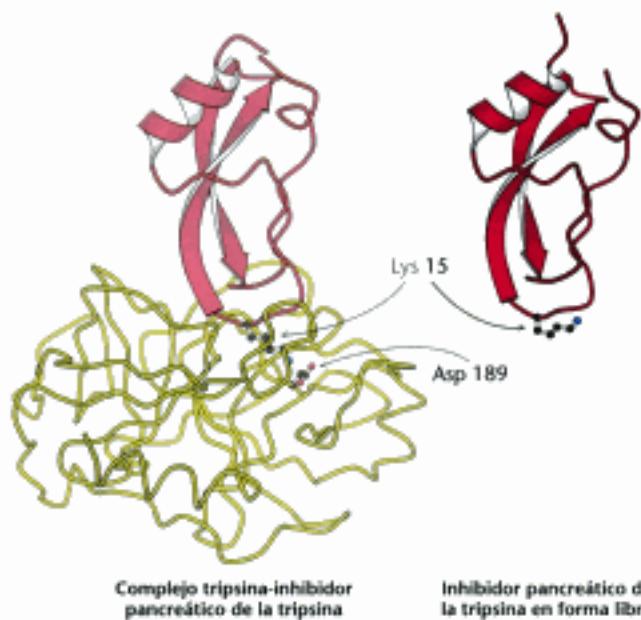


Figura 10.24 Interacción de la tripsina con su inhibidor. Estructura del complejo de la tripsina (en amarillo) y el inhibidor de la tripsina pancreática (en rojo). La lisina 15 del inhibidor penetra en el centro activo del enzima donde forma un puente salino con el aspartato 189 del centro activo. El inhibidor unido al enzima y el inhibidor libre tienen una estructura casi idéntica. [Tomado de 2PTC.pdb.]

de tal forma que la cadena lateral de la lisina 15 del inhibidor interacciona con la cadena lateral del aspartato en la oquedad específica de la tripsina. Además, se establecen muchos puentes de hidrógeno entre la cadena principal de tripsina y su inhibidor. Más aún, el grupo carbonilo de la lisina 15 y los átomos del inhibidor que lo rodean, encajan cómodamente en el centro activo del enzima. La comparación entre la estructura del inhibidor unido al enzima y la del inhibidor libre revela que *su estructura permanece esencialmente inalterada al unirse al enzima* (Figura 10.24). Así pues, el inhibidor está ya organizado en una estructura que es muy complementaria al centro activo del enzima. De hecho, se rompe el enlace peptídico entre la lisina 15 y la alanina 16 del inhibidor de la tripsina pancreática, pero a velocidad muy lenta; la vida media del complejo tripsina-inhibidor es de varios meses. En el fondo, el inhibidor es un sustrato, pero su estructura intrínseca es tan perfectamente complementaria del centro activo del enzima que se une a él con mucha firmeza y sólo se libera con extrema lentitud.

La cantidad de tripsina es mayor que la del inhibidor. ¿Por qué existe un inhibidor de tripsina? Recordemos que la tripsina activa a otros zimógenos. En consecuencia, resulta vital impedir que pequeñas cantidades de tripsina inicien la cascada de activaciones de forma prematura. El inhibidor de tripsina se une a moléculas de tripsina que se han activado inadecuadamente en el páncreas o en los conductos pancreáticos.

Esta inhibición evita que se produzcan graves lesiones en los citados tejidos, lo que conduciría a una pancreatitis aguda.

El inhibidor de tripsina pancreática no es el único inhibidor importante de proteasas. La *antitripsina* α_1 (también denominada *antiproteinasa* α_1), es una proteína plasmática de 53 kd que protege los tejidos de la digestión por elastasa, un producto de secreción de los neutrófilos (leucocitos sanguíneos que fagocitan bacterias). Un nombre más adecuado para este inhibidor sería el de *antielastasa*, porque bloquea a la elastasa con mucha más eficacia que a la tripsina. Al igual que el inhibidor de la tripsina pancreática, la antitripsina α_1 bloquea la unión de sus enzimas diana porque se une a sus centros activos de forma casi irreversible. Las anomalías genéticas que producen una deficiencia en antitripsina α_1 demuestran que este inhibidor es fisiológicamente importante. Así, por ejemplo, la sustitución del glutamato 53 por lisina en el mutante tipo Z, ralentiza la secreción de este inhibidor en los hepatocitos. En los individuos homocigóticos para este defecto, los niveles séricos del inhibidor suelen ser un 15% de los normales. La consecuencia de esto es que el exceso de elastasa destruye las paredes de los alvéolos pulmonares al digerir las fibras elásticas y otras proteínas del tejido conjuntivo.

El resultado clínico de esta enfermedad se llama *enfisema* (también conocida como *enfermedad pulmonar destructiva*). Las personas con enfisema respiran con mucho mayor esfuerzo que los individuos normales para intercambiar el mismo volumen de aire, porque sus alvéolos son mucho menos elásticos que los normales. El hábito de fumar aumenta notablemente la propensión de que desarrollen el enfisema pulmonar incluso los heterocigóticos tipo Z. La explicación es que el humo oxida la metionina 358 del inhibidor (Figura 10.25), un residuo esencial para que se una a la elastasa. De hecho, la cadena lateral de esa metionina es el cebo que atrapa a la elastasa. Por el contrario, la *metionina sulfóxido* que es el producto de la oxidación, no engaña a la elastasa. Este caso constituye un llamativo ejemplo de las consecuencias que provoca la inserción de un solo átomo de oxígeno en una proteína, así como del efecto de algunos hábitos a nivel molecular. Estudiaremos otro inhibidor de proteasas, la antitrombina III, cuando veamos el control de la coagulación sanguínea.

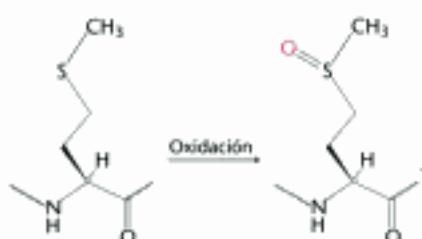


Figura 10.25 Oxidación de la metionina a metionina sulfóxido.

La coagulación sanguínea se consigue mediante una cascada de activaciones de zimógenos

Los seres vivos utilizan frecuentemente *cascadas enzimáticas* para lograr una respuesta rápida. En las cascadas, una señal inicial establece una serie de pasos, cada uno de ellos catalizado por un enzima. En cada paso, la señal se amplifica. Así, por ejemplo, si la señal activa a un enzima que, a su vez, activa a 10 enzimas y cada uno de éstos activa a otros 10, después de cuatro etapas, la señal inicial habrá sido amplificada 10 000 veces. El coágulo sanguíneo se forma mediante una *cascada de activaciones de zimógenos*: la forma activada de un factor de coagulación cataliza la activación del siguiente (Figura 10.26). Así pues, pequeñas cantidades de los factores iniciales bastan para desencadenar la cascada, asegurando así una respuesta rápida a un trauma.

Existen dos formas de iniciarse la coagulación: las vías intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca se activa cuando se exponen superficies aniónicas al romperse el recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos. La vía extrínseca, que parece ser más importante en la coagulación sanguínea, se desencadena cuando un trauma libera el factor tisular (TF), que es una glicoproteína de membrana. Poco después que se libere el factor tisular se generan pequeñas cantidades de *trombina*, la proteasa clave en la coagulación. Más tarde, la trombina activa a enzimas y factores que conducen a la generación de aún más trombina, constituyendo esto un ejemplo de retroalimentación positiva. Al final, las vías intrínseca y extrínseca confluyen en una secuencia de etapas comunes hasta llegar a constituir un coágulo formado por la proteína fibrina (Figura 10.26). Nótese que las formas activas de los factores de coagulación se designan con el subíndice "a".

La trombina convierte el fibrinógeno en un coágulo de fibrina

La parte mejor conocida del proceso de coagulación es la etapa final de la cascada: la conversión de *fibrinógeno* en fibrina por acción de la trombina, un enzima proteolítico. El fibrinógeno está formado por tres unidades globulares conectadas por dos varillas (Figura 10.27). Esta proteína de 340 kd consta de seis cadenas: dos de cada clase, $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ . Las regiones en forma de varilla están constituidas por enrollamientos que constan a su vez de tres hebras plegadas en forma de hélice α , una estructura frecuente en proteínas (p. 45). La trombina escinde cuatro *enlaces peptídicos arginina-glicina* en el centro de la región globular del fibrinógeno para liberar un péptido A (de 18 residuos) de cada una de las dos cadenas $\text{A}\alpha$, y un péptido B (de 20 residuos) de cada una

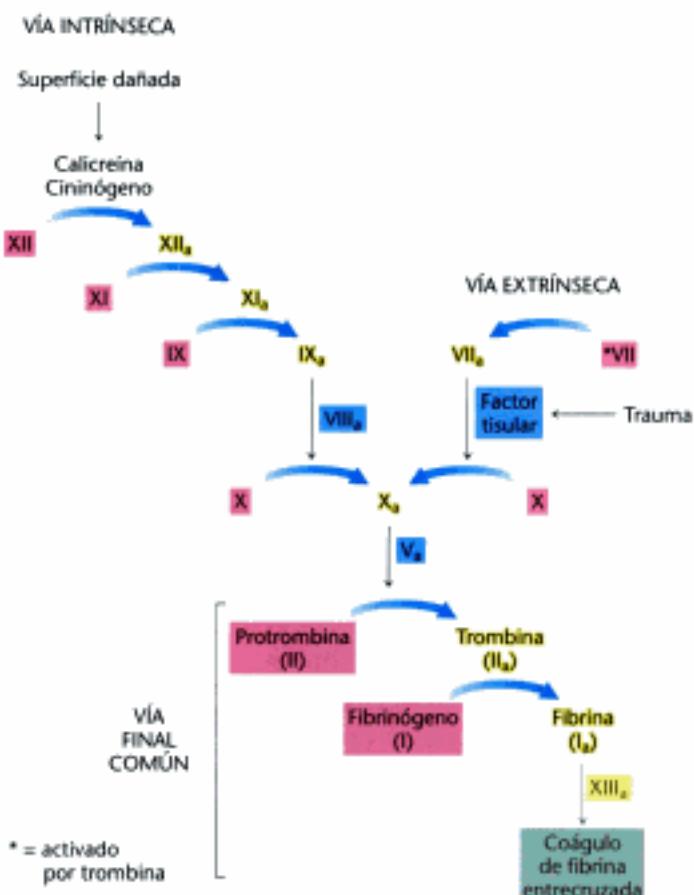


Figura 10.26 Cascada de la coagulación sanguínea. El coágulo de fibrina se forma por la participación de las vías intrínseca, extrínseca y de una final común. La vía intrínseca comienza con la activación del Factor XII (factor de Hageman) por contacto con superficies dañadas por heridas. La vía extrínseca se desencadena por el trauma, que libera un factor tisular (TF). Este TF forma un complejo con el Factor VII, que inicia una cascada para activar a la trombina. Las formas inactivas de los factores de coagulación están ilustradas en rojo, y en amarillo sus correspondientes formas activadas (indicadas con el subíndice "a"). Las proteínas estimuladoras que no son enzimas por sí solas están en cuadros de color azul. Una llamativa propiedad de este proceso es que la forma activada de un factor de coagulación cataliza la activación del siguiente factor.

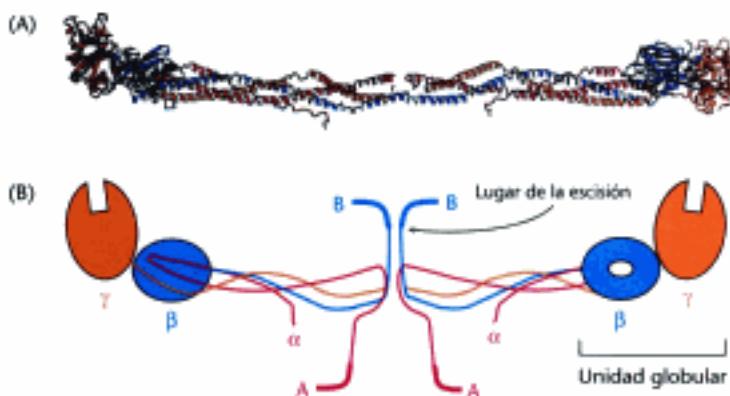


Figura 10.27 Estructura de la molécula de fibrinógeno. (A) Diagrama de cintas. Las dos regiones en varilla son hélices α superenrolladas que están conectadas a una región globular en cada extremo. (B) Representación esquemática mostrando las posiciones de los fibrinopeptídos A y B. [La figura A se ha tomado de 1DEQ.pdb.]

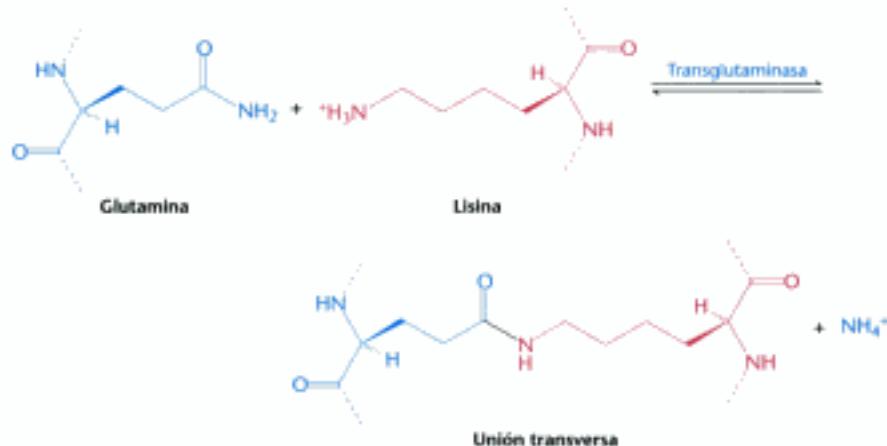


Figura 10.28 Micrografía electrónica de la fibrina. El periodo de 23 nm a lo largo del eje se corresponde con la mitad de una molécula de fibrinógeno. [Cortesía del Dr. Henry Slayter.]

de las dos cadenas $\text{B}\beta$. Estos péptidos A y B se llaman *fibrinopéptidos*. Una molécula de fibrinógeno carente de estos fibrinopéptidos se denomina *monómero de fibrina* y tiene como estructura subunitaria $(\alpha\beta\gamma)_2$.

Los monómeros de fibrina se asocian espontáneamente formando estructuras fibrosas ordenadas, llamadas *fibrina*. Las micrografías electrónicas y las imágenes de difracción de rayos X de bajo ángulo muestran que la fibrina posee una estructura periódica que se repite cada 23 nm (Figura 10.28). Las imágenes a mayor resolución revelan que la eliminación de los fibrinopéptidos permite a los

monómeros de fibrina juntarse para formar fibrina. Las cadenas homólogas β y γ tienen dominios globulares en sus extremos carboxílicos (Figura 10.29). Estos dominios presentan "huecos" enlazantes que interaccionan con los péptidos. El dominio β es específico para secuencias del tipo $\text{H}_3\text{N}^+ \text{-Gly-His-Arg-}$, mientras que el dominio γ se une a $\text{H}_3\text{N}^+ \text{-Gly-Pro-Arg-}$. Cuando actúa la trombina, estas secuencias (a veces llamadas "botones") aparecen situadas exactamente en los extremos amino terminales de las cadenas β y γ , respectivamente. Los botones de las subunidades α se acoplan en los huecos de las subunidades γ y de otro monómero para formar una protofibrilla. Esta protofibrilla se extiende cuando los botones de las subunidades β encajan en los huecos de las subunidades β de otras protofibrillas. Así pues, de modo análogo a la activación del quimotripsinógeno, la escisión de un enlace peptídico deja expuesto un nuevo grupo amino terminal que puede participar en interacciones específicas. El coágulo recién formado se estabiliza estableciendo enlaces amida entre las cadenas laterales de residuos de lisina y glutamina de monómeros diferentes.



La reacción de entrecruzamiento está catalizada por la *transglutaminasa (factor XIIIa)*, que a su vez se activa a partir de una protransglutaminasa por acción de la trombina.

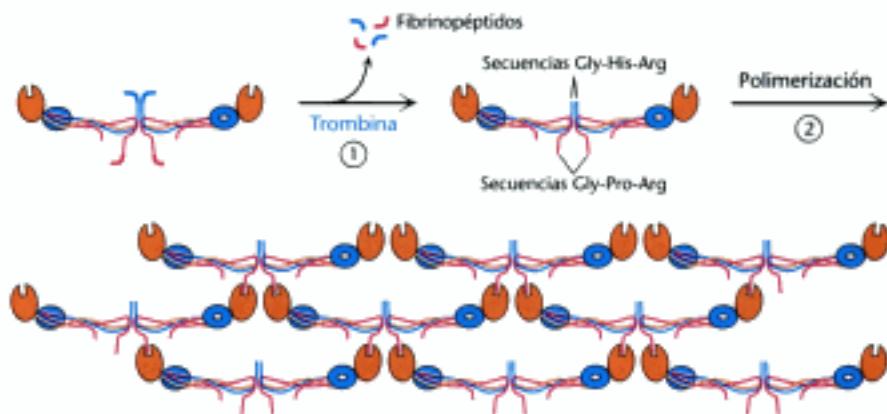


Figura 10.29 Formación del coágulo de fibrina. (1) La trombina corta los fibrinopéptidos A y B del glóbulo central del fibrinógeno. (2) Los dominios globulares de los extremos carboxílicos de las cadenas β y γ interaccionan con los "botones" expuestos en los extremos amino terminales de las cadenas β y γ para formar coágulos.

Una modificación dependiente de vitamina K prepara a la protrombina para su activación

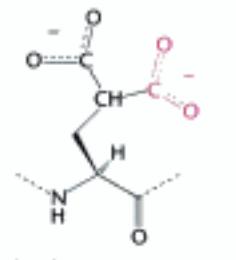
La trombina se sintetiza como un zimógeno, llamado *protrombina*. La molécula inactiva comprende cuatro dominios principales, con el dominio serinoproteasa en su extremo carboxílico. Al primer dominio se le conoce como *dominio gla* (un dominio rico en γ -carboxiglutamato), mientras que al segundo y tercer dominios se les llama *dominios kringle* (así llamados por su parecido con un pastel danés del mismo nombre; Figura 10.30). Estos dominios actúan coordinadamente para mantener la protrombina en su forma inactiva, en la que presenta los sitios apropiados para ser activada por los factores X_a (una serinoproteasa) y V_a (una proteína estimuladora). La activación se inicia por escisión proteolítica del enlace entre la arginina 274 y la treonina 275, liberándose un fragmento que contiene los tres primeros dominios. La posterior escisión del enlace entre la arginina 323 y la isoleucina 324 (análogos al enlace clave del quimotripsinógeno) produce trombina activa.



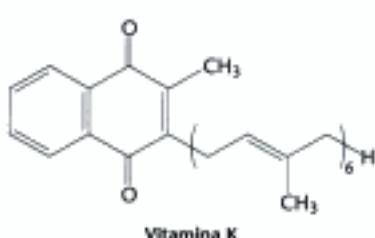
Figura 10.30 Estructura modular de la protrombina. La ruptura de dos enlaces peptídicos origina trombina. Todos los residuos de γ -carboxiglutamato están en el dominio gla.

Se sabe desde hace muchos años que la vitamina K (p. 295 y Figura 10.31) es esencial para la síntesis de protrombina y de otros factores de coagulación. De hecho, se llama vitamina K porque su carencia origina una deficiente coagulación sanguínea (en Escandinavo, *koagulation*). El modo de acción de esta vitamina se ha deducido recientemente por investigaciones realizadas con una protrombina anómala sintetizada en ausencia de vitamina K o en presencia de alguno de sus antagonistas, como el dicumarol. El *dicumarol* se encuentra en el trébol dulce mal conservado y provoca una enfermedad hemorrágica mortal en el ganado alimentado con este forraje. Este derivado de cumarina se utiliza en clínica como *anticoagulante* para prevenir trombosis en enfermos propensos a la formación de coágulos. El dicumarol, así como otros antagonistas de la vitamina K como la *warfarina*, también sirve como un raticida eficaz. Las vacas alimentadas con dicumarol sintetizan una protrombina anómala que no se une al Ca^{2+} , a diferencia de la protrombina normal. Durante algún tiempo, esta diferencia era enigmática porque la protrombina anómala contenía el mismo número de aminoácidos que la protrombina normal y también daba el mismo análisis aminoacídico después de su hidrólisis ácida.

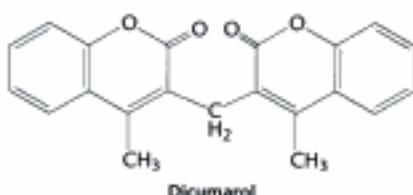
Estudios de resonancia magnética nuclear han revelado que la protrombina normal contiene γ -carboxiglutamato, un aminoácido desconocido hasta entonces que no se detectaba porque su segundo grupo carboxilo se pierde en la hidrólisis ácida. La protrombina anormal que se forma después de la administración de anticoagulantes, carece de este aminoácido modificado. De hecho, los primeros diez residuos de glutamato de la región amino terminal de la protrombina se carboxilan a γ -carboxiglutamato por un sistema enzimático que depende de vitamina K (Figura 10.32). Esta re-



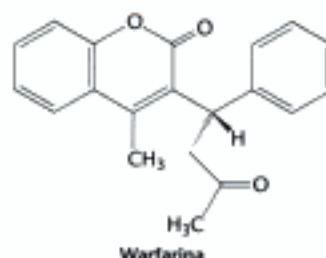
Residuo de γ -carboxiglutamato



Vitamina K



Dicumarol



Warfarina

Figura 10.31 Estructuras de la vitamina K y de dos de sus antagonistas, el dicumarol y la warfarina.

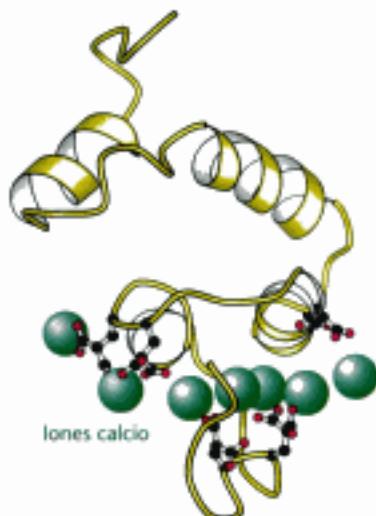


Figura 10.32 La zona de la protrombina que une calcio. La protrombina une iones calcio mediante el γ -carboxiglutamato, un aminoácido modificado (en rojo). [Tomado de 2PF2.pdb.]

Constancia de un rasgo hemorrágico que se da en ciertas familias

"Hace unos setenta u ochenta años, una mujer apellidada Smith se instaló en la vecindad de Plymouth, New Hampshire, y transmitió la siguiente idiosincrasia a sus descendientes. Se trata de una peculiaridad, observó, de la cual por desgracia es su familia víctima y ha sido motivo de gran preocupación y frecuente causa de fallecimientos. Si alguno de ellos sufre el menor rasguño en su piel, sufrirá al final una hemorragia fatal, como si se hubiera hecho la mayor herida... Es una circunstancia sorprendente que sólo los varones sufren esta extraña enfermedad, y que no todos ellos sean propensos a ella... Aunque las hembras estén exentas, todavía pueden transmitirla a sus hijos varones".

JOHN OTTO (1803)

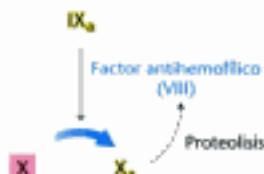
acción de carboxilación dependiente de vitamina K, convierte el glutamato, un quelante débil de Ca^{2+} , en γ -carboxiglutamato, un quelante más potente. La protrombina es, por tanto, capaz de unirse al Ca^{2+} pero, ¿cuál es el efecto de esa unión? La unión de Ca^{2+} a la protrombina ancla el zimógeno a las membranas fosfolípidicas de las plaquetas sanguíneas que acuden después de una herida. La unión de protrombina a la superficie de los fosfolípidos es crítica, porque acerca mucho la protrombina a dos proteínas que catalizan su conversión en trombina. La activación proteolítica de la protrombina elimina el dominio de unión a calcio liberando la trombina de la membrana, de modo que ahora ya puede escindir fibrinógeno y otras proteínas diana.

La hemofilia ha desvelado una de las primeras etapas de la coagulación

Algunos avances importantes en el descubrimiento de las vías de coagulación proceden de los estudios realizados con pacientes con disfunciones hemorrágicas. El síndrome hemorrágico mejor conocido es la *hemofilia clásica* o *hemofilia A*. Este trastorno de la coagulación se transmite genéticamente como un carácter recesivo ligado al sexo. En la hemofilia clásica, el factor VIII (factor antihemofílico) de la vía intrínseca o no está presente o tiene una actividad muy limitada. Aunque el factor VIII, en sí mismo, no es una proteasa, sí es capaz de estimular mucho la activación del factor X, la proteasa final de la vía intrínseca, mediante la acción del factor IX_a, que es una serinproteasa (Figura 10.33). De esta manera, en la hemofilia está gravemente afectada la activación de la vía intrínseca.

Antiguamente, a los hemofílicos se les trataba con transfusiones de una fracción plasmática concentrada que contenía el factor VIII. Esta terapia conllevaba el riesgo de infección. Por esta razón, muchos hemofílicos contraían hepatitis y, más recientemente, SIDA. Así pues, se necesitó disponer con urgencia de una preparación segura de factor VIII. Mediante el uso de técnicas bioquímicas de purificación y de DNA recombinante, se ha conseguido aislar el gen del factor VIII y expresarlo en células desarrolladas en cultivo. El factor VIII recombinante, purificado de esas células, ya ha reemplazado en gran medida a los concentrados de plasma en el tratamiento actual de la hemofilia.

Figura 10.33 Acción del factor antihemofílico. El factor antihemofílico (el factor VIII) estimula la activación del factor X por el IX_a. Es interesante indicar, que la actividad del factor VIII se incrementa notablemente por la proteólisis limitada causada por trombina. Esta retroinhibición positiva amplifica la señal de coagulación y acelera la formación del coágulo, una vez se alcanza el umbral.



El proceso de coagulación debe regularse con precisión

Apenas existe una tenue frontera entre trombosis y hemorragia. La coagulación debe producirse rápidamente y localizarse en la zona de la herida. ¿Cuál es el mecanismo que habitualmente delimita la formación del coágulo a la zona de la herida? La labilidad de los factores de coagulación contribuye de forma importante al control del proceso. Los factores de coagulación activados tienen una breve vida media, debido a que son diluidos por el flujo sanguíneo, eliminados por el hígado y degradados por proteasas. Por ejemplo, las proteínas estimuladoras V_a y VIII_a son digeridas por la proteína C, una proteasa que se activa por acción de la trombina. Así pues, la trombina tiene una función doble: cataliza la formación de fibrina e inicia la desactivación de la cascada de coagulación.

Los inhibidores específicos de los factores de coagulación también son cruciales para terminar la coagulación. Así, por ejemplo, el *inhibidor de la vía del factor tisular* (TFPI) inhibe al complejo TF-VII_a-X_a. Los dominios separados del TFPI inhiben a VII_a y X_a. Otro inhibidor clave es la *antitrombina III*, una proteína plasmática que inactiva a la trombina, al formar un complejo irreversible con ella. La antitrombina III se parece a la antitripsina α_1 , excepto en que inhibe a la trombina con mucha más fuerza que a la elastasa (Figura 10.26). La antitrombina III también bloquea otras se-

rimproteasas de la cascada de coagulación, concretamente los factores XII_a, XI_a, IX_a y X_a. La acción inhibidora de la antitrombina III se estimula por *heparina*, un polisacárido cargado negativamente, que se encuentra en las células cebadas (mastocitos) cerca de las paredes de los vasos sanguíneos y sobre la superficie de las células endoteliales (Figura 10.34). La heparina actúa como un *anticoagulante* porque aumenta la velocidad de formación de complejos irreversibles entre la antitrombina III y los factores de coagulación, que son serinproteasas. La antitripsina y la antitrombina son *serpinas*, una familia de inhibidores de serinproteasas.

 La importancia de la relación trombina/antitrombina queda claramente ilustrada en el caso de un niño de catorce años, que murió de una disfunción hemorrágica, debido a una mutación de su antitripsina α_1 , que habitualmente inhibe a la elastasa. La metionina 358 de la antitripsina α_1 , situada en la cavidad para unir elastasa, estaba sustituida por arginina, lo que originaba un cambio en su especificidad: en vez de inhibir a la elastasa inhibía a la trombina. Habitualmente, la actividad de la antitripsina α_1 se incrementa de forma notable después de producirse una herida para contrarrestar el exceso de elastasa procedente de los neutrófilos que se han estimulado. En aquel paciente, la antitripsina α_1 mutada provocó que la trombina cayese a un nivel tan bajo que se produjo hemorragia. *Aquí tenemos un ejemplo llamativo de cómo el cambio de un solo aminoácido de una proteína puede alterar drásticamente su especificidad, y también es un ejemplo de la enorme importancia que tiene disponer de la cantidad correcta de un inhibidor de proteasas.*

La antitrombina delimita la extensión del coágulo, pero ¿qué ocurre con los coágulos ya formados? Los coágulos no son estructuras permanentes sino que están diseñados para disolverse cuando quede restaurada la integridad estructural de las zonas dañadas. La fibrina es cortada por la *plasmina*, una serinproteasa que hidroliza los enlaces peptídicos en regiones superenrolladas. Las moléculas de plasmina pueden difundir a través de conductos acuosos por el coágulo poroso de fibrina, para cortar las varillas conectoras que le son accesibles. La plasmina se forma por activación proteolítica del *plasminógeno*, un precursor inactivo con elevada afinidad por los coágulos de fibrina. Esta activación se produce por un *activador de plasminógeno de tipo tisular* (TPA, "tissue-type plasminogen activator"), una proteína de 72 kd con una estructura de dominios estrechamente emparentada con la de la protrombina (Figura 10.35).



Figura 10.35 Estructura modular del activador de plasminógeno de tipo tisular (TPA).

Sin embargo, un dominio que dirige el TPA a los coágulos de fibrina reemplaza al dominio gla de la protrombina, que la dirigía hacia la membrana. El TPA unido a esos coágulos activa rápidamente al plasminógeno adherido. Por el contrario, el TPA activa con gran lentitud al plasminógeno libre. El gen para el TPA ha sido clonado y expresado en cultivos de células de mamífero. Resultados de diversos estudios clínicos demuestran que el TPA, administrado por vía intravenosa antes de que pase una hora desde la formación de un coágulo en una arteria coronaria, aumenta notablemente la probabilidad de supervivencia del paciente tras un ataque cardíaco (Figura 10.36).

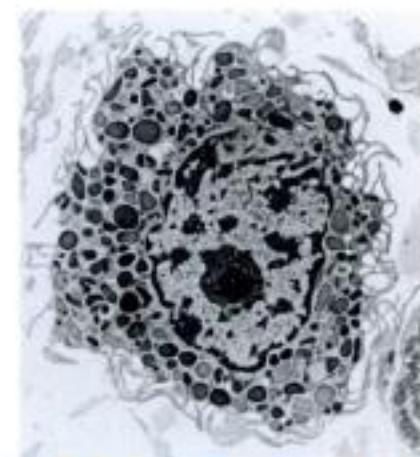
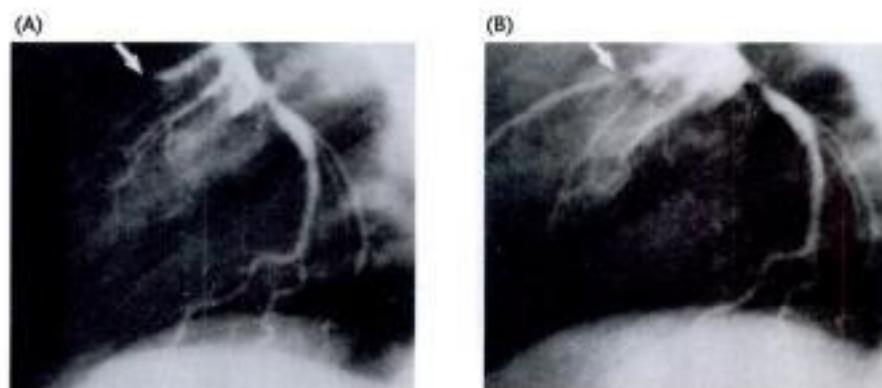


Figura 10.34 Micrografía electrónica de un mastocito. Cuando se provoca la secreción se liberan al espacio extracelular la heparina y demás moléculas de los gránulos densos. [Cortesía de Lynne Mercer.]

Figura 10.36 Efecto del factor activador del plasminógeno de tipo tisular. Como se observa en estas imágenes de rayos X de los vasos sanguíneos del corazón, el TPA provoca la disolución de coágulos sanguíneos (A) antes y (B) 3 horas después de la administración de TPA. En (A) la flecha indica la posición del coágulo. [Según F. Van de Werf, P. A. Ludbrook, S. R. Bergmann, A.J. Tieffenbrunn, K. A. A. Fox, H. De Geest, M. Verstraete, D. Collen y B. E. Sobel. *New Engl. J. Med.* 310(1984):609-613.]

Resumen

10.1 La aspartato transcarbamilasa se inhibe allostéricamente por el producto final de su propia vía

Las proteínas allostéricas constituyen una clase importante de proteínas, cuya actividad biológica puede regularse. Las moléculas reguladoras específicas pueden modular la actividad de las proteínas allostéricas uniéndose a distintos centros reguladores, que están separados de los centros catalíticos. Estas proteínas tienen múltiples centros funcionales, que son capaces de presentar cooperatividad, como lo demuestra la dependencia sigmoidal de su función específica respecto la concentración del sustrato. La aspartato transcarbamilasa (ATCasa), uno de los enzimas allostéricos mejor conocidos, cataliza la síntesis de *N*-carbamilaspártato, el primer intermediario en la síntesis de pirimidinas. La ATCasa está retroinhibida por la citidina trifosfato (CTP), el producto final de la vía. El ATP revierte esta inhibición. La ATCasa consta de subunidades catalíticas (c_3) (a las que se unen los sustratos) y subunidades reguladoras (r_2) (a las que se unen el CTP y el ATP), que se pueden separar unas de otras. Tanto el efecto inhibitorio del CTP como la acción estimuladora del ATP y la unión cooperativa de los sustratos están mediados por importantes cambios en la estructura cuaternaria. Al unirse los sustratos, se separan las subunidades c_3 del enzima c_6r_6 , y se reorientan por sí solas. Esta transición allostérica es muy concertada. Es decir, todas las subunidades de una molécula de ATCasa cambian simultáneamente del estado T (de baja afinidad) al R (de alta afinidad).

10.2 Los isozimas aportan modos específicos de regulación a los diferentes tejidos y en distintas fases del desarrollo

Los isozimas se diferencian en sus características estructurales pero catalizan la misma reacción. Aportan una forma de ajustar el metabolismo con precisión para satisfacer las necesidades de un tejido determinado o de una cierta etapa del desarrollo. Los resultados de la duplicación génica suministran una manera de sutil regulación de la función de los enzimas.

10.3 La modificación covalente es una forma de regular la actividad enzimática

La modificación covalente de proteínas es un medio muy potente de controlar la actividad de enzimas y de otras proteínas. La fosforilación es el tipo más común de modificación covalente reversible. Las señales pueden amplificarse mucho por fosforilación, porque una misma quinasa puede actuar sobre muchas moléculas diana. Las acciones reguladoras de las proteína quinasas se revierten por las proteína fosfatases, que catalizan la hidrólisis de los grupos fosforilo enlazados.

El AMP cíclico actúa como un mensajero intracelular en la transducción de muchos estímulos hormonales y sensoriales. El cAMP actúa sobre la proteína quinasa A (PKA), la quinasa multifuncional más abundante, uniéndose a la subunidad reguladora del enzima y provocando la liberación de las subunidades catalíticas activas de la PKA. En ausencia de cAMP, los centros catalíticos de la PKA están ocupados por secuencias pseudosustrato de la subunidad reguladora.

10.4 Muchos enzimas se activan por escisiones proteolíticas específicas

La activación de un enzima por escisión proteolítica de uno o varios enlaces peptídicos es un mecanismo de control muy frecuente, que se da en procesos tan diversos como la activación de enzimas digestivos o la coagulación sanguínea. Al precursor inactivo se le llama zimógeno (o proenzima). El tripsinógeno se activa por la enteropeptidasa o por la tripsina, y ésta, a su vez, también activa a una serie de diferentes zimógenos, consiguiendo así la digestión de los alimentos. Por ejemplo, la tripsina convierte al quimotripsinógeno, un zimógeno, en quimotripsina activa, mediante la hidrólisis de un solo enlace peptídico.

Un aspecto sorprendente del proceso de coagulación es que se produce a través de una cascada de conversiones de zimógenos, en la cual la forma activa de un factor de coagulación cataliza la activación del siguiente precursor. Muchos de los factores de coagulación activados son serinproteasas. En la etapa final de la formación del coágulo, el fibrinógeno, una molécula plasmática muy soluble, se convierte en fibrina por acción de la trombina, por hidrólisis de cuatro enlaces arginina-glicina. El monómero de fibrina resultante, forma espontáneamente fibras largas e insolubles denominadas fibrina. La activación de zimógenos también es esencial para la lisis de coágulos. El plasminógeno se convierte en plasmina, una serinproteasa que escinde fibrina, por acción de un factor activador del plasminógeno de tipo tisular (TPA). Aunque la activación de zimógenos es irreversible, está regulada por inhibidores específicos de algunas proteasas. El inhibidor irreversible de naturaleza proteica denominado antitrombina III, controla la coagulación sanguínea en la cascada de coagulación.

Términos clave

cooperatividad (p. 275)	efecto heterotrópico (p. 282)	proteína quinasa A (PKA) (p. 287)
retroinhibición (por producto final) (p. 277)	isozima (isoenzima) (p. 283)	secuencia pseudosustrato (p. 287)
centro alostérico (regulador) (p. 277)	modificación covalente (p. 283)	zimógeno (proenzima) (p. 288)
mecanismo concertado (p. 281)	proteína quinasa (p. 284)	cascada enzimática (p. 293)
modelo secuencial (p. 281)	proteína fosfatasa (p. 285)	vía intrínseca de la coagulación (p. 293)
efecto homotrópico (p. 281)	secuencia consenso (p. 286)	vía extrínseca de la coagulación (p. 293)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Kantrowitz, E. R. y Lipscomb, W. N., 1990. *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: The molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends Biochem. Sci.* 15:53-59.
- Schachman, H. K., 1988. Can a simple model account for the allosteric transition of aspartate transcarbamoylase? *J. Biol. Chem.* 263: 18583-18586.
- Neurath, H., 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* 14:268-271.
- Bode, W. y Huber, R., 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204: 433-451.

Aspartato transcarbamila e interacciones alóstéricas

- West, J. M., Tsuruta, H. y Kantrowitz, E. R., 2004. A fluorescent probe-labeled *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase that monitors the allosteric conformation state. *J. Biol. Chem.* 279: 945-951.
- Endrizzi, J. A., Beernink, P. T., Alber, T. y Schachman, H. K., 2000. Binding of bisubstrate analog promotes large structural changes in the unregulated catalytic trimer of aspartate transcarbamoylase: Implications for allosteric regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:5077-5082.
- Beernink, P. T., Endrizzi, J. A., Alber, T. y Schachman, H. K., 1999. Assessment of the allosteric mechanism of aspartate transcarbamoylase based on the crystalline structure of the unregulated catalytic subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:5388-5393.

- Wales, M. E., Madison, L. L., Glaser, S. S. y Wild, J. R., 1999. Divergent allosteric patterns verify the regulatory paradigm for aspartate transcarbamylase. *J. Mol. Biol.* 294:1387-1400.

- LiCata, V. J., Burz, D. S., Moerke, N. J. y Allewell, N. M., 1998. The magnitude of the allosteric conformational transition of aspartate transcarbamylase is altered by mutations. *Biochemistry* 37:17381-17385.

- Eisenstein, E., Markby, D. W. y Schachman, H. K., 1990. Heterotropic effectors promote global conformational change in aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 29:3724-3731.

- Werner, W. E. y Schachman, H. K., 1989. Analysis of the ligand-promoted global conformational change in aspartate transcarbamoylase: Evidence

- for a two-state transition from boundary spreading in sedimentation velocity experiments. *J. Mol. Biol.* 206:221-230.
- Newell, J. O., Markby, D. W. y Schachman, H. K., 1989. Cooperative binding of the bisubstrate analog *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartate to aspartate transcarbamoylase and the heterotropic effects of ATP and CTP. *J. Biol. Chem.* 264:2476-2481.
- Stevens, R. C., Reinisch, K. M. y Lipscomb, W. N., 1991. Molecular structure of *Bacillus subtilis* aspartate transcarbamoylase at 3.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:6087-6091.
- Stevens, R. C., Gouaux, J. E. y Lipscomb, W. N., 1990. Structural consequences of effector binding to the T state of aspartate carbamoyltransferase: Crystal structures of the unligated and ATP- and CTP-complexed enzymes at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* 29:7691-7701.
- Gouaux, J. E. y Lipscomb, W. N., 1990. Crystal structures of phosphonocetamide ligated T and phosphonacetamide and malonate ligated R states of aspartate carbamoyltransferase at 2.8-Å resolution and neutral pH. *Biochemistry* 29:389-402.
- Labedan, B., Boyen, A., Baetens, M., Charlier, D., Chen, P., Cunin, R., Durbecke, V., Glansdorff, N., Herve, G., Legrain, C., Liang, Z., Purcare, C., Roovers, M., Sanchez, R., Toong, T. L., Van de Casteele, M., van Vliet, F., Xu, Y. y Zhang, Y. F., 1999. The evolutionary history of carbamoyltransferases: A complex set of paralogous genes was already present in the last universal common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49:461-473.

Modificación covalente

- Johnson, L. N. y Barford, D., 1993. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:199-232.
- Ziegler, M., 2000. New functions of a long-known molecule: Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 267:1550-1564.
- Ng, H. H. y Bird, A., 2000. Histone deacetylases: Silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25:121-126.
- Raju, R. V., Kakkar, R., Radhi, J. M. y Sharma, R. K., 1997. Biological significance of phosphorylation and myristylation in the regulation of cardiac muscle proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 176:135-143.

- Jacobson, M. K. y Jacobson, E. L., 1999. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: Protecting the genome and more. *Trends Biochem. Sci.* 24:415–417.
- Barford, D., Das, A. K. y Egloff, M. P., 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:133–164.

Proteína quinasa A

- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S. y Zoller, M. J., 1993. A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* 18:84–89.
- Gibbs, C. S., Knighton, D. R., Sowadski, J. M., Taylor, S. S. y Zoller, M. J., 1992. Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* 267:4806–4814.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., TenEyck, L., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. y Sowadski, J. M., 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407–414.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., TenEyck, L., Xuong, N. H., Taylor, S. S. y Sowadski, J. M., 1991. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:414–420.
- Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S. y Tsien, R. Y., 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349:694–697.

Activación de zimógenos

- Neurath, H., 1986. The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell. Biochem.* 32:35–49.
- Bode, W. y Huber, R., 1986. Crystal structure of pancreatic serine endopeptidases. In *Molecular and Cellular Basis of Digestion* (pp. 213–234), edited by P. Desnuelle, H. Sjostrom y O. Noren. Elsevier.
- Huber, R. y Bode, W., 1978. Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* 11:114–122.
- Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A. y Chambers, J. L., 1977. Mechanism of zymogen activation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6:177–193.

- Sielecki, A. R., Fujinaga, M., Read, R. J. y James, M. N., 1991. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:671–692.

Inhibidores de proteasas

- Carrell, R. y Travis, J., 1985. α_1 -Antitrypsin and the serpins: Variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10:20–24.
- Carp, H., Miller, F., Höidal, J. R. y Janoff, A., 1982. Potential mechanism of emphysema: α_1 -Proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2041–2045.
- Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H. y Carrell, R. W., 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin. *New Engl. J. Med.* 309:694–698.
- Travis, J. y Salvesen, G. S., 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 52:655–709.

Cascada de la coagulación

- Orfeo, T., Brufatto, N., Nesheim, M. E., Xu, H., Butenas, S. y Mann, K. G., 2004. The factor V activation paradox. *J. Biol. Chem.* 279:19580–19591.
- Mann, K. G., 2003. Thrombin formation. *Chest* 124:45–105.
- Rose, T. y Di Cera, E., 2002. Three-dimensional modeling of thrombin-fibrinogen interaction. *J. Biol. Chem.* 277:18875–18880.
- Krem, M. M. y Di Cera, E., 2002. Evolution of cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* 27: 67–74.
- Fuentes-Prior, P., Iwanaga, Y., Huber, R., Pagila, R., Rumennik, G., Seto, M., Morser, J., Light, D. R. y Bode, W., 2000. Structural basis for the anti-coagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 404:518–525.
- Herzog, R. W. y High, K. A., 1998. Problems and prospects in gene therapy for hemophilia. *Curr. Opin. Hematol.* 5:321–326.
- Lawn, R. M. y Vehar, G. A., 1986. The molecular genetics of hemophilia. *Sci. Am.* 254(3):48–65.
- Brown, J. H., Volkmann, N., Jun, G., Henschchen-Edman, A. H. y Cohen, C., 2000. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:85–90.
- Stubbs, M. T., Oschkinat, H., Mayr, I., Huber, R., Angliker, H., Stone, S. R. y Bode, W., 1992. The interaction of thrombin with fibrinogen: A structural basis for its specificity. *Eur. J. Biochem.* 206:187–195.

Problemas

1. *Perfil de actividad.* Se supone que un residuo de histidina del centro activo de la aspartato transcarbamila es importante para estabilizar el estado de transición de los sustratos unidos a él. Predecir cuál será la dependencia de la velocidad catalítica respecto del pH, suponiendo que esta interacción sea esencial y domine el perfil de actividad con el pH del enzima. (Véanse las ecuaciones de la p. 16).

2. *Regulación alóstérica.* Un sustrato se une con una fuerza 100 veces mayor al estado R que al T de un enzima alóstérico. Suponer que el enzima sigue el modelo concertado (MWC). (Véanse las ecuaciones de la p. 200).

(a) Si se une una molécula de sustrato por molécula de enzima ¿en qué factor se altera la relación de concentraciones de moléculas de enzima en los estados T y R?

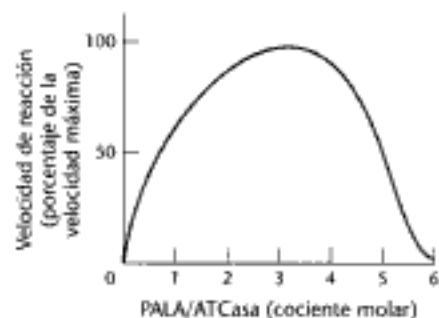
(b) Suponer que L , el cociente entre [T] y [R] en ausencia de sustrato, es 10^7 y que el enzima tiene cuatro centros de unión para el sustrato. ¿Cuál es la relación de moléculas enzimáticas en el estado R y en el estado T en presencia de cantidades saturantes de sustrato, suponiendo que sigue el modelo concertado?

3. *Transición alóstérica.* Considerar una proteína alóstérica que sigue el modelo concertado. Suponer que la relación entre T y R en ausencia de ligando es 10^5 ; $K_T = 2 \text{ mM}$, y $K_R = 5 \mu\text{M}$. La proteína tiene cuatro centros de unión para el ligando. ¿Cuál es la fracción de moléculas en forma R cuando están unidos 0, 1, 2, 3 ó 4 ligandos? (Véanse las ecuaciones de la p. 200).

4. *Cooperatividad negativa.* Se ha aislado un enzima dímerico que contiene dos centros activos idénticos. La unión de sustrato a uno de los centros activos disminuye la afinidad por sustrato del otro centro activo. ¿Puede explicar el modelo concertado esta cooperatividad negativa?

5. *Paradójico a primera vista.* Recordar que el fosfonacetyl-L-aspartato (PALA) es un inhibidor eficaz de la ATCase, ya que se parece a sus dos sustratos fisiológicos. Sin embargo, bajas concentraciones de este análogo bisustrato, que no es reactivo, aumentan la velocidad de reacción. Al añadir PALA, la velocidad de reacción aumenta hasta que se han unido un promedio de tres moléculas de PALA por molécula de enzima. La velocidad máxima es entonces

17 veces mayor que en ausencia de PALA. Después, al añadirse tres moléculas más de PALA por molécula de enzima, la velocidad de reacción disminuye hasta casi anularse. ¿Por qué activan a la ATCasa las bajas concentraciones de PALA?



6. *R frente a T.* Un enzima alostérico que sigue el modelo concertado presenta, en ausencia de sustrato, una relación T/R de 300. Suponer que una mutación invierte esta relación. ¿Cómo afectaría esta mutación a la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato?

7. *Energética de la regulación.* La fosforilación y desfosforilación de proteínas es una forma muy importante de regulación. Las proteína quinasas enlazan grupos fosforilo, mientras que una sola fosfatasa los elimina de la proteína diana. ¿Qué coste energético tiene esta forma de regulación covalente?

8. *Activación de zimógenos.* Cuando se añaden concentraciones muy bajas de pepsinógeno a un medio ácido, ¿cómo depende la vida media de la activación respecto a la concentración de zimógeno?

9. *Un ensayo revelador.* Supóngase que se acaba de examinar a un niño con un síndrome hemorrágico muy similar al de la hemofilia (deficiencia del factor VIII). Debido a que es ya muy tarde, está cerrado el laboratorio que realiza los ensayos especializados de coagulación. Sin embargo, se dispone por casualidad de una muestra de sangre de un hemofílico clásico que ingresó en el hospital una hora antes. ¿Cuál es la prueba más sencilla y rápida que se puede realizar para determinar si el nuevo paciente también es deficiente en la actividad del factor VIII?

10. *Contrapunto.* La síntesis del factor X, como la de protrombina, requiere vitamina K. El factor X también contiene residuos de γ -carboxiglutamato en su región amino terminal. Sin embargo, el factor X activado, a diferencia de la trombina, retiene esta zona de la molécula. ¿Cuál es probablemente la consecuencia funcional de esta diferencia entre las dos especies activadas?

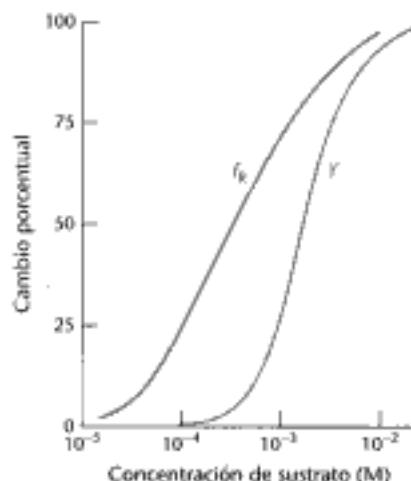
11. *Un inhibidor perspicaz.* La antitrombina III forma un complejo irreversible con la trombina, pero no con la protrombina. ¿Cuál es el motivo más probable de esta diferente reactividad?

12. *Repetición de héptadas.* Cada uno de los tres tipos de cadena de la fibrina contiene unidades repetitivas del heptapeptido (*abcdefg*) en el que los residuos *a* y *d* son hidrofóbicos. Proporcionar un motivo al que se deba esta regularidad.

13. *Diseño de fármacos.* Una empresa farmacéutica ha decidido preparar por metodología de DNA recombinante una antitripsina α_1 que sea más resistente a la oxidación que el inhibidor natural. ¿Qué aminoácido recomendaría que se sustituyera?

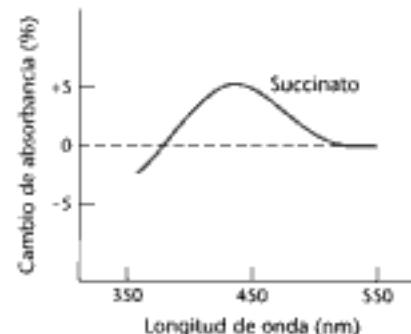
Problemas de Interpretación de datos

14. *Distinción entre modelos.* El gráfico adjunto muestra la fracción de un enzima alostérico en forma R (f_R) y la fracción de centros activos unidos a sustrato (V) en función de la concentración de sustrato. ¿Qué modelo, el concertado o el secuencial, explicaría mejor estos resultados?



[Tomado de M. W. Kirschner y H. K. Schachman, *Biochemistry* 12(1966):2997-3004.]

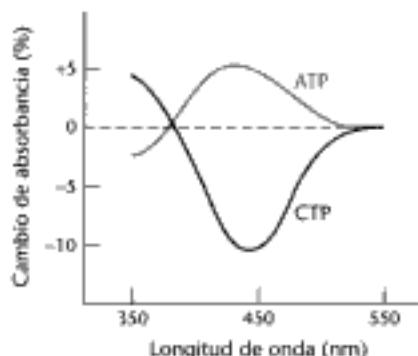
15. *Primera información en directo sobre la ATCasa 1.* La ATCasa reaccionó con nitrometano para formar un grupo de nitrotyrosina coloreado ($\lambda_{max} = 430$ nm) en cada una de sus cadenas catalíticas. La absorción debida a este grupo reportero o delator depende de su entorno inmediato. También se modificó un residuo esencial de lisina de cada centro catalítico a fin de bloquear la unión del sustrato. A continuación, se combinaron trímeros catalíticos de este enzima doblemente modificado con trímeros nativos, a fin de obtener un enzima híbrido. La absorción debida al grupo nitrotyrosina se midió añadiendo succinato al sistema, que es un análogo del sustrato. ¿Qué significaría la alteración observada en la absorbancia a 430 nm?



[Tomado de H. K. Schachman, *J. Biol. Chem.* 263(1988):18583-18586.]

16. *Segunda información en directo sobre la ATCasa 2.* Se construyó un híbrido diferente de ATCasa para comprobar los efectos de activadores e inhibidores alostéricos. Se combinaron subunidades reguladoras normales con subunidades catalíticas que contenían nitrotyrosina. Al añadir ATP, en ausencia de sustrato, aumentaba la absorbancia

a 430 nm, el mismo cambio que se observa al añadir succinato (véase el gráfico del Problema 15). Al contrario, el CTP en ausencia de sustrato, disminuía la absorbancia a 430 nm. ¿Qué significado tendrían los cambios de absorción de los grupos reporteros?



[Tomado de H. K. Schachman. *J. Biol. Chem.* 263 (1988):18583-18586.]

Problema de integración del capítulo

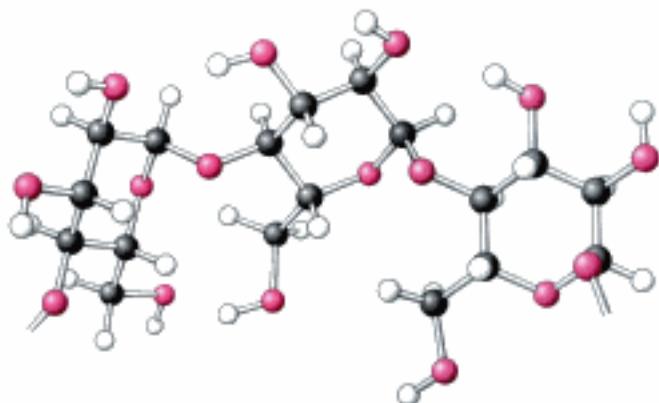
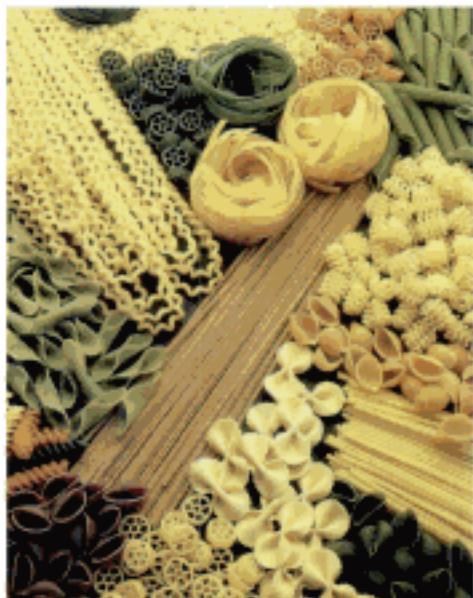
17. *Cuestión de densidad.* El valor de sedimentación de la aspartato transcarbamilasa disminuye cuando el enzima cambia al estado R. En base a las propiedades alóstéricas del enzima, explicar por qué disminuye el valor de sedimentación.

Problemas de mecanismos

18. *Aspartato transcarbamilasa.* Escribir con detalle el mecanismo para convertir el aspartato y el carbamilofosfato en *N*-carbamilaspartato. Indicar el papel que desempeña el residuo de histidina presente en el centro activo.

19. *Proteína quinasas.* Escribir con detalle el mecanismo para fosforilar un residuo de serina por ATP catalizado por una proteína quinasa. ¿Qué grupos cabe esperar que se encuentren en el centro activo de este enzima?

Carbohidratos



Los carbohidratos de la dieta son importantes fuentes de energía. El almidón, presente en los alimentos derivados de las plantas, tales como las pastas, consta de cadenas de moléculas de glucosa enlazadas. Estas cadenas se degradan en moléculas individuales de glucosa que servirán para la generación de ATP o como integrantes de otras moléculas. [(izquierda) Superstock].

Realicemos ahora una visión de conjunto de los carbohidratos (hidratos de carbono), una de las cuatro clases principales de biomoléculas junto con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los carbohidratos son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo. Ellos constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la Tierra debido a sus funciones importantes en todas las formas de vida. En primer lugar, los carbohidratos sirven como *almacén de energía, combustible y metabolitos intermedios*. En segundo lugar, los azúcares ribosa y desoxirribosa forman parte del *armazón estructural del RNA y DNA*. Tercero, los polisacáridos son elementos estructurales de las *paredes celulares de bacterias y plantas*. De hecho, la celulosa, el constituyente principal de las paredes de las plantas, es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera. Cuarto, los carbohidratos *están enlazados a muchas proteínas y lípidos*, donde ejercen funciones clave en las interacciones entre las células y otros elementos del *entorno celular*.

La inmensa diversidad estructural posible de los carbohidratos es una característica clave de estas moléculas en su función de mediadores de las interacciones celulares. Los carbohidratos se construyen a base de monosacáridos, moléculas pequeñas que contienen de tres a nueve átomos de carbono y que varían en tamaño y en la configuración estereoquímica de uno o más centros asimétricos. Estos monosacáridos pueden enlazarse para formar una gran diversidad de estructuras de oligosacáridos. El elevado número de oligosacáridos posibles hace que esta clase de moléculas resulte rica en información. Esta información, cuando está unida a proteínas, puede

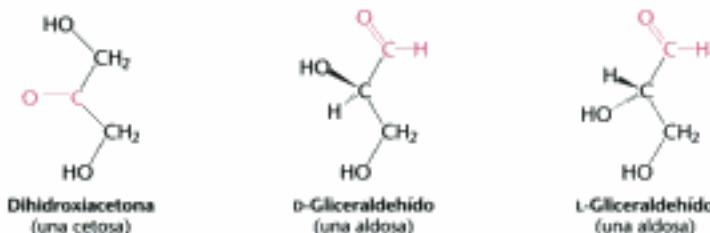
Contenido

- 11.1 Los monosacáridos son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo
- 11.2 Los carbohidratos complejos se forman por unión de monosacáridos
- 11.3 Los carbohidratos pueden unirse a proteínas para formar glicoproteínas
- 11.4 Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos específicos

aumentar la ya inmensa diversidad de las proteínas. Desentrañar las estructuras de estos oligosacáridos, descubrir su ubicación en sitios específicos dentro de las proteínas y determinar sus funciones son desafíos apasionantes en el campo de la proteómica. De hecho, a este subcampo le ha sido dado su propio nombre: *glicómica*.

11.1 Los monosacáridos son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo

Los *monosacáridos*, los carbohidratos más sencillos, son aldehídos o cetonas que tienen dos o más grupos hidroxilo; la fórmula empírica de muchos de ellos es $(C-H_2O)_n$, literalmente “hidratos de carbono”. Los monosacáridos son importantes moléculas oxidables (combustibles) a la vez que sillares de construcción de los ácidos nucleicos. Los monosacáridos más pequeños, para los que $n = 3$, son la dihidroxiacetona y los D- y L-gliceraldehídos.



A éstos se les denomina *triosas* (*tri-* en alusión a 3 carbonos). A la dihidroxiacetona se le llama *cetosa* porque contiene un grupo cetona, mientras que el gliceraldehído se considera una *aldosa* porque tiene un grupo aldehído. El gliceraldehído tiene un único carbono asimétrico y por ello existen dos estereoisómeros de este azúcar. El D-gliceraldehído y el L-gliceraldehído son *enantiómeros*, o imágenes especulares uno del otro. Tal como se mencionó en el capítulo 2, los prefijos D y L designan la configuración absoluta.

Los monosacáridos y otros azúcares se van a representar a menudo en este libro mediante las *proyecciones de Fischer* (Figura 11.1). Recordemos que, en la proyección de Fischer de una molécula, los átomos unidos a un carbono asimétrico por enlaces horizontales están por delante del plano de la página y los unidos por enlaces verticales están detrás de él (véase el Apéndice del Capítulo 1). Las proyecciones de Fischer ofrecen una visión clara y sencilla de la estereoquímica de cada carbono asimétrico.

Los monosacáridos simples con cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono se denominan respectivamente *tetrosas*, *pentosas*, *hexosas* y *heptosas*. Estas moléculas tienen múltiples carbonos asimétricos y, respecto a estos monosacáridos, los símbolos

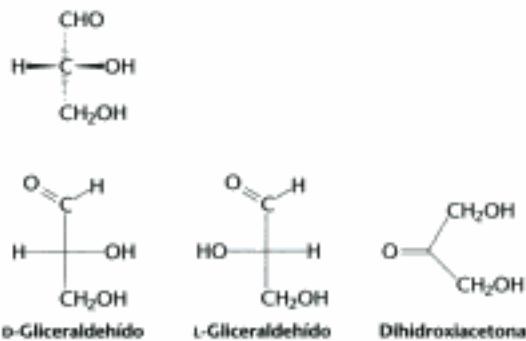


Figura 11.1 Proyecciones de Fischer de las triosas. La estructura superior revela las relaciones estructurales reales supuestas por las proyecciones de Fischer.

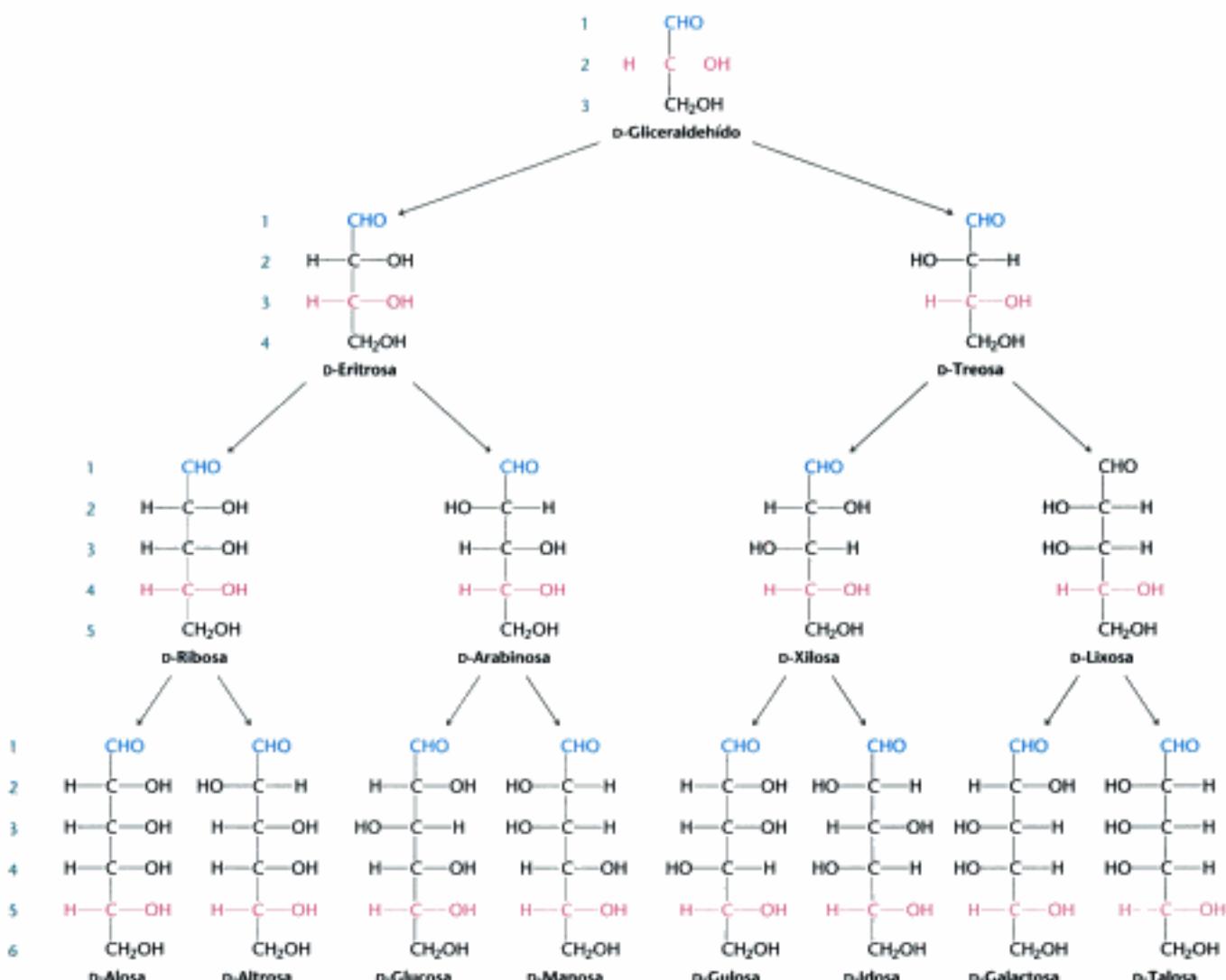


Figura 11.2 Las D-aldosas que contienen 3, 4, 5 y 6 átomos de carbono. Las D-aldosas contienen un grupo aldehido (en azul) y tienen la configuración del D-gliceraldehído en el centro de asimetría (en rojo) más alejado del grupo aldehido. Los números indican la designación estándar de cada átomo de carbono.

los *D* y *L* designan solamente la configuración absoluta del carbono asimétrico más alejado de los grupos aldehído o cetona. En la figura 11.2, por ejemplo, las aldosas D-eritrosa y D-treosa, de cuatro carbonos tienen la misma configuración en C-3 (porque ambas son D-azúcares) pero configuraciones opuestas en C-2. Son *diastereómeros*, no enantiómeros, porque no son imagen especular la una de la otra. La figura 11.2 muestra los azúcares D-aldosa más comunes. La D-ribosa, el carbohidrato componente del RNA, es una aldosa de cinco carbonos. La D-glucosa, D-manosa y D-galactosa son aldosas abundantes con seis carbonos. Nótese que la D-glucosa y la D-manosa sólo difieren en la configuración del C-2. Los azúcares que se diferencian únicamente en la configuración de un centro asimétrico se denominan *epímeros*. Así pues, la D-glucosa y la D-manosa son epímeros en el C-2; la D-glucosa y la D-galactosa lo son en el C-4.

La dihidroxiacetona es la cetosa más sencilla. La relación estereoquímica de las D-cetosas que contienen hasta seis átomos de carbono está representada en la Figura 11.3. Nótese que las cetosas tienen un centro asimétrico menos que las aldosas del mismo número de carbonos. La D-fructosa es la cetohexosa más abundante.

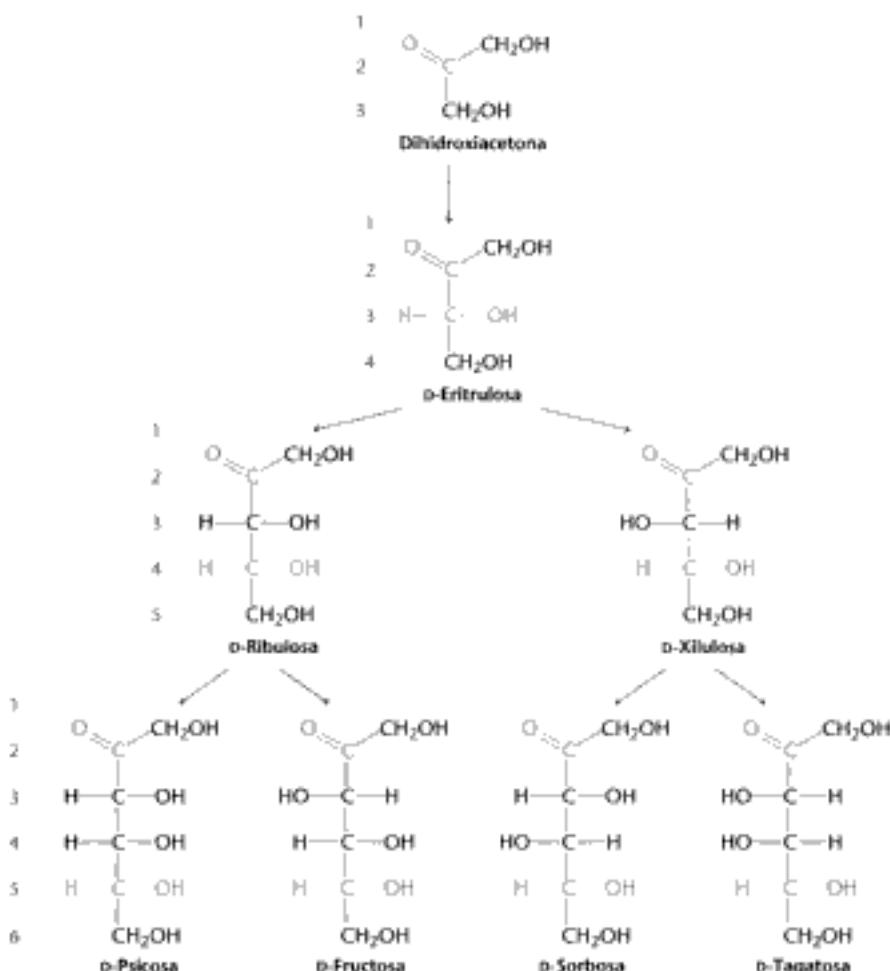


Figura 11.3 α -Cetosas que contienen 3, 4, 5 y 6 átomos de carbono. Los grupos ceto se representan en azul. Los centros asimétricos más alejados del grupo ceto, que determinan la designación α , se muestran en rojo.

Las pentosas y hexosas se ciclan para formar anillos de piranosa y furanosa

Las formas predominantes de la ribosa, glucosa, fructosa y muchos otros azúcares en disolución no son cadenas abiertas. Las formas en cadena abierta de estos azúcares se ciclan formando anillos porque estas formas son energéticamente más estables. La base de la formación de anillos radica en el hecho de que un aldehído puede reaccionar con un alcohol para formar un *hemiacetal*.



Para una aldohexosa como la glucosa, el C-1 aldehído de la forma abierta reacciona con el grupo hidroxilo de C-5 para formar un *hemiacetal intramolecular*. El hemiacetal cíclico resultante, un anillo de seis miembros, se llama *piranosa* por su semejanza con el *pirano* (Figura 11.4). De igual manera, una cetona que reacciona con un alcohol forma un *hemicetal*.



El grupo ceto del C-2 de la forma abierta de una cetohexosa, como la fructosa, puede formar un *hemicetal intramolecular* al reaccionar o bien con el grupo hidroxilo del



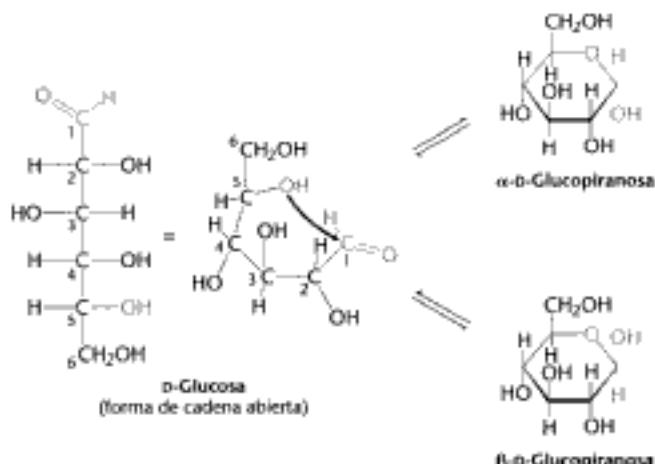


Figura 11.4 Formación de piranosas. La forma de cadena abierta de la glucosa se cicla cuando el grupo hidroxilo del C-5 ataca al átomo de oxígeno del grupo aldehído del C-1, para formar un hemiacetal intramolecular. Así pueden resultar dos formas anoméricas, llamadas α y β .

C-6 para formar un hemiacetal cíclico de seis miembros, o bien con el grupo hidroxilo del C-5 para formar un hemiacetal cíclico de cinco miembros (Figura 11.5). El anillo de cinco miembros se llama *furanosa* por su semejanza con el *furan*.

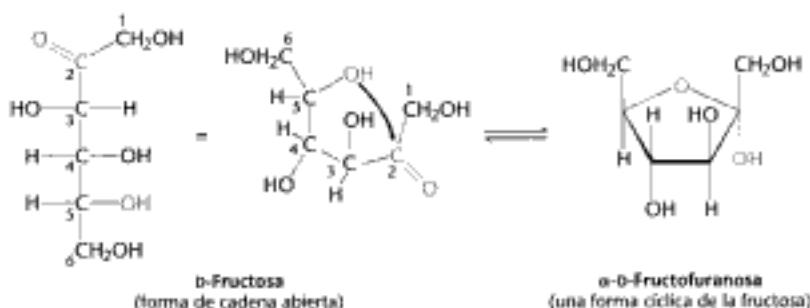
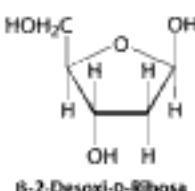
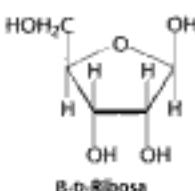


Figura 11.5 Formación de furanosas. Cuando el grupo hidroxilo del C-5 ataca a la cetona del C-2 para formar un hemiacetal intramolecular, la forma de cadena abierta de la fructosa se cicla para formar un anillo de cinco miembros. Pueden originarse dos anómeros, pero se ha representado sólo el anómero α .

Las representaciones de la glucopiranosa y fructofuranosa mostradas en las Figuras 11.4 y 11.5 corresponden a las *proyecciones de Haworth*. En estas proyecciones no se representan de forma explícita los átomos de carbono del anillo. El plano de este anillo es aproximadamente perpendicular al plano del papel, con la línea más gruesa proyectada hacia el lector. Al igual que las proyecciones de Fischer, las proyecciones de Haworth describen fácilmente la estereoquímica de los azúcares.

Cuando se forma un hemiacetal cíclico se crea un centro asimétrico adicional. En la glucosa, el C-1, el átomo de carbono carbonílico de la forma de cadena abierta, se convierte en un centro de asimetría, en la forma de anillo. De este modo, se pueden originar dos estructuras en anillo: la α -D-glucopiranosa y la β -D-glucopiranosa (véase la Figura 11.4). Para los D-azúcares representados mediante las proyecciones de Haworth, la configuración α significa que el grupo hidroxilo anclado en C-1 está en el lado opuesto del anillo del que ocupa el CH_2OH respecto al átomo de carbono que determina si el azúcar es D o L (el centro quiral); β significa que el grupo hidroxilo está en el mismo lado que el CH_2OH del centro quiral. El átomo de carbono C-1 se denomina átomo de carbono anomérico y las formas α y β se llaman anómeros. Una mezcla de glucosa en equilibrio contiene aproximadamente un tercio del anómero α , dos tercios del anómero β y menos del 1% de la forma de cadena abierta.

La misma nomenclatura se aplica a la forma de anillo furanósico de la fructosa, excepto en que α y β se refieren al grupo hidroxilo anclado en C-2, el carbono anomérico (véase la Figura 11.5). La fructosa puede formar tanto anillos piranósicos como furanósicos. Las formas piranósicas predominan en la fructosa libre en disolución y la forma furanósica predomina en muchos derivados de la fructosa (Fi-



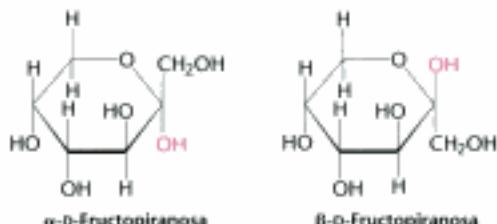
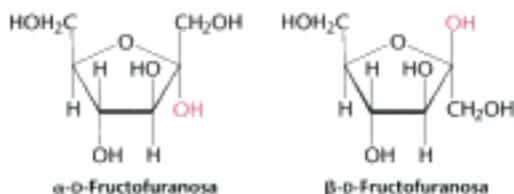


Figura 11.6 Estructuras anulares de la fructosa. La fructosa puede formar tanto anillos de cinco miembros, tipo furanosa, como anillos de seis miembros, tipo piranosa. En ambos casos son posibles los anómeros α y β .

gura 11.6). Las pentosas tales como la D-ribosa y la 2-desoxi-D-ribosa forman anillos furánicos como se ha visto en estas unidades integradas en el RNA y DNA.

Los anillos de piranosa y de furanosa pueden adoptar diferentes conformaciones

El anillo piránico, de seis miembros, no es plano, debido a la geometría tetraédrica de sus átomos de carbono saturados. En vez de esto, los anillos piránicos adoptan dos clases de conformaciones, denominadas *silla* y *navío* debido al parecido con esos objetos (Figura 11.7). En la forma de silla, los sustituyentes de los carbonos del anillo tienen dos orientaciones: axial y ecuatorial. Los *enlaces axiales* son aproximadamente perpendiculares al plano medio del anillo, mientras que los *ecuatoriales* son aproximadamente paralelos a ese plano. Los sustituyentes axiales se estorban mutuamente cuando emergen por el mismo lado del anillo (por ejemplo, los grupos 1,3-diaxiales). Por el contrario, los sustituyentes ecuatoriales se estorban menos. La forma de silla de la $\beta\text{-D-glucopiranosa}$ es la predominante porque todas las posiciones axiales están ocupadas por átomos de hidrógeno. Los grupos más voluminosos, $-\text{OH}$ y $-\text{CH}_2\text{OH}$, emergen en la periferia, donde se estorban menos. La forma de navío de la glucosa está desfavorecida porque presenta gran impedimento estérico.



Figura 11.7 Formas de silla y de navío de la $\beta\text{-D-glucopiranosa}$. La forma de silla es más estable porque presenta menor impedimento estérico al estar todas las posiciones axiales ocupadas por átomos de hidrógeno. Abreviaturas: a, axial; e, ecuatorial.

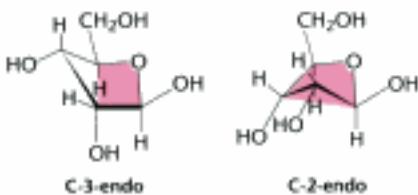


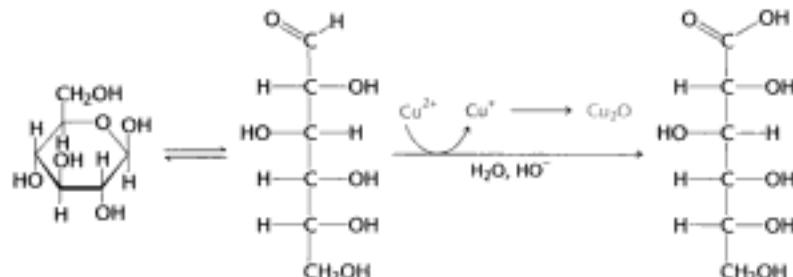
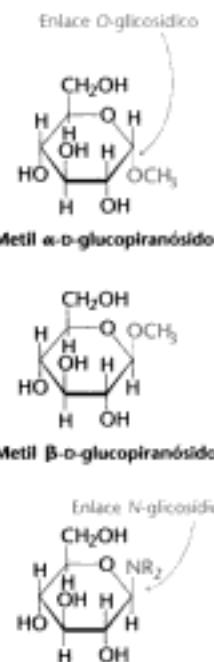
Figura 11.8 Conformaciones en forma de sobre de la $\beta\text{-D-ribosa}$. Aquí se representan las formas C-2-endo y C-3-endo de la $\beta\text{-D-ribosa}$. El color señala los cuatro átomos situados aproximadamente en un mismo plano.

Los anillos furánicos, al igual que los piránicos, tampoco son planos. Estos anillos pueden estar plegados de modo que cuatro átomos son aproximadamente coplanares y el quinto está fuera de este plano a unos 0.5 \AA aproximadamente (Figura 11.8). Esta conformación se denomina *forma de sobre* porque recuerda la estructura de un sobre abierto con la solapa levantada. En las ribosas integradas en la mayoría de las biomoléculas, el C-2 o el C-3 quedan fuera del plano en el mismo lado que el C-5. Estas conformaciones se llaman respectivamente C-2-endo y C-3-endo.

Los monosacáridos se unen a alcoholes y aminas por medio de enlaces glicosídicos

Los monosacáridos pueden modificarse al reaccionar con alcoholes y aminas formando los monosacáridos modificados. Así, por ejemplo, la D-glucosa reaccionará con metanol en un proceso catalizado en medio ácido: el átomo de carbono anomérico C-1, que forma parte del hemiacetal (p. 306), reacciona con el grupo hidroxilo del metanol para formar un *azúcar acetal*, también llamado *glicósido*. La reacción forma dos glicósidos: el metil- α -D-glucopiranósido y el metil- β -D-glucopiranósido. Estos dos glucopiranósidos se diferencian en la configuración del carbono anomérico. El nuevo enlace formado entre el carbono anomérico de la glucosa y el oxígeno hidroxílico de un alcohol se denomina *enlace glicosídico*; concretamente, es un *enlace O-glicosídico*. Por otro lado, el carbono anomérico de un azúcar puede unirse al átomo de nitrógeno de una amina formando un *enlace N-glicosídico*. De hecho, ya hemos encontrado previamente tales productos de reacción; los nucleósidos son aductos de azúcares como la ribosa con aminas como la adenina (p. 109). En la Figura 11.9 se representan otros azúcares modificados importantes.

Los compuestos como el metilglucopiranósido presentan diferencias de reactividad respecto al monosacárido de procedencia. Así, por ejemplo, la glucosa no modificada reacciona con agentes oxidantes tales como el ion cúprico (Cu^{2+}) debido a que su forma abierta tiene un grupo aldehído que es fácilmente oxidable.



Los glicósidos, como el metilglucopiranósido, no reaccionan porque no pueden interconvertirse incluyendo una forma con un grupo aldehído libre. Las disoluciones de ion cúprico (la conocida disolución de Fehling) aportan un ensayo sencillo para reconocer azúcares tales como la glucosa que puede existir como aldehído o cetona libre. Los azúcares que reaccionan se llaman *azúcares reductores*; los que no lo hacen, *azúcares no reductores*. Los azúcares reductores pueden unirse de forma inespecífica a otras moléculas. Así, por ejemplo, como azúcar reductor la glucosa puede reaccionar con la hemoglobina y formar una hemoglobina glicosilada. Los cambios

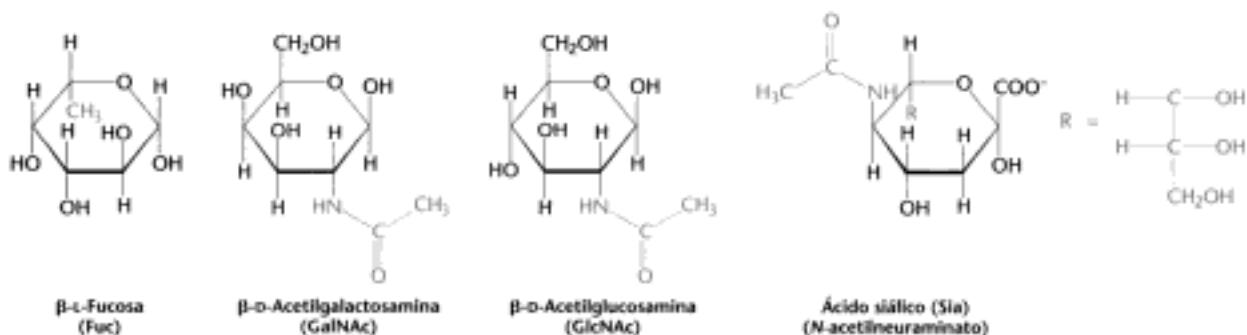
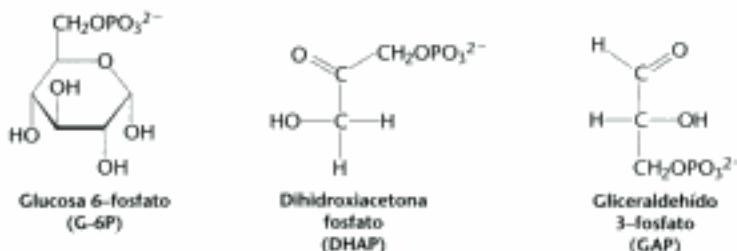


Figura 11.9 Monosacáridos modificados. Los carbohidratos pueden modificarse mediante la adición de sustituyentes (representados en rojo) distintos de los grupos hidroxilo. Tales monosacáridos modificados aparecen con frecuencia en las superficies celulares.

en la cantidad de hemoglobina glicosilada pueden utilizarse para medir la efectividad de los tratamientos de la diabetes mellitus, una enfermedad caracterizada por los elevados valores de glucosa en sangre (p. 773). La reacción con la glucosa no afecta a la capacidad de la hemoglobina para unirse al oxígeno.

Los azúcares fosforilados son intermediarios clave en la generación de energía y en la biosíntesis

La modificación de un azúcar merece atención especial por su importancia en el metabolismo. Una modificación común es la adición de grupos fosforilo a los azúcares. Así, por ejemplo, la primera etapa en la degradación de la glucosa para obtener energía es una conversión en glucosa 6-fosfato. Varios intermediarios subsiguientes en esta vía metabólica, tales como la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato, son azúcares fosforilados.



La fosforilación hace a los azúcares aniónicos; la carga negativa evita que estos azúcares puedan abandonar libremente la célula atravesando su bicapa lipídica de la membrana. La fosforilación también *origina intermediarios reactivos* que formarán más fácilmente enlaces con otras moléculas. Así, por ejemplo, los derivados de la ribosa con múltiples fosforilaciones desempeñan papeles importantes en la biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina (p. 712).

11.2 Los carbohidratos complejos se forman por unión de monosacáridos

Un monosacárido puede unirse a otro mediante enlaces glicosídicos. Los *oligosacáridos* se originan por la unión de dos o más monosacáridos mediante enlaces *O-glicosídicos* (Figura 11.10). La maltosa, por ejemplo, se forma por la unión de dos residuos de α -glucosa que se enlanzan por medio de un enlace glicosídico, entre el C-1, de uno y el oxígeno hidroxílico del C-4 del azúcar adyacente. El azúcar que aporta el C-1 al enlace tiene la configuración α . En otras palabras, el enlace que se forma en el C-1 aparece debajo del plano del anillo cuando se observa en la disposición estándar. Por eso, en enlace de la maltosa se llama α -1,4-glicosídico. El hecho de que los monosacáridos tengan muchos grupos hidroxilo significa que son posibles diversas uniones glicosídicas. De hecho, las diversas posibilidades de enlazarse, junto con la amplia variedad de monosacáridos y sus muchas formas isoméricas hace que los carbohidratos complejos sean unas moléculas estructuralmente muy variadas.

La sacarosa, lactosa y maltosa son los disacáridos más comunes

Un *disacárido* consta de dos azúcares unidos por un enlace *O-glicosídico*. Tres disacáridos abundantes son la sacarosa, lactosa y maltosa (Figura 11.11). La *sacarosa* (el azúcar de mesa) una forma de transporte de carbohidratos en plantas, se obtiene comercialmente de la caña o de la remolacha. En este disacárido se unen los carbonos anoméricos de la glucosa y de la fructosa; la configuración de este enlace glicosídico es α para la glucosa y β para la fructosa. *En consecuencia, la sacarosa es un azúcar no reductor, porque ninguno de los monosacáridos que la integran puede fácilmente convertirse en aldehido o cetona, a diferencia de la mayoría de los otros*

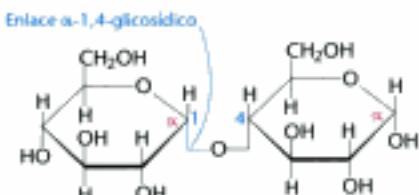
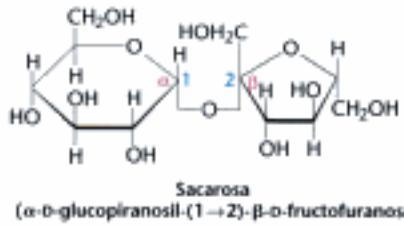


Figura 11.10 La maltosa, un disacárido. Dos moléculas de glucosa, unidas por un enlace α -1,4-glicosídico, forman el disacárido maltosa. Los ángulos en los enlaces del oxígeno central no suponen átomos de carbono, sino que se añaden para la facilitar la ilustración.



azúcares. La sacarosa puede escindirse en sus monosacáridos integrantes por acción del enzima *sacarasa*.

La *lactosa*, el disacárido de la leche, consta de galactosa unida a la glucosa mediante un enlace β-1,4-glicosídico. La lactosa se hidroliza en sus monosacáridos, en los seres humanos, por el enzima *lactasa* (p. 451) y en las bacterias, por la *β-galactosidasa*. En la *maltosa*, como se ha visto antes, se unen dos glucosas mediante un enlace α-1,4-glicosídico. La maltosa procede de la hidrólisis del almidón y a su vez ella se hidroliza a glucosa por acción de la *maltasa*. La sacarasa, lactasa y maltasa se localizan en la superficie externa de las células epiteliales que tapizan el intestino delgado (Figura 11.12).

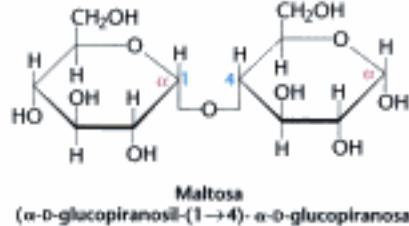
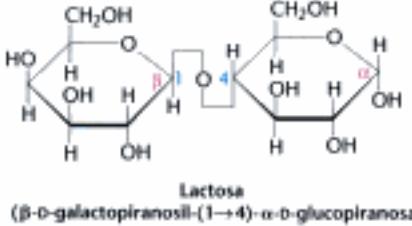


Figura 11.11 Disacáridos comunes. La sacarosa, la lactosa y la maltosa son componentes ordinarios de la dieta. Los ángulos en los enlaces al oxígeno central no representan átomos de carbono.

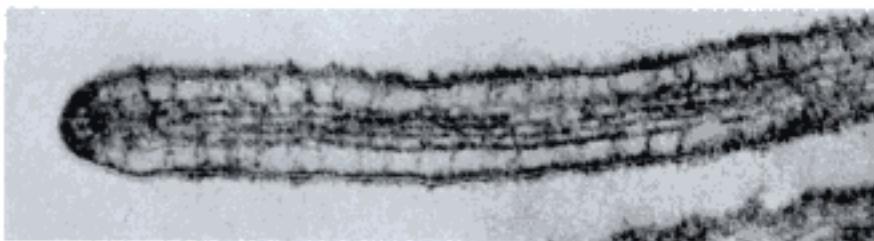


Figura 11.12 Micrografía electrónica de una microvellosidad intestinal. La lactasa y otros enzimas que hidrolizan carbohidratos se encuentran en las microvellosidades proyectadas desde la cara externa de la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino. [Tomado de M. S. Mooseker y L. G. Tilney, *J. Cell. Biol.* 67 (1975):725-743.]

El glucógeno y el almidón son almacenes de glucosa movilizables

Los grandes oligosacáridos poliméricos, formados por la unión de muchos monosacáridos, se llaman *polisacáridos*. Los polisacáridos desempeñan funciones vitales en el almacenaje de energía y en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos. Cuando todos los monosacáridos son iguales estos polímeros se llaman *homopolímeros*. El homopolímero más corriente en las células animales es el *glucógeno*, la forma de almacenamiento de la glucosa. Tal como se verá con detalle en el capítulo 21, el glucógeno es un polímero de residuos de glucosa muy grande y ramificado. La mayoría de las glucosas del glucógeno están unidas por enlaces α-1,4-glicosídicos. Las ramas se forman por enlaces α-1,6-glicosídicos, presentes aproximadamente a razón de uno por cada 10 unidades de glucosa (Figura 11.13).

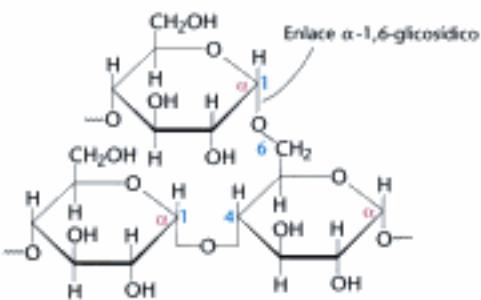


Figura 11.13 Punto de ramificación del glucógeno. Dos cadenas de moléculas de glucosa, unidas por enlaces α-1,4-glicosídicos, se unen por medio de un enlace α-1,6-glicosídico para crear un punto de ramificación. Este enlace α-1,6-glicosídico, que se forma aproximadamente por cada 10 unidades de glucosa, hace que el glucógeno sea una molécula altamente ramificada.

El reservorio nutricional de las plantas es el *almidón*, del cual existen dos formas. La *amilosa*, el tipo no ramificado del almidón, consta únicamente de residuos de glucosa con uniones α -1,4. La *amilopectina*, la forma ramificada, tiene un enlace α -1,6 por cada 30 enlaces α -1,4, de estructura semejante al glucógeno, excepto en su menor grado de ramificación. Más de la mitad de los carbohidratos ingeridos por el hombre son almidón. Tanto la amilopectina como la amilosa se hidrolizan rápidamente por la α -amilasa, un enzima que secretan las glándulas salivales y el páncreas.

La celulosa, el principal polímero estructural de las plantas, está formada por cadenas lineales de unidades de glucosa

La *celulosa*, el otro polímero importante de las plantas, cumple funciones estructurales en vez de nutritivas. La celulosa es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera. Cada año, en la Tierra, se sintetizan y degradan unos 10^{15} kg de celulosa. La celulosa es un polímero no ramificado formado por residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. La configuración β permite a la celulosa formar cadenas muy largas y rectilíneas. Las fibrillas están formadas por cadenas paralelas que interaccionan una con otra por medio de puentes de hidrógeno. Los enlaces α -1,4 del glucógeno y del almidón producen una arquitectura molecular muy diferente de la que presenta la celulosa (Figura 11.14). Estas diferencias entre los enlaces α y β tienen importantes consecuencias biológicas. La cadena recta formada por los enlaces β resulta óptima para la construcción de fibras con elevada fuerza tensil. En cambio, la hélice abierta formada por los enlaces α resulta muy útil para constituir un almacén de azúcar fácilmente accesible.

Aunque los mamíferos carecen de celulasa y, por tanto, no pueden digerir la madera y las fibras vegetales, la celulosa y otras fibras vegetales son todavía un importante constituyente de nuestra dieta como un componente dietético fibroso. La fibra de la dieta produce la sensación de saciedad. La fibra soluble, como la pectina (ácido poligalacturónico) hace más lento el movimiento de los alimentos por el tubo digestivo, favoreciendo la digestión y la absorción de los nutrientes. Las fibras insolubles, como la celulosa, aumentan la velocidad a la que los productos de la digestión atraviesan el intestino grueso. Este aumento de velocidad puede reducir al mínimo la exposición a las toxinas de nuestra dieta.

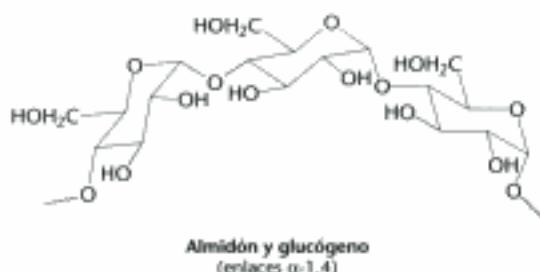
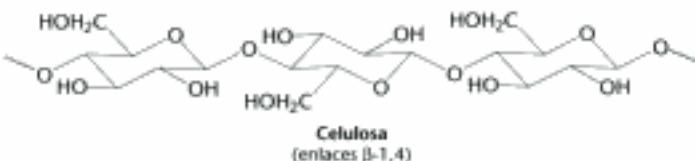
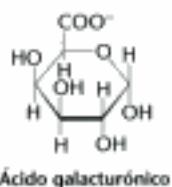


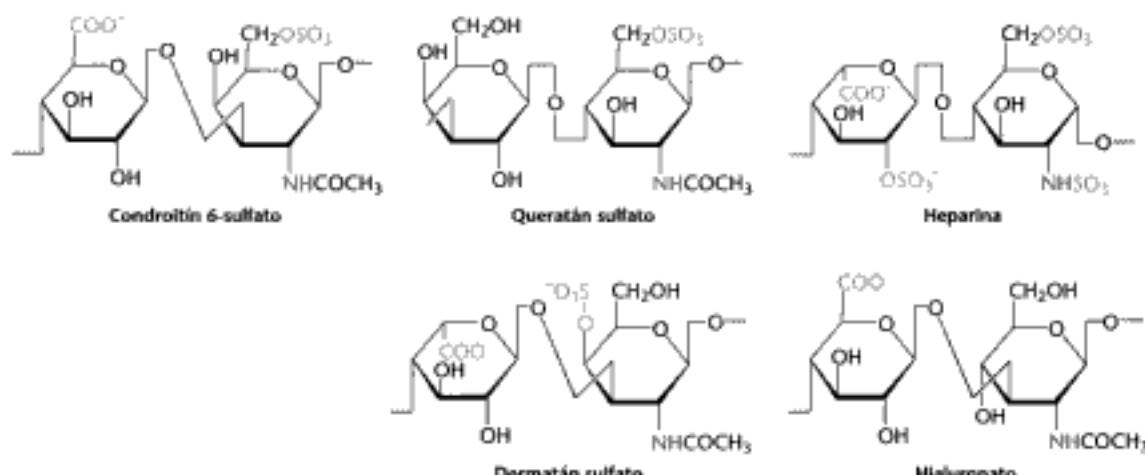
Figura 11.14 Los enlaces glicosídicos determinan la estructura de los polisacáridos. Los enlaces β -1,4 favorecen las cadenas rectas que resultan óptimas para fines estructurales. Los enlaces α -1,4 favorecen las estructuras dobladas, más adecuadas para el almacenamiento.

Los glicosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos aniónicos formadas por repetición de unidades de disacáridos

Los *proteoglicanos* son proteínas unidas a un tipo particular de polisacáridos llamados *glicosaminoglicanos*. Los proteoglicanos se parecen más a polisacáridos que a

proteínas por cuanto el glicosaminoglicano constituye más de un 95% del peso de la biomolécula. Los proteoglicanos actúan como lubricantes y componentes estructurales en el tejido conjuntivo; en otros tejidos intervienen en la adhesión de las células a la matriz extracelular y se unen a los factores que estimulan la proliferación celular.

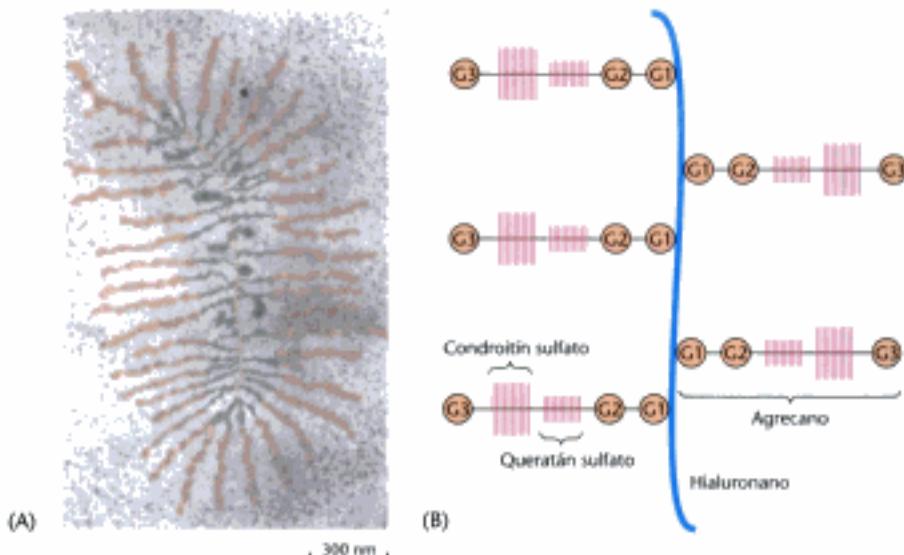
Las propiedades de los proteoglicanos vienen determinadas primariamente por el componente glicosaminoglicano. Muchos *glicosaminoglicanos* están constituidos por *unidades repetidas de un disacárido* que contiene un derivado de *aminoazúcar*: glucosamina o galactosamina (Figura 11.15). Por lo menos uno de los azúcares de la unidad que se repite posee un grupo con carga negativa: *carboxilato* o *sulfato*. En los animales, los principales glicosaminoglicanos son condroitín sulfato, queratán sulfato, heparina, heparán sulfato, dermatán sulfato y hialuronato. Los proteoglicanos se llamaron anteriormente mucopolisacáridos, de modo que *mucopolisacaridosis* es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades que resultan de la incapacidad de degradar los glicosaminoglicanos. Aunque los aspectos clínicos precisos varían según la enfermedad, todas las mucopolisacaridosis cursan con deformidades esqueléticas y reducidas esperanzas de vida.



 Entre los miembros mejor caracterizados de esta clase diversa es el proteoglicano de la matriz extracelular del cartílago. El proteoglicano *agrecano* y la proteína *colágeno* son los componentes clave del cartílago. La triple hélice del colágeno (p. 45) aporta la estructura y la fuerza tensil, mientras que el agrecano sirve como absorbente de choques. La proteína componente del agrecano es una gran molécula compuesta de 2397 aminoácidos. Esta proteína tiene tres dominios globulares y el sitio de inserción del glicosaminoglicano es una región que se extiende entre los dominios globulares 2 y 3. Esta región lineal contiene secuencias de aminoácidos altamente repetidas que son lugares de unión de queratán sulfato y condroitín sulfato. Muchas moléculas de agrecano están a su vez unidas de forma no covalente a través del primer dominio global a un filamento muy largo formado por la unión conjunta de moléculas del glicosaminoglicano hialuronano (Figura 11.16). El agua resulta absorbida por los glicosaminoglicanos, atraída por sus muchas cargas negativas. El agrecano puede amortiguar fuerzas de compresión debido a que el agua absorbida le capacita para rehacerse después de ser deformado. Cuando se ejerce la presión, al igual que la huella del pie sobre el suelo en el paseo, el agua es expulsada del glicosaminoglicano, amortiguando el impacto. Cuando la presión desaparece el agua se reabsorbe. La degradación proteolítica del agrecano y el colágeno del cartílago puede originar la *osteoartritis*.

Figura 11.15 Unidades repetitivas de los glicosaminoglicanos. Las fórmulas estructurales de cinco unidades repetitivas de importantes glicosaminoglicanos ilustran la diversidad de modificaciones y de enlaces que son posibles en ellos. Los grupos amino se representan en azul y los grupos cargados negativamente en rojo. Para mayor claridad se han omitido los hidrógenos. La estructura de la derecha, en todos los casos, es un derivado de una glucosamina.

Figura 11.16 Estructura del proteoglicano del cartílago. (A) Micrografía electrónica de un proteoglicano de cartílago (coloreado artificialmente). Los monómeros de proteoglicano emergen lateralmente a intervalos regulares en los lados opuestos de un filamento central de hialuronano. (B) Representación esquemática. G = dominio globulador. [(A) Cortesía del Dr. Lawrence Resenber. De J. A. Buckwalter y L. Rosenberg. *Collagen Relat. Res.* 3 81983): 489-504.]



Unos enzimas específicos son responsables del ensamblaje de los oligosacáridos

Los oligosacáridos se sintetizan mediante la acción de enzimas específicos, *glicosiltransferasas*, que catalizan la formación de enlaces glicosídicos uniendo los monosacáridos. Cada enzima debe ser específico, en mayor o menor grado, de los azúcares que van a ser enlazados. Dada la diversidad de enlaces glicosídicos conocidos, se requieren muchos enzimas diferentes. Nótese que este modo de unión resulta totalmente contrario al utilizado en la síntesis de otros polímeros biológicos estudiados con anterioridad, a saber, polipéptidos y oligonucleótidos. A medida que esos polímeros se ensamblan, la información sobre la secuencia de sus monómeros se extrae a partir de un molde y un aparato catalítico único es el responsable de la formación de los enlaces.

En la Figura 11.17 se representa la forma genérica de las reacciones catalizadas por las glicosiltransferasas. El azúcar que se añade interviene en la forma de un azúcar-nucleótido activado. *Los nucleótidos con azúcar son intermediarios importantes en muchos procesos* y los encontraremos de nuevo en los Capítulos 16 y 21. Es de

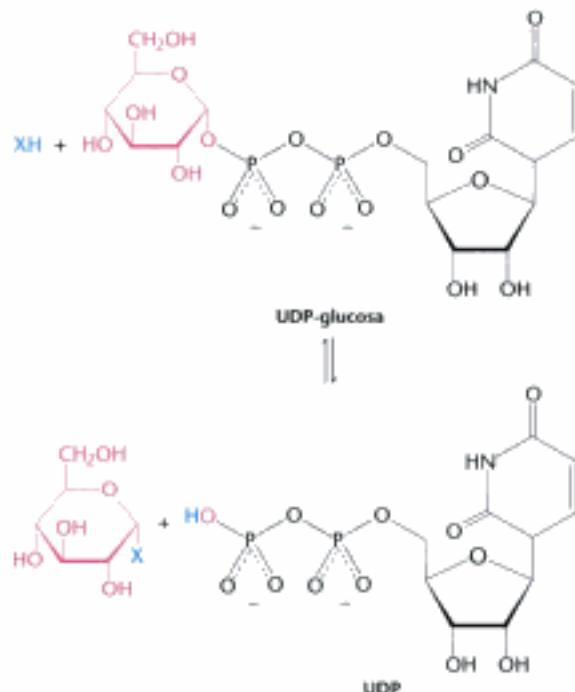


Figura 11.17 Formulación genérica de una reacción glicosiltransferasa. El azúcar que se añade procede de un azúcar-nucleótido, en este caso, UDP-glucosa. El acceptor, designado como X en la figura, puede ser un monosacárido simple, un polisacárido complejo o una serina o treonina de la proteína.

advertir que tales reacciones pueden proceder o bien reteniendo o bien invirtiendo la configuración del átomo de carbono glicosídico que va a constituir el nuevo enlace; cada enzima sigue una vía estereoespecífica o bien la otra.

 Los grupos sanguíneos humanos ABO ilustran los efectos de las glicosiltransferasas. Los azúcares se unen a glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los eritrocitos. En cada tipo de grupo sanguíneo debe existir una de las tres diferentes estructuras, denominadas A, B y O (Figura 11.18). Estas estructuras tienen en común un oligosacárido fundamental llamado antígeno O (a veces también H). Los antígenos A y B difieren de O por la adición de un monosacárido extra, a saber, *N*-acetilgalactosamina (para A) o galactosa (para B) unido por medio de un enlace α -1,3-glicosídico a una galactosa integrante del antígeno O.

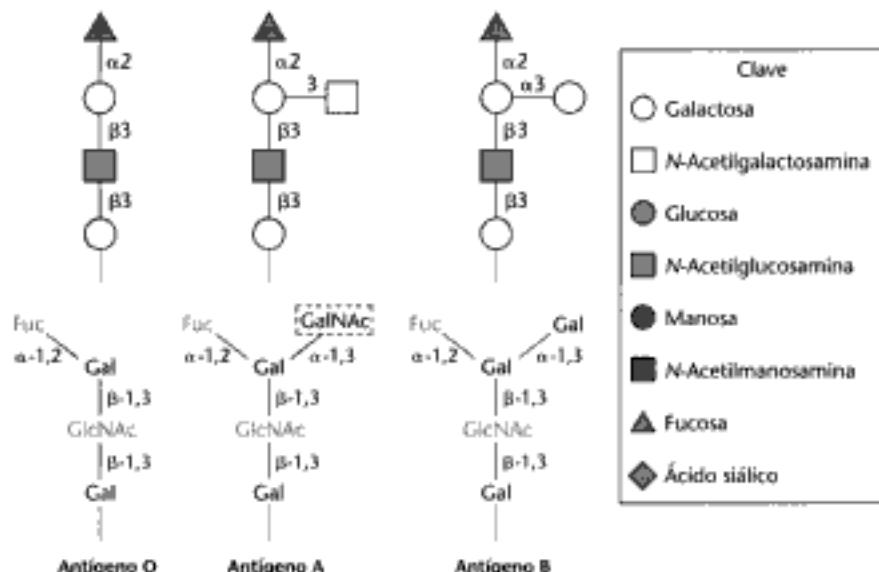


Figura 11.18 Estructura de los oligosacáridos antigenicos A, B, O. Las estructuras de los carbohidratos mostradas en la parte superior de la figura se describen simbólicamente utilizando un esquema mostrado en la clave que se está utilizando ampliamente. Abreviaturas: Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina.

Unas glicosiltransferasas específicas son las que añaden este monosacárido extra al antígeno O. Cada individuo hereda el gen de una glicosiltransferasa de este tipo de cada progenitor. La transferasa tipo A añade específicamente *N*-acetilgalactosamina, mientras que la de tipo B añade galactosa. Estos enzimas son idénticos en sus 354 posiciones de aminoácidos, excepto en 4 de ellas. El fenotipo O es el resultado de una mutación que provoca la terminación prematura de la traducción y por consiguiente no se produce la glicosiltransferasa necesaria para añadir más carbohidratos.

El uso del adecuado grupo sanguíneo ABO en las transfusiones sanguíneas y otros procedimientos de trasplante resulta crucial. En caso contrario, tales procedimientos pueden introducir un antígeno que no estaba normalmente presente en aquella persona. El sistema inmune personal reconoce al antígeno como foráneo y destruye los glóbulos rojos incompatibles, iniciando una serie de reacciones adversas.

 ¿Por qué existen en las poblaciones humanas diferentes tipos sanguíneos? Supongamos que un organismo patógeno, tal como un parásito, expresa en la superficie de sus células un antígeno-carbohidrato similar a uno de los antígenos de los grupos sanguíneos del hospedador. Este antígeno no será fácilmente reconocido como extraño por la persona cuyo grupo sanguíneo coincide con el antígeno del parásito, de forma que prosperará en ella. Sin embargo, resultarán protegidas las personas que posean un grupo sanguíneo diferente. En consecuencia, existirá una presión selectiva en los seres humanos para diversificar los tipos de sangre, con el fin de evitar el mimetismo del parásito y a la vez habrá una presión selectiva en los parásitos para mejorar este mimetismo. La constante "carrera de armamentos" entre los microorganismos patógenos y los seres humanos dirige la evolución hacia la diversidad de los antígenos de superficie en las poblaciones humanas.

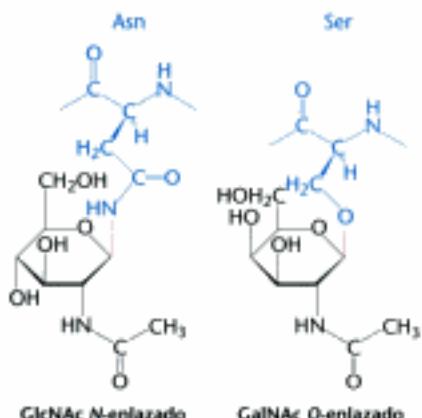


Figura 11.19 Enlaces glicosídicos entre proteínas y carbohidratos. Un enlace glicosídico une el carbohidrato a la cadena lateral de una asparragina (unión N-) o de una serina o treonina (unión O-). Los enlaces glicosídicos se representan en rojo.

Abreviaturas para los azúcares

Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GlcNAc	N-Acetilgalactosamina
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetylglucosamina
Man	Manosa
Sia	Ácido siálico

11.3 Los carbohidratos pueden unirse a proteínas para formar glicoproteínas

Un grupo azúcar puede unirse de forma covalente a una proteína para formar una **glicoproteína**. Los carbohidratos están presentes en un porcentaje en peso mucho menor en las glicoproteínas que en los proteoglicanos. Muchas glicoproteínas son componentes de las membranas celulares, donde ejercen una serie de funciones en procesos tales como la adhesión celular o la unión de los espermatozoides al óvulo. Otras glicoproteínas se forman por la unión de carbohidratos a proteínas solubles. En particular muchas de las proteínas secretadas por las células están glicosiladas, incluyendo la mayoría de las proteínas presentes en el componente sérico de la sangre.

Los carbohidratos pueden unirse a las proteínas a través de residuos de asparragina (enlaces N-) o bien serina o treonina (enlaces O-)

En las glicoproteínas los azúcares pueden enlazarse al átomo de nitrógeno amídico de la cadena lateral de la asparragina (denominado *enlace N-*) o bien al átomo de oxígeno de la cadena lateral de la serina o la treonina (denominado *enlace O-*) tal como se aprecia en la figura 11.19. El residuo de asparragina puede aceptar un oligosacárido solamente si forma parte de una secuencia Asn-X-Ser o bien Asn-X-Thr, en las que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Así pues, *los sitios potenciales de glicosilación pueden localizarse conociendo la secuencia de los aminoácidos*. No obstante, cuáles de estos sitios potenciales serán realmente glicosilados depende entre otras cosas de la estructura de la proteína y del tipo de célula en la que se expresa. Todos los oligosacáridos *N*-enlazados tienen en común un pentasacárido nuclear o central formado por tres manosas y dos *N*-acetilglucosaminas. A este núcleo se unen más azúcares para formar la enorme diversidad de estructuras oligosacáridicas que encontramos en las glicoproteínas (Figura 11.20).

Veamos una glicoproteína presente en el suero sanguíneo que ha mejorado espectacularmente el tratamiento de la anemia, en particular la inducida por la quimioterapia del cáncer: la hormona glicoproteica eritropoyetina (EPO) que segregan los riñones y estimula la producción de glóbulos rojos. La EPO se compone de 165 aminoácidos y está *N*-glicosilada en tres residuos de asparragina y *O*-glicosilada en uno de serina (Figura 11.21). La EPO madura contiene un 40% de carbohidrato en peso y la glicosilación mejora la estabilidad de la proteína en la sangre.

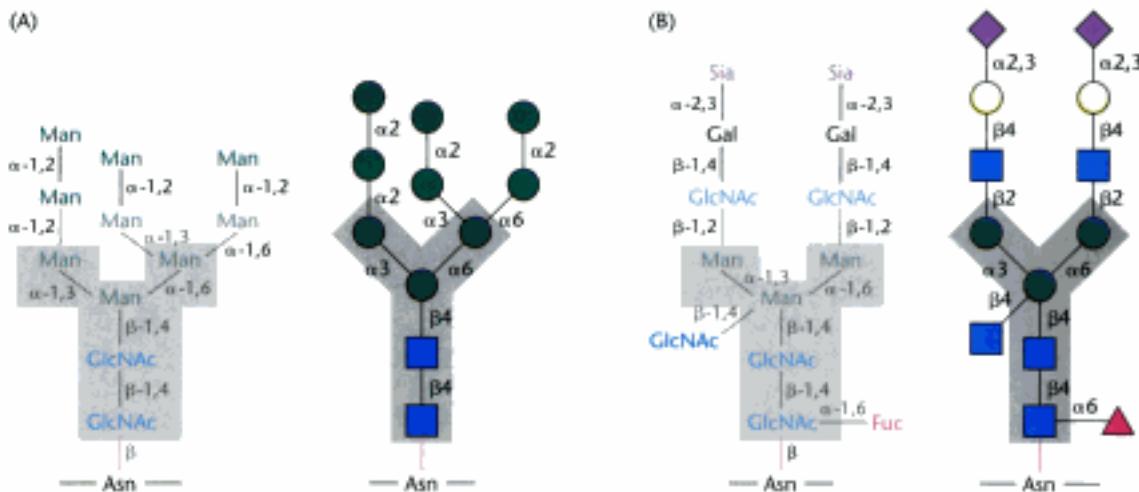


Figura 11.20 Oligosacáridos *N*-enlazados. El núcleo pentasacárido (sombreado en gris) es común a todos los oligosacáridos *N*-enlazados y sirve de base para una gran diversidad de ellos, dos de los cuales están representados aquí: (A) un tipo rico en manosas; (B) un tipo más complejo. En cada caso están representadas las fórmulas químicas detalladas y las estructuras esquemáticas.

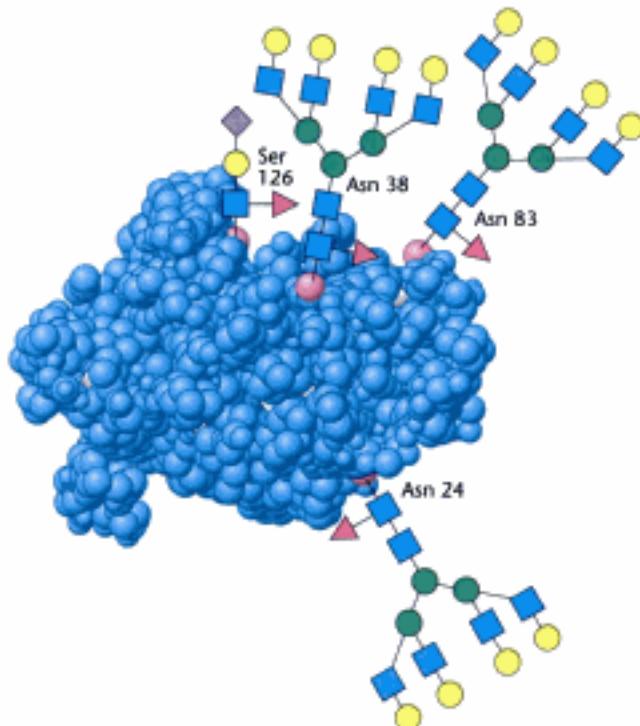


Figura 11.21 Oligosacáridos unidos a la eritropoyetina. La eritropoyetina tiene oligosacáridos unidos a tres residuos de asparagina y uno de serina. Las estructuras están representadas aproximadamente a escala. Para la clave de carbohidratos consultar la página 315. [Tomado de 1BUY.pdf.]

La proteína no glicosilada tiene solamente un 10% de la bioactividad de la forma glicosilada, porque es rápidamente extraída de la sangre por el riñón. La disponibilidad de EPO humana recombinante ha ayudado eficazmente al tratamiento de las anemias. Sin embargo, algunos atletas fraudulentos han utilizado EPO humana recombinante para aumentar el recuento de glóbulos rojos sanguíneos y por tanto la capacidad de transportar oxígeno. Los laboratorios de ensayo de fármacos y drogas son capaces de distinguir en los atletas la EPO recombinante humana prohibida de la EPO natural detectando las diferencias en sus patrones de glicosilación.

La glicosilación de las proteínas tiene lugar en el interior del retículo endoplásmico y en el complejo de Golgi

La glicosilación de las proteínas tiene lugar en el lumen del *retículo endoplásmico* (ER) y en el *complejo de Golgi* (o *aparato de Golgi*), orgánulos que desempeñan papeles importantes en el tráfico de proteínas (Figura 11.22). La proteína la sintetizan los ribosomas adheridos a la cara citoplasmática de la membrana del ER y la cadena peptídica se va introduciendo en la luz del ER (Sección 30.6). La glicosilación *N*-enlazada empieza en el ER y continúa en el complejo de Golgi, mientras que la *O*-enlazada tiene lugar exclusivamente en el complejo de Golgi.

Un oligosacárido muy grande, destinado a unirse al residuo de asparragina de una proteína, se va ensamblando unido al *dolicol fosfato*, una molécula lipídica especializada localizada en la membrana del ER y que contiene unas 20 unidades de isopreno (C_5) (p. 740).

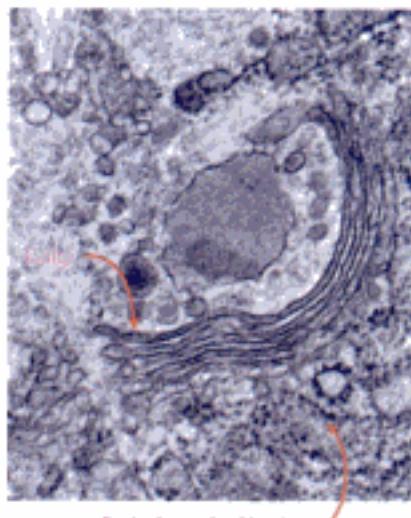
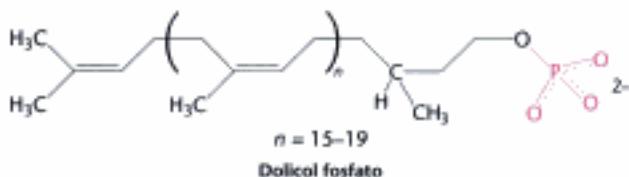
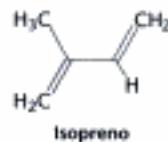


Figura 11.22 El complejo de Golgi y el retículo endoplásmico. La micrografía electrónica muestra el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico adyacente. Los puntos negros sobre la cara citoplasmática de la membrana del ER son ribosomas. [Micrografía cortesía de Lynne Mercer.]



El grupo fosfato terminal es el sitio de unión del oligosacárido activado, el cual se transfiere a continuación en bloque a la asparragina específica de la cadena polipeptídica creciente. Tanto los azúcares activados como el enzima complejo responsable de

la transferencia del oligosacárido a la proteína están localizados en el lado luminal del ER. Por consiguiente, las proteínas citoplasmáticas no se glicosilan siguiendo esta vía.

Las proteínas del lumen del ER y de la membrana del ER son transportadas al complejo Golgi, que es un apilamiento de sacos membranosos aplanados. *Las unidades de carbohidrato de las glicoproteínas se alteran y elaboran en el complejo Golgi.* Allí se insertan las unidades de azúcar O-enlazadas y los azúcares N-unidos, que llegan del ER como componentes de las glicoproteínas y se modifican de modos diversos. El complejo Golgi es el principal centro de distribución de la célula. Las proteínas maduras del Golgi se envían a los lisosomas, a los gránulos secretorios, o a la membrana plasmática, según las señales codificadas en sus secuencias de aminoácidos y sus estructuras tridimensionales (Figura 11.23).

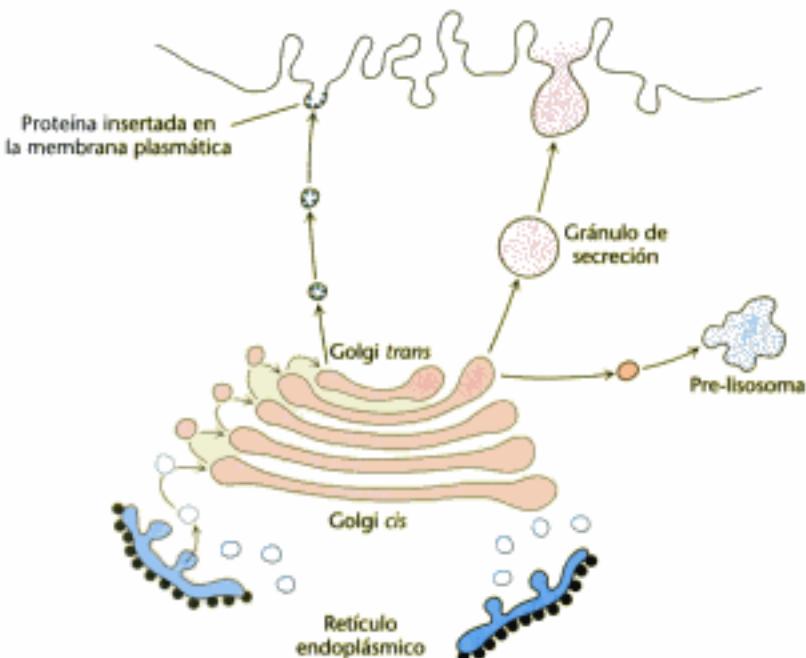


Figura 11.23 El complejo de Golgi como centro de distribución. El complejo de Golgi es el centro de distribución de proteínas hacia los lisosomas, las vesículas de secreción o la membrana plasmática. La cara cis del complejo recibe las vesículas procedentes del ER y la cara trans envía las vesículas hacia sus dianas respectivas. Las vesículas también transfieren las proteínas de un compartimiento del Golgi a otro. [Cortesía de la Dra. Marilyn Farquhar.]

Los errores en la glicosilación pueden ocasionar situaciones patológicas

↑ Aunque en muchos casos aun no se conoce con detalle a función de la unión de los carbohidratos a las proteínas, los datos indican que la unión de estos carbohidratos es importante para la maduración, la estabilidad y el envío de estas proteínas a su destino. Por ejemplo, en el ser humano, la unión de un carbohidrato estabiliza un conducto particular de potasio (una proteína que permite el flujo regulado de iones potasio a través de la membrana celular; p. 364) evitando su degradación. Ciertos tipos de distrofia muscular pueden descubrirse por la glicosilación inadecuada de las proteínas de membrana. De hecho, se ha identificado una familia completa de graves enfermedades humanas hereditarias, llamadas *anomalías congénitas de la glicosilación*. Estas situaciones patológicas revelan la importancia de la adecuada modificación de las proteínas por los carbohidratos y sus derivados.

Un ejemplo especialmente claro del papel de la glicosilación surgió de los análisis de la *enfermedad celular I* (también llamada *mucolipidosis II*), una anomalía en el almacenamiento lisosómico. Los lisosomas son orgánulos que degradan y reciclan los componentes celulares dañados o los materiales introducidos en la célula por endocitosis. Un carbohidrato marcador dirige a ciertos enzimas degradativos desde el complejo Golgi hacia los lisosomas. Los pacientes con la enfermedad celular I sufren un grave retraso psicomotor y presentan deformaciones esqueléticas. Sus lisosomas

contienen grandes *inclusiones* de glicosaminoglicanos y glicolípidos sin digerir (p. 331); de ahí la “T” en el nombre de la enfermedad. Estas inclusiones están presentes porque en los lisosomas afectados faltan las hidrolasas ácidas necesarias para la degradación de esos compuestos. Por el contrario, niveles muy elevados de estos enzimas se detectan en sangre y orina. Así pues, los enzimas activos se sintetizan pero se secretan en vez de ser secuestrados por los lisosomas. En otras palabras, *en la enfermedad celular I, una serie completa de enzimas se envía de forma incorrecta y se libera en un lugar equivocado*. Normalmente estos enzimas contienen una manosa 6-fosfato, pero en la enfermedad celular I la manosa enlazada está sin modificar (Figura 11.24). *De hecho, la manosa 6-fosfato es el marcador que normalmente envía a muchos enzimas hidrolíticos desde el Golgi hacia los lisosomas. Los pacientes con la enfermedad celular I son deficientes en la fosfotransferasa que cataliza la primera etapa en la adición del grupo fosforilo; la consecuencia es el envío de ocho enzimas esenciales a destinos equivocados.* Paradójicamente, la incapacidad de glicosilar correctamente a una serie de enzimas da como resultado la acumulación de carbohidratos complejos, los glicosaminoglicanos, lo que ocasiona una situación patológica.

Los oligosacáridos pueden “secuenciarse”

¿Cómo es posible determinar la estructura de una glicoproteína: las estructuras de los oligosacáridos y sus puntos de anclaje? La mayoría de los planteamientos se basan en el uso de enzimas que escinden los oligosacáridos a nivel de enlaces específicos.

La primera etapa consiste en separar el oligosacárido de la proteína. Así, por ejemplo, los oligosacáridos *N*-enlazados pueden liberarse de las proteínas por acción de un enzima como la péptido *N*-glicosidasa F, que rompe el enlace *N*-glicosídico de estos compuestos. Entonces los oligosacáridos pueden aislarse y analizarse. Mediante el uso de MALDI-TOF u otra técnica de espectrometría de masas (Sección 3.5) puede medirse la masa del fragmento oligosacárido. Sin embargo, debido al gran número de combinaciones posibles de monosacáridos, muchas estructuras de oligosacáridos son compatibles con una determinada masa. Se puede obtener una información más completa rompiendo el oligosacárido con enzimas de diferente especificidad. Así, por ejemplo, la β -1,4-galactosidasa corta los enlaces β -glicosídicos exclusivamente a nivel de la galactosa. Los productos resultantes pueden analizarse de nuevo por espectrometría de masas (Figura 11.25). La repetición de este proceso utilizando otros enzimas de especificidades distintas podrá desvelar la estructura del oligosacárido.

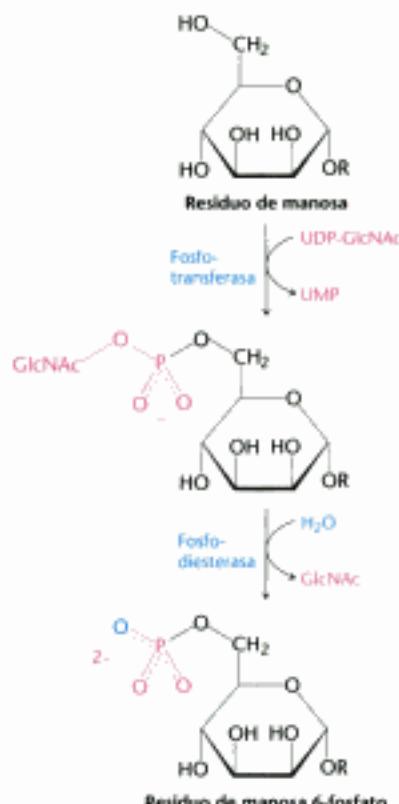


Figura 11.24 Formación de un marcador de manosa 6-fosfato. Una glicoproteína destinada a liberarse en los lisosomas adquiere un fosfato marcador en el compartimiento Golgi, mediante un proceso en dos etapas. Primero, una fosfotransferasa añade una unidad de fosfo-*N*-acetilglucosamina al grupo 6-OH de una manosa, y después una fosfodiesterasa arranca el azúcar añadido para generar un residuo manosa 6-fosfato en el oligosacárido nuclear.

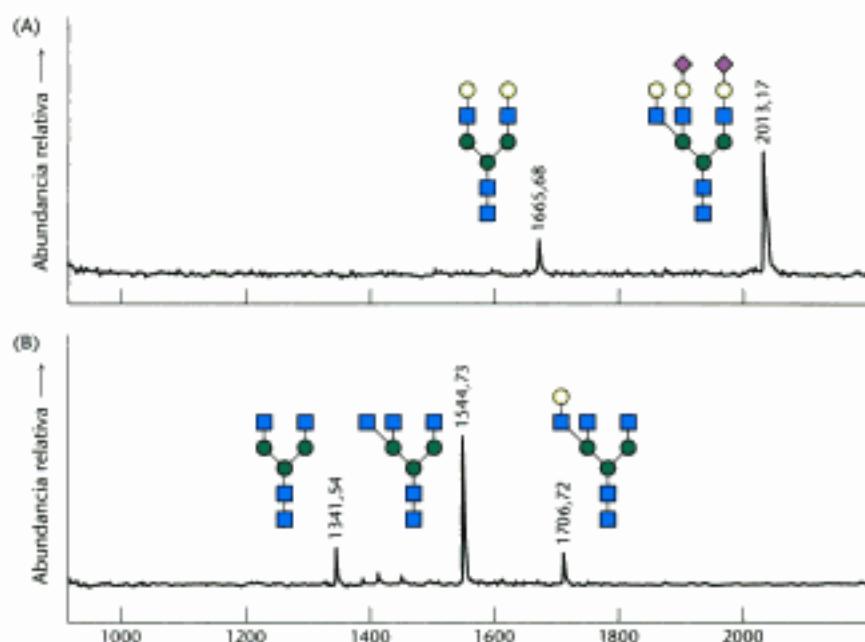


Figura 11.25 “Secuenciación” de oligosacáridos mediante espectrometría de masas. Se utilizaron enzimas que escinden carbohidratos para liberar y cortar de forma específica el componente oligosacárido de la glicoproteína fetuina procedente de suero bovino. Las partes A y B muestran las masas obtenidas con la espectrometría MALDI-TOF, así como las estructuras correspondientes de los productos de la digestión del oligosacárido (utilizando el mismo esquema que en la figura 11.18): (A) digestión con péptido *N*-glicosidasa F (para liberar el oligosacárido de la proteína) y con neuramidasa; (B) digestión con péptido *N*-glicosidasa F, neuramidasa y β -1,4-galactosidasa. El conocimiento de las especificidades enzimáticas y de las masas de los productos permite caracterizar al oligosacárido. Para ver la clave de carbohidratos consultar la página 315. [Tomado de A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart y J. Marth (Eds.) *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) p. 596.]

Los puntos de anclaje del oligosacárido en la glicoproteína pueden determinarse utilizando proteasas. Cortando una proteína por aplicación de proteasas específicas se obtiene un patrón característico de fragmentos peptídicos que se pueden analizar por cromatografía. Las propiedades cromatográficas de los péptidos unidos a oligosacáridos se modificarán por el tratamiento con la glicosidasa. El análisis por espectrometría de masas o la secuenciación directa del péptido podrá revelar la identidad del péptido en cuestión y, con un esfuerzo adicional, el sitio exacto de anclaje del oligosacárido.

La glicosilación aumenta enormemente la complejidad del proteoma. Una proteína determinada con varios sitios susceptibles de glicosilación puede presentar formas glicosiladas muy diferentes (a veces denominadas *glicoformas*), cada una de las cuales puede generarse en un tipo específico de célula o en diferentes etapas del desarrollo. Ahora que se está completando la secuenciación del genoma humano se empieza a comprender la caracterización del proteoma, mucho más complejo, incluyendo las funciones biológicas de proteínas modificadas específicamente.

11.4 Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos específicos

La diversidad y complejidad de las unidades de carbohidrato de las glicoproteínas sugiere que aquéllos deben ser funcionalmente importantes. La naturaleza no construye patrones complejos cuando son suficientes otros más simples. La celulosa y el almidón, por ejemplo, están formados únicamente por unidades de glucosa. Por el contrario, las glicoproteínas contienen múltiples tipos de residuos unidos por diferentes tipos de enlaces glicosídicos. *Es posible un número enorme de patrones en la composición y estructura de los azúcares de superficie porque (1) pueden unirse diferentes monosacáridos uno a otro mediante distintos grupos OH, (2) la unión de C-1 puede tener configuración α o β, y (3) es posible una amplia ramificación.* De hecho, *con cuatro azúcares se pueden formar muchos más oligosacáridos diferentes que polipéptidos se podrían formar con cuatro aminoácidos.*

¿Por qué tanta complicación y diversidad? Está resultando evidente que los carbohidratos son moléculas ricas en información que dirigen muchos procesos biológicos. Las diversas estructuras de los carbohidratos expuestas en las superficies celulares resultan muy adecuadas como puntos de interacción entre las células y su entorno. Unas proteínas llamadas *lectinas* (del latín “*legere*”, leer o seleccionar) son los socios que se unen a estructuras específicas de carbohidratos en las superficies de células opuestas. Las lectinas son omnipresentes: se encuentran en animales, plantas y microorganismos.

Las lectinas propician interacciones entre las células

La función principal de las lectinas es facilitar el contacto intercelular. Cada lectina contiene normalmente dos o más sitios de unión para los carbohidratos. Los sitios de unión de lectinas situadas en la superficie de una célula interactúan con un conjunto de carbohidratos desplegados sobre la superficie de otra célula. Las lectinas y los carbohidratos se unen por algunas interacciones débiles que aseguran la especificidad, puesto que permiten la separación cuando resulta necesario. Las interacciones entre una superficie celular con carbohidratos y otra con lectinas recuerda la acción de *Velcro*; cada interacción es relativamente débil pero el conjunto es fuerte.

Las lectinas pueden clasificarse sobre la base de sus secuencias de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas. Una clase numerosa es la de tipo C (C por requerir calcio) encontrada en animales. Esas lectinas tienen en común un dominio homólogo de 120 aminoácidos responsable de su unión a los carbohidratos. En la figura 11.26 se representa la estructura de uno de tales dominios unido al carbohidrato diana.

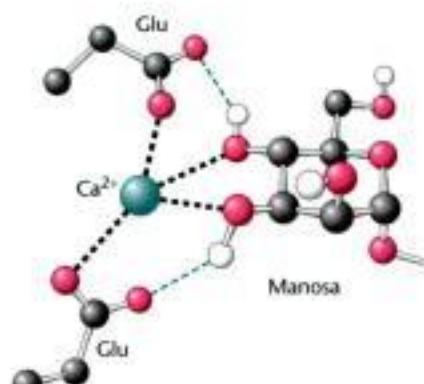
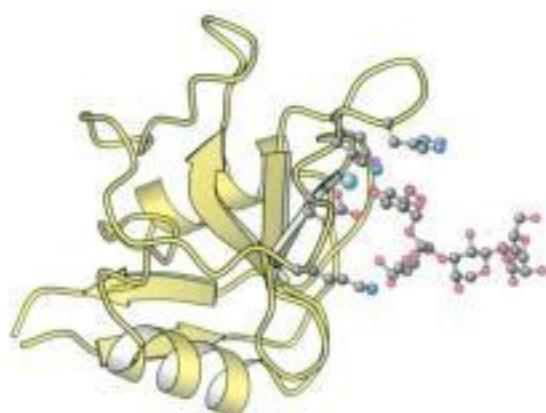


Figura 11.26 Estructura de un dominio tipo C de unión al carbohidrato de una lectina animal. Obsérvese que un ion calcio une un residuo de manosa a la lectina. Se representan las interacciones seleccionadas, omitiendo, por claridad, algunos átomos de hidrógeno.

Un ion calcio de la proteína actúa como un puente entre la proteína y el azúcar por medio de interacciones directas con los grupos hidroxilo del azúcar. Además, dos residuos glutamato de la proteína se unen a la vez con el ion calcio y el azúcar, mientras que otras cadenas laterales de la proteína forman puentes de hidrógeno con otros grupos hidroxilo del carbohidrato. Los cambios en los aminoácidos que interaccionan con el azúcar alteran la especificidad de unión a carbohidratos de las lectinas.

Las selectinas son miembros de la familia del tipo C. Las selectinas se unen a las células del sistema inmune en los sitios de lesión en la respuesta inflamatoria (figura 11.27). Las formas L, E y P de las selectinas se unen de forma específica a los carbohidratos de los vasos de los nódulos linfáticos, endotelio o plaquetas sanguíneas activadas, respectivamente. Del conocimiento más profundo de cómo las selectinas se unen y distinguen a los diferentes carbohidratos pueden surgir nuevos agentes terapéuticos para controlar la inflamación. Originariamente se pensó que la L-selectina sólo participaba en la respuesta inmune, pero después se observó que el embrión también la produce cuando está a punto para implantarse en el endometrio del útero materno. Durante un corto período de tiempo, las células del endometrio presentan un oligosacárido en la superficie celular. Cuando el embrión se une mediante lectinas, esta unión activa las vías señal del endometrio que hacen posible la implantación del embrión.

Las plantas también son ricas en lectinas. Aunque el papel exacto de las lectinas en las plantas no está claro, se cree que pueden servir como insecticidas potentes. Las especificidades de unión de las lectinas de las plantas han sido bien caracterizadas (Figura 11.28). Las bacterias también contienen lectinas, por ejemplo, *Escherichia coli* es capaz de adherirse a las células epiteliales del tubo digestivo ya que las lectinas de su superficie reconocen las unidades de oligosacárido de la superficie de las células intestinales diana. Estas lectinas están localizadas en unos apéndices delgados parecidos a pelos, llamados *fimbrias* (*pili*).

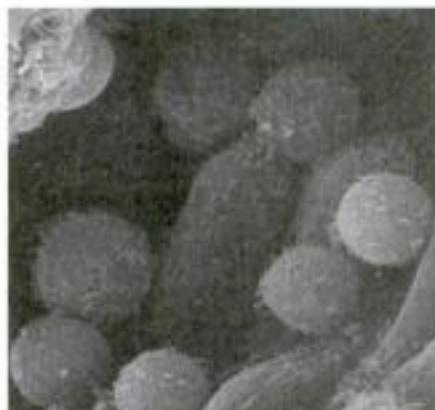


Figura 11.27 La selectinas intervienen en las interacciones célula-célula. La micrografía electrónica de barrido muestra linfocitos adheridos al revestimiento endotelial de un nódulo linfático. Las selectinas L de la superficie del linfocito se unen específicamente a los carbohidratos del revestimiento de los vasos del nódulo linfático. [Cortesía del Dr. Eugene Butcher.]

GlcNAc β -1,4 GlcNAc β -1,4 GlcNAc	Gal β -1,3 GalNAc	Gal β -1,4 GlcNAc β -1,6 Man β -1,2
Se une a la aglutinina del germen de trigo	Se une a la lectina del cacahuete	Se une a la fitohemaglutinina

Figura 11.28 Selectividades de unión de las lectinas vegetales. Las lectinas de plantas, aglutinina del germe de trigo, lectina del cacahuete y fitohemaglutinina, reconocen a oligosacáridos diferentes.

El virus de la gripe se une a residuos de ácido siálico

Algunos virus consiguen entrar en las células hospedadoras específicas porque se adhieren a los carbohidratos de la superficie celular. Así, por ejemplo, el virus de la gripe reconoce a los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas de las superficies celulares. La proteína vírica que se une a esos azúcares se denomina *hemaglutinina* (Figura 11.29).

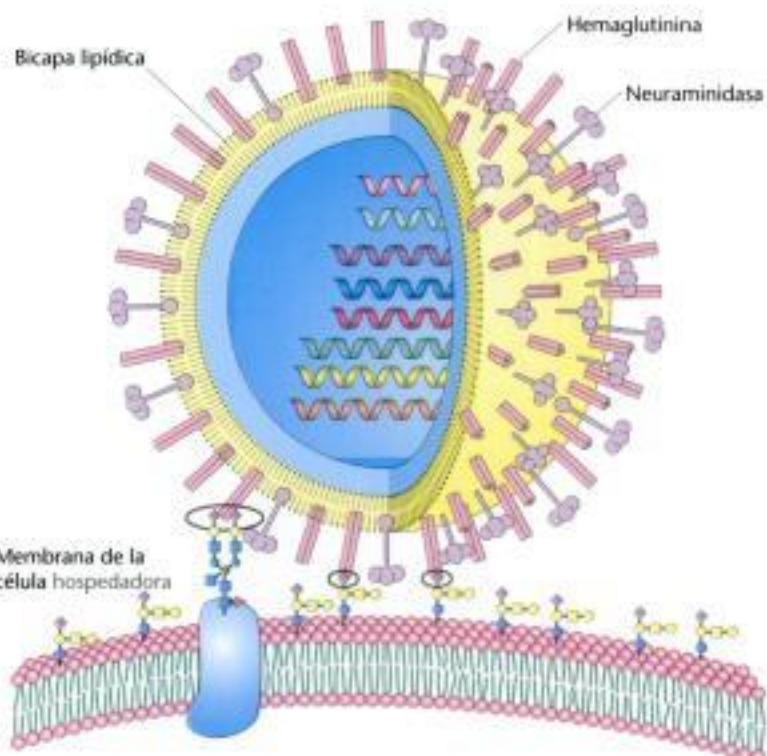


Figura 11.29 Receptores víricos. El virus de la gripe alcanza las células uniéndose a los residuos de ácido sálico (diamantes púrpura) localizados en el extremo de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas de la superficie celular. Estos carbohidratos quedan unidos por la hemaglutinina (círculos de interacción), una de las principales proteínas expresadas en la superficie del virus. La otra proteína importante en la superficie del virus, la neuramidasa, es un enzima que corta las cadenas de oligosacáridos para liberar la partícula vírica en un estadio posterior del ciclo vital del virus.

Después de que han tenido lugar estas interacciones y el virus se ha introducido en la célula, otra proteína vírica, la neuramidasa (sialidasa), rompe los enlaces glicosídicos con los residuos de ácido sálico, liberando al virus para que infecte a la célula. Los inhibidores de este enzima, tales como oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza), son importantes agentes antigripales.

Resumen

11.1 Los monosacáridos son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo

Las aldosas son carbohidratos con un grupo aldehído (tales como el gliceraldehído o la glucosa), mientras que las cetosas contienen un grupo ceto (como la dihidroxiacetona o la fructosa). Un azúcar pertenece a la serie D si la configuración absoluta de su carbono asimétrico, más alejado del grupo aldehído o cетона, es la misma que la del D-gliceraldehído. La mayoría de los azúcares presentes en la naturaleza pertenecen a la serie D. El grupo aldehído del C-1 en la forma de cadena abierta de la glucosa reacciona con el grupo hidroxilo del C-5 formando un anillo piranósico de seis miembros. El grupo ceto del C-2 de la forma abierta de la fructosa reacciona con el hidroxilo del C-5 para formar un anillo furánosico de cinco miembros. Las pentosas, tales como la ribosa y desoxirribosa, también forman anillos furánosicos. En estas ciclaciones se crea un centro asimétrico adicional en el carbono anomérico (C-1 en las aldosas y C-2 en las cetosas). En el anómero α , el grupo hidroxilo unido al carbono anomérico queda en el lado opuesto del anillo al que ocupa el grupo CH_2OH , mientras que ocupa el mismo lado en el anómero β . No todos los átomos del anillo están situados en el mismo plano, sino que los anillos piranósicos adoptan normalmente la conformación de silla y los furánosicos, la de sobre abierto. Los azúcares se unen a alcoholos y a aminas mediante enlaces glicosídicos a nivel de su carbono anomérico. Así, por ejemplo, los azúcares se enlanzan con purinas y pirimidinas, mediante enlaces N-glicosídicos, en el RNA y el DNA.

En los disacáridos y polisacáridos los azúcares se unen, uno a otro, mediante enlaces *O*-glicosídicos. Los disacáridos más comunes son: la sacarosa, la lactosa y la maltosa. La sacarosa (el azúcar común de mesa), obtenida de la caña o remolacha, consta de una α -glucosa y una β -fructosa, unidas mediante un enlace glicosídico entre sus dos carbonos anoméricos. La lactosa (de la leche) está constituida por una galactosa unida a una glucosa mediante un enlace β -1,4. La maltosa (del almidón) consta de dos glucosas unidas por un enlace α -1,4. El almidón es una forma polimérica de la glucosa presente en las plantas y el glucógeno ejerce un papel semejante en los animales. La mayoría de las unidades de glucosa del almidón y del glucógeno tienen uniones α -1,4. El glucógeno presenta más puntos de ramificación que el almidón, formados por enlaces α -1,6, lo cual lo hace más soluble. La celulosa, el principal polímero estructural de las paredes celulares de las plantas, consta de unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4. Estos enlaces β originan largas cadenas rectas que forman fibrillas, con elevada fuerza tensil. Por el contrario, los enlaces α del almidón y glucógeno generan hélices abiertas, en consonancia con su función de almacenes de energía movilizable. Las superficies celulares y las matrices extracelulares de los animales contienen polímeros, de disacáridos repetitivos, llamados glicosaminoglicanos. En cada repetición, una de las dos subunidades es un derivado de la glucosamina o de la galactosamina. Estos carbohidratos altamente aniónicos tienen una elevada densidad de grupos carboxilato o sulfato. Las proteínas que poseen glicosaminoglicanos unidos covalentemente se denominan proteoglicanos.

11.3 Los carbohidratos pueden unirse a proteínas para formar glicoproteínas

Unos enzimas específicos enlazan unidades de oligosacárido a las proteínas, o bien al átomo de oxígeno de las cadenas laterales de serina o treonina o bien al átomo de nitrógeno amídico de las cadenas laterales de aspárragina. La glicosilación de las proteínas tiene lugar en el lumen del retículo endoplasmático. Los oligosacáridos *N*-enlazados se sintetizan sobre dolicol fosfato y a continuación se transfieren al acceptor proteico. Otros azúcares adicionales se agregan en el complejo de Golgi según pautas determinadas.

11.4 Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos específicos

Las lectinas, pueden reconocer a los carbohidratos de la superficie celular. En los animales la interacción de las lectinas con sus azúcares-diana dirige los contactos célula a célula. La proteína vírica hemaglutinina de la superficie del virus de la gripe reconoce a los residuos de ácido siálico de las células a las que invade el virus. Un número escaso de residuos de carbohidrato pueden unirse de formas muy diferentes originando gran diversidad de patrones diferenciables por los dominios de las lectinas de los receptores proteicos.

Términos clave

monosacárido (p. 304)	piranosa (p. 306)	celulosa (p. 312)
triosa (p. 304)	hemicetal (p. 306)	glicosaminoglicano (p. 312)
cetosa (p. 304)	furanosa (p. 307)	proteoglicano (p. 312)
aldosa (p. 304)	anómero (p. 307)	glicosiltransferasa (p. 314)
enantiómero (p. 304)	enlace glicosídico (p. 309)	glicoproteína (p. 316)
tetrosa (p. 304)	azúcar reductor (p. 309)	retículo endoplasmático (p. 317)
pentosa (p. 304)	azúcar no reductor (p. 309)	complejo de Golgi (p. 317)
hexosa (p. 304)	oligosacárido (p. 310)	lisosoma (p. 318)
heptosa (p. 304)	disacárido (p. 310)	glicoforma (p. 318)
diastereoisómero (p. 305)	polisacárido (p. 311)	lectina (p. 320)
epímero (p. 305)	glucógeno (p. 311)	selectina (p. 321)
hemiacetal (p. 306)	almidón (p. 311)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Sharon, N. y Lis, H., 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268(1): 82-89.
- Lasky, L. A., 1992. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969.
- Weiss, P. y Ashwell, G., 1989. The asialoglycoprotein receptor: Properties and modulation by ligand. *Prog. Clin. Biol. Res.* 300: 169-184.
- Paulson, J. C., 1989. Glycoproteins: What are the sugar side chains for? *Trends Biochem. Sci.* 14: 272-276.
- Woods, R. J., 1995. Three-dimensional structures of oligosaccharides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 591-598.

Libros

- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. y Marth, J., 1999. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fukuda, M. y Hindsgaul, O., 2000. *Molecular Glycobiology*. IRL Press at Oxford University Press.
- El Khadem, H. S., 1988. *Carbohydrate Chemistry*. Academic Press.
- Ginsburg, V. y Robbins, P. W. (Eds.), 1981. *Biology of Carbohydrates* (vols. 1-3). Wiley.
- Fukuda, M. (Ed.), 1992. *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development*. CRC Press.
- Preiss, J. (Ed.), 1988. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise: Carbohydrates*. Academic Press.

Proteínas y glicoproteínas que enlazan carbohidratos

- Yan, A. y Lemnaru, W. J., 2005. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121-3124.
- Qasha, P. K., Ramakrishnan, B. y Boegeman, E., 2005. Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 30: 53-62.
- Pratta, M. A., Yao, W., Decicco, C., Tortorella, M., Lin, R.-Q., Copeland, R. A., Magolda, R., Newton, R. C., Trzaskos, J. M. y Amer, E. C., 2003. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 278: 45539-45545.
- Fisher, J. W., 2003. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* 228: 1-14.
- Ünaligil, U. y Rini, J. M., 2000. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 510-517.
- Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., Egrie, J. y Harvey, T. S., 1998. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat. Struct. Biol.* 5: 861-866.
- Bouckaert, J., Hamelryck, T., Wyns, L. y Loris, R., 1999. Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 572-577.

Weis, W. I. y Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473.

Vyas, N. K., 1991. Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 732-740.

Weis, W. I., Drickamer, K. y Hendrickson, W. A., 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360: 127-134.

Wright, C. S., 1992. Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex: Structural basis for cooperative lectin-cell binding. *J. Biol. Chem.* 267: 14345-14352.

Shaanan, B., Lis, H. y Sharon, N., 1991. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. *Science* 254: 862-866.

Glicoproteínas

Bernfield, M., Göte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. y Zako, M., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 729-777.

Iozzo, R. V., 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 609-652.

Yanagishita, M. y Hascall, V. C., 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267: 9451-9454.

Iozzo, R. V., 1999. The biology of small leucine-rich proteoglycans: Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 18843-18846.

Los carbohidratos en los procesos de reconocimiento

Weis, W. I., 1997. Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 624-630.

Sharon, N. y Lis, H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227-234.

Turner, M. L., 1992. Cell adhesion molecules: A unifying approach to topographic biology. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67: 359-377.

Feizi, T., 1992. Blood group-related oligosaccharides are ligands in cell-adhesion events. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 274-278.

Jessell, T. M., Hynes, M. A. y Dodd, J., 1990. Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 227-255.

Clothia, C. y Jones, E. V., 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 823-862.

Secuenciación de carbohidratos

Venkataraman, G., Shriner, Z., Raman, R. y Sasisekharan, R., 1999. Sequencing complex polysaccharides. *Science* 286: 537-542.

Zhao, Y., Kent, S. B. H. y Chait, B. T., 1997. Rapid, sensitive structure analysis of oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1629-1633.

Rudd, P. M., Guile, G. R., Küster, B., Harvey, D. J., Opdenakker, G. y Dwek, R. A., 1997. Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* 388: 205-207.

Problemas

1. *Origen del término.* Explicar el origen de la palabra *carbohidrato*.
2. *Diversidad.* ¿Cuántos oligosacáridos distintos podrían hacerse uniendo una glucosa, una manosa y una galactosa? Suponer que los tres azúcares están en forma piránosica. Comparar este número con el número de triptípicos que podrían hacerse con tres aminoácidos distintos.
3. *Parejas.* Indicar si cada uno de los siguientes pares de azúcares son entre sí: anómeros, epimeros o parejas aldosa-cetosa.

- (a) D-gliceraldehído y D-dihidroxiacetona
- (b) D-glucosa y D-manoza
- (c) D-glucosa y D-fructosa
- (d) α -D-glucosa y β -D-glucosa
- (e) D-ribosa y D-ribulosa
- (f) D-galactosa y D-glucosa

4. *Mutarrotación.* Las rotaciones específicas de los anómeros α y β de la glucosa son respectivamente 112 y 18.7 grados. La rotación específica $[\alpha]_D$ se define como la rotación observada en la luz de ion-

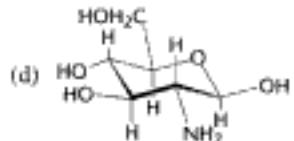
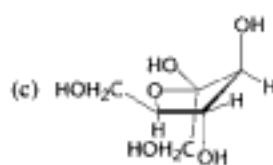
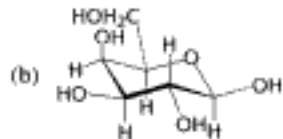
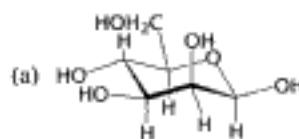
gitud de onda de 589 nm (la línea D de la lámpara de sodio) cuando atraviesa 10 cm de una disolución de la muestra a la concentración de 1 g ml⁻¹. Cuando una muestra cristalina de α -D-glucopiranosa se disuelve en agua, la rotación específica desciende desde 112 grados hasta un valor de equilibrio de 52.7 grados. Sobre la base de este resultado, averiguar las proporciones de los anómeros α y β en el equilibrio. Suponer que la proporción de la forma abierta es despreciable.

5. *Marcador revelador*. La glucosa reacciona lentamente con la hemoglobina y otras proteínas para formar compuestos covalentes. ¿Por qué la glucosa es reactiva? ¿Cuál es la naturaleza del aducto que se forma?

6. *Escisión con periyodato*. Los compuestos que contienen grupos hidroxilo en carbonos adyacentes sufren una escisión en el enlace C-C cuando se tratan con periyodato (IO_4^-). ¿Cómo podría utilizarse esta reacción para diferenciar los compuestos piranósicos de los furanósicos?

7. *Procedencia del oxígeno*. ¿De quién procede el átomo de oxígeno unido al C-1 en el metil- α -D-glucopiranósido: de la glucosa o del metanol?

8. *Identidad de los azúcares*. Identificar los cuatro azúcares siguientes.



9. *Pegamento celular*. Se postula que una unidad de trisacárido de una glicoproteína de la superficie celular desempeña un papel crítico como mediadora en la adherencia intercelular de un determinado tejido. Diseñar un experimento sencillo para probar esta hipótesis.

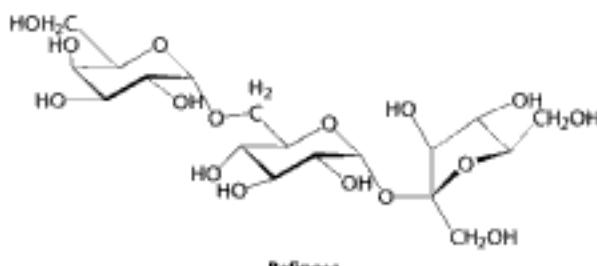
10. *Cartografía de la molécula*. Cada uno de los grupos hidroxilo de la glucosa puede metilarse utilizando reactivos como el dimetilsulfato en medio básico. Explicar cómo la metilación exhaustiva seguida de una digestión completa de una cantidad conocida de glucógeno nos permitiría determinar el número de puntos de ramificación y los extremos reductores.

11. *Partes componentes*. La rafinosa es un trisacárido y un componente minoritario de la remolacha azucarera.

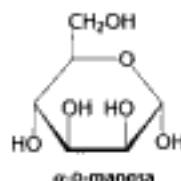
(a) La rafinosa, ¿es un azúcar reductor? Explíquelo.

(b) ¿Cuáles son los monosacáridos que la componen?

(c) La β -galactosidasa es un enzima que arranca residuos de galactosa de un oligosacárido. ¿Cuáles son los productos que se obtienen al tratar la rafinosa con β -galactosidasa?



12. *Diferencias entre anómeros*. La α -D-manosa es un azúcar de sabor dulce. La β -D-manosa, en cambio, sabe a amargo. Una disolución de α -D-manosa pura pierde su sabor dulce con el tiempo a medida que se convierte en el anómero β . Representar el anómero β y explicar cómo se forma a partir de α .



13. *Sabor de la miel*. La fructosa en su forma β -D-piranósica explica el potente dulzor de la miel. La forma β -D-furanósica, aunque es dulce, no es tan dulce como la piranósica; en cambio, es la forma más estable. Representar ambas formas y explicar por qué puede no resultar prudente cocinar con miel.

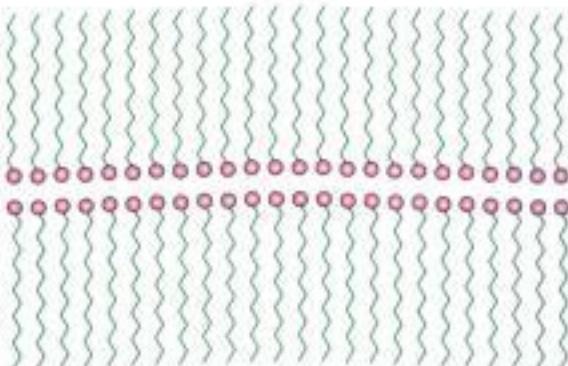
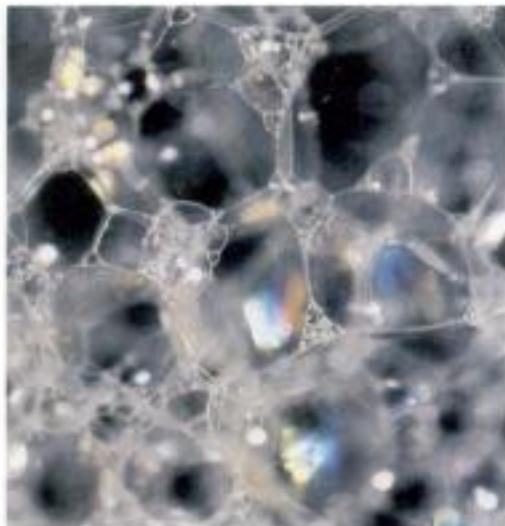
14. *Encontrar los extremos*. (a) Comparar el número de extremos reductores y no reductores de la molécula de glucógeno. (b) Tal como se verá en el Capítulo 21, el glucógeno es una forma importante de almacenamiento de combustible que puede ser movilizada con rapidez. ¿En qué extremo (reductor o no reductor) se espera que tenga lugar la mayor parte del metabolismo?

15. *Carbohidratos y proteómica*. Suponer que una proteína posee seis sitios posibles de N-glicosilación. ¿Cuántas proteínas diferentes se podrían generar, según cuáles sean los sitios realmente glicosilados? No incluir los efectos debidos a la diversidad de los posibles carbohidratos añadidos.

Problema de integración del capítulo

16. *Estereoespecificidad*. La sacarosa, el principal producto de la fotosíntesis en las hojas verdes, se sintetiza por acción de una batería de enzimas. Los sustratos para la síntesis de sacarosa, la D-glucosa y la D-fructosa, están formados por una mezcla de anómeros α y β , así como de compuestos acíclicos, en disolución. No obstante, la sacarosa consta de α -D-glucosa unida por su C-1 al C-2 de la β -D-fructosa. ¿Cómo puede explicarse la especificidad de la sacarosa a la luz de sus posibles sustratos?

Lípidos y membranas celulares



La superficie de una pompa de jabón es una bicapa formada por moléculas de detergente. Las cabezas polares (en rojo) se empaquetan agrupándose y posicionan a los grupos hidrofóbicos (en verde) ocupando el interior y exterior de la burbuja, en contacto con el aire. Otro tipo de estructuras en bicapa límita las células. [(Izquierda) Photonica.]

Contenido

- 12.1 Los ácidos grasos son componentes clave de los lípidos
- 12.2 En las membranas hay tres tipos principales de lípidos
- 12.3 Los fosfolípidos y glicolípidos forman fácilmente bicapas en medios acuosos
- 12.4 Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos que tienen lugar en las membranas
- 12.5 Los lípidos y muchas proteínas difunden rápidamente en el plano de la membrana
- 12.6 Las células eucarióticas contienen compartimentos delimitados por membranas internas

Los límites de las células están constituidos por las *membranas biológicas*, las barreras que definen *el interior y el exterior de una célula* (Figura 12.1). Estas barreras evitan que se liberen al exterior las moléculas generadas en el interior de la célula y que entren moléculas no deseadas; eso sí, poseen sistemas de transporte que permiten tomar del exterior moléculas específicas y desechar compuestos no deseados. Estos sistemas de transporte proporcionan a las membranas una propiedad importante: *la permeabilidad selectiva*.

Las membranas son estructuras dinámicas en las que las proteínas flotan en un mar de lípidos. Los componentes lipídicos de la membrana constituyen la barrera de permeabilidad, mientras que las proteínas funcionan como sistemas de transporte que, bien actuando como conductos o como bombas, proporcionan a la membrana su capacidad de permeabilidad selectiva. Estos sistemas de transporte se describirán en el próximo capítulo.

Además de la membrana externa (llamada *membrana plasmática*), las células eucarióticas contienen también unas membranas internas que delimitan orgánulos como las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y lisosomas. En el transcurso de la evolución la especialización funcional se ha relacionado estrechamente con la formación de estos compartimientos. Se han desarrollado sistemas específicos que permiten dirigir determinadas proteínas hacia o a través de membranas internas y, por tanto, a orgánulos específicos. Las membranas internas y externas tienen características comunes que son objeto de estudio en este capítulo.

Las membranas biológicas realizan muchas funciones importantes para la vida, como el almacenamiento de energía y la transmisión de la información, que se realizan por medio de las proteínas asociadas a las membranas. En este capítulo exa-

minaremos las propiedades generales de las proteínas de membrana, describiremos cómo pueden residir en un entorno hidrofóbico de la membrana y a la vez conectar dos entornos hidrofilicos; postergaremos la discusión de la función de estas proteínas para capítulos posteriores.

Las diversas membranas biológicas tienen una serie de características comunes

Las membranas difieren en su estructura como lo hacen en sus funciones. Sin embargo, tienen en común un cierto número de propiedades importantes:

1. Las membranas son *estructuras laminares*, de sólo dos moléculas de grosor, que forman *espacios cerrados* entre compartimientos distintos. El grosor de la mayoría de las membranas está comprendido entre 60 y 100 Å (6 y 10 nm).
2. Las membranas constan principalmente de *lípidos* y *proteínas*. La relación de pesos de proteína a lípido en la mayoría de las membranas biológicas abarca desde 1:4 a 4:1. Las membranas también contienen *hidratos de carbono* enlazados a lípidos y a proteínas.
3. Los lípidos de membrana son moléculas relativamente pequeñas que tienen una parte *hidrofílica* y otra *hidrofóbica*. En medios acuosos, estos lípidos forman espontáneamente *láminas bimoleculares cerradas*. Estas *bicapas lipídicas* constituyen obstáculos al flujo de las moléculas polares.
4. *Ciertas proteínas específicas son mediadoras de funciones características de las membranas*. Las proteínas se utilizan como bombas, conductos, receptores, transductores de energía y enzimas. Las proteínas de membrana están intercaladas en las bicapas lipídicas, las cuales crean un ambiente adecuado para la acción de estas proteínas.
5. Las membranas constituyen *asociaciones no covalentes*. Las moléculas proteicas y lipídicas integrantes se mantienen juntas por efecto de muchas interacciones no covalentes, de carácter cooperativo.
6. Las membranas son *asimétricas*. Las caras interna y externa son diferentes.
7. Las membranas son *estructuras fluidas*. Las moléculas de lípidos difunden rápidamente en el plano de la membrana, al igual que lo hacen las proteínas, a menos que estén ancladas por interacciones específicas. Por el contrario, estos lípidos no se translocan de un lado a otro de la membrana. En realidad, se puede considerar a las membranas como *disoluciones bidimensionales de proteínas y lípidos orientados*.
8. La mayoría de las membranas están *polarizadas eléctricamente* con carga negativa en el interior (normalmente, -60 milivoltios). El potencial de membrana desempeña un papel clave en el transporte, en la conversión de energía y en la excitabilidad (capítulo 13).

12.1 Los ácidos grasos son componentes clave de los lípidos

Las propiedades hidrofóbicas de los lípidos son esenciales de cara a su capacidad para formar membranas. La mayoría de los lípidos deben sus propiedades hidrofóbicas a uno de sus componentes, sus ácidos grasos.

Los nombres de los ácidos grasos se basan en el de sus hidrocarbonos parentales

Los *ácidos grasos* constan de cadenas hidrocarbonadas de longitud y grado de insaturación variables, que terminan en grupos carboxilo. El nombre sistemático de un ácido graso se deriva del nombre de su hidrocarburo parental, sustituyendo la terminación *o* por *oico*. Por ejemplo, al ácido graso saturado C₁₈ se le denomina *ácido octadecanoico* porque su hidrocarburo de origen es el octadecano. A un ácido graso C₁₈ con un doble enlace se le llama *ácido octadecenoico*; con dos dobles enlaces oc-

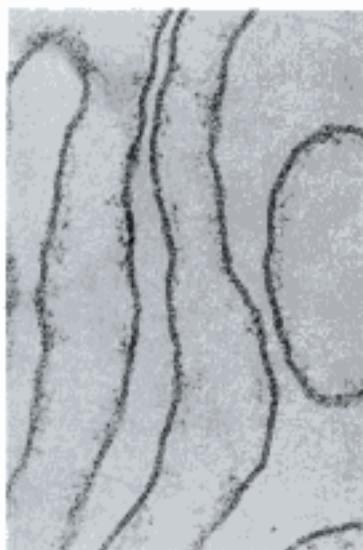
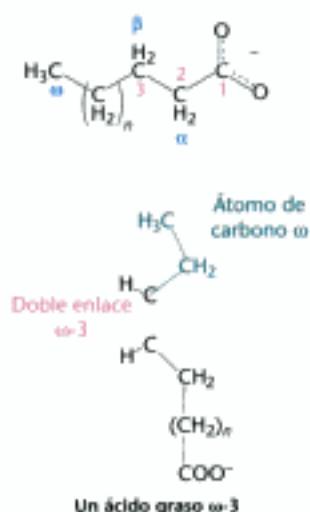


Figura 12.1 Membrana plasmática de eritrocito. Micrografía electrónica de una preparación de membranas plasmáticas de glóbulos rojos. Las membranas se ven "de perfil", es decir, en sección transversal. [Cortesía del Dr. Vincent Marchesi.]

**Figura 12.2 Estructuras de dos ácidos grasos.**

El palmitato es un ácido graso saturado de 16 átomos de carbono y el oleato es un ácido graso de 18 átomos de carbono con un solo doble enlace.



ta *dodecadienoico* y con tres dobles enlaces *ácido octadecatrienoico*. La abreviatura 18:0 indica un ácido graso C₁₈ sin dobles enlaces, mientras que 18:2 significa que tiene dos dobles enlaces. En la Figura 12.2 se muestra la estructura de las formas ionizadas de dos ácidos grasos muy comunes: el ácido palmitico (C₁₆, saturado) y el oleico (C₁₈, monoinsaturado).

Los átomos de carbono de los ácidos grasos se numeran empezando por el extremo carboxilo, como se muestra al margen. Los átomos de carbono 2 y 3 suelen denominarse α y β , respectivamente. Al átomo de carbono del grupo metilo al final de la cadena se le llama *átomo de carbono ω* . La posición del doble enlace se suele representar por el símbolo Δ seguido por un superíndice numérico. Por ejemplo, *cis*- Δ^9 significa que hay un doble enlace en *cis* entre los carbonos 9 y 10; *trans*- Δ^2 significa que hay un doble enlace en *trans* entre los carbonos 2 y 3. Otra forma alternativa de especificar la posición del doble enlace es empezando a contar desde el otro extremo, es decir, refiriéndonos al átomo de carbono ω (el del grupo metilo) como el 1. Un ácido graso ω -3, por ejemplo, tiene la estructura indicada al margen. Los ácidos grasos están ionizados a pH fisiológico y, por tanto, es más adecuado referirnos a ellos como carboxilatos: por ejemplo, palmitato y hexadecanoato.

La longitud de la cadena y grado de insaturación de los ácidos grasos pueden variar considerablemente

Las cadenas de ácidos grasos en los sistemas biológicos contienen normalmente un número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 24 (Tabla 12.1). Los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono son los más abundantes. La predomin-

TABLA 12.1 Algunos ácidos grasos comunes en animales

Número de átomos de carbono	Número de dobles enlaces	Nombre común	Nombre sistemático	Fórmula
12	0	Laurato	<i>n</i> -Dodecanoato	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COO ⁻
14	0	Miristato	<i>n</i> -Tetradecanoato	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COO ⁻
16	0	Palmitato	<i>n</i> -Hexadecanoato	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COO ⁻
18	0	Esterato	<i>n</i> -Octadecanoato	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻
20	0	Araquidato	<i>n</i> -Eicosanoato	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COO ⁻
22	0	Behenato	<i>n</i> -Docosanoato	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COO ⁻
24	0	Lignocerato	<i>n</i> -Tetracosanoato	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COO ⁻
16	1	Palmitoleato	<i>cis</i> - Δ^9 -Hexadecenoato	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₆ COO ⁻
18	1	Oleato	<i>cis</i> - Δ^9 -Octadecenoato	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COO ⁻
18	2	Linoleato	<i>cis,cis</i> - Δ^9,Δ^{12} -Octadecadienoato	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COO ⁻
18	3	Linolenato	todo- <i>cis</i> - $\Delta^9,\Delta^{12},\Delta^{15}$ -Octadecatrienoato	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COO ⁻
20	4	Araquidonato	todo- <i>cis</i> - $\Delta^5,\Delta^6,\Delta^{11},\Delta^{14}$ -Eicosatetraenoato	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COO ⁻

nancia de las cadenas de ácido graso de número par es acorde con la forma en que los ácidos grasos se sintetizan (Capítulo 26). En los animales, la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos no está ramificada. Estos ácidos pueden ser saturados o insaturados. La configuración de los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados es casi siempre *cis*. Los dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados están separados entre sí por, al menos, un grupo metileno.

Las propiedades de los ácidos grasos y sus lípidos derivados dependen de la longitud de su cadena y del grado de insaturación. A igual longitud de cadena, los ácidos grasos insaturados tienen un punto de fusión más bajo que los saturados. Así, por ejemplo, el punto de fusión del ácido esteárico es 69,6 °C mientras que el del ácido oleico (con un sólo doble enlace) es 13,4 °C. Los puntos de fusión de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie C₁₈ son, incluso, más bajos. La longitud de la cadena también afecta al punto de fusión, como se observa por el hecho de que la temperatura de fusión del palmitico (C₁₆) es 6,5 grados inferior a la del esteárico (C₁₈). *Así, las longitudes cortas de la cadena y la insaturación aumentan la fluididad de los ácidos grasos y sus derivados.*

12.2 En las membranas hay tres tipos principales de lípidos

Por definición, los lípidos son *biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos como el clorofórmico*. Los lípidos tienen diferentes funciones biológicas: sirven como moléculas combustibles, como almacenajes de energía altamente concentrada, como moléculas señal y como componentes de las membranas. Las tres primeras funciones de los lípidos serán tratadas posteriormente. Los tres tipos principales de lípidos de membrana son *los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol*. Comencemos por los lípidos que se encuentran en eucariotas y bacterias. Los lípidos en *árqueas* (*arqueobacterias*) son distintos, aunque tienen muchas características, relacionadas con su función integradora de la membrana, comunes con las de los lípidos de otros organismos.

Los fosfolípidos son los lípidos más importantes de las membranas

Los fosfolípidos abundan en todas las membranas biológicas. Una molécula de fosfolípido está constituida por cuatro componentes: ácidos grasos, un esqueleto al que se unen los ácidos grasos, un fosfato y un alcohol unido al fosfato (Figura 12.3). Los ácidos grasos suministran la barrera hidrofóbica, mientras que el resto de la molécula tiene propiedades hidrofílicas que le permiten interaccionar con el entorno.

El esqueleto sobre el que se construyen los fosfolípidos puede ser el glicerol, un alcohol de tres carbonos, o la *esfingosina*, un alcohol más complejo. Los derivados del glicerol se denominan *fosfoglicéridos*. Un fosfoglicérido está constituido por un esqueleto de glicerol al que se le unen dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol fosforilado.

En los fosfoglicéridos, los grupos hidroxilo en C-1 y C-2 del glicerol están esterificados por dos grupos carboxilo de sendas cadenas de ácido graso. El grupo hidroxilo del C-3 del esqueleto del glicerol se esterifica con ácido fosfórico. El compuesto resultante, denominado *fosfatidato (α diacilglicerol 3-fosfato)*, es el fosfoglicérido más simple. En las membranas están presentes solamente pequeñas cantidades de fosfatidato. Sin embargo, este compuesto es un intermediario clave en la biosíntesis de otros fosfoglicéridos (Sección 26.1). En la figura 12.4 se muestra la configuración absoluta del fragmento glicerol 3-fosfato de los lípidos de membrana.

La mayoría de los fosfoglicéridos son derivados del fosfatidato. El grupo fosfato del fosfatidato se esterifica con el grupo hidroxilo de uno o varios al-

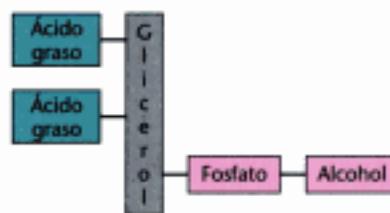


Figura 12.3 Estructura esquemática de un fosfolípido.

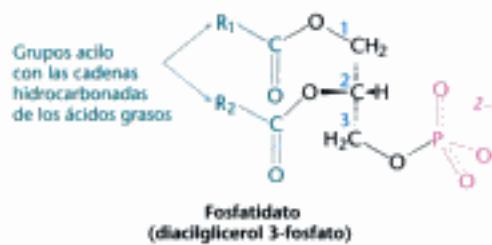
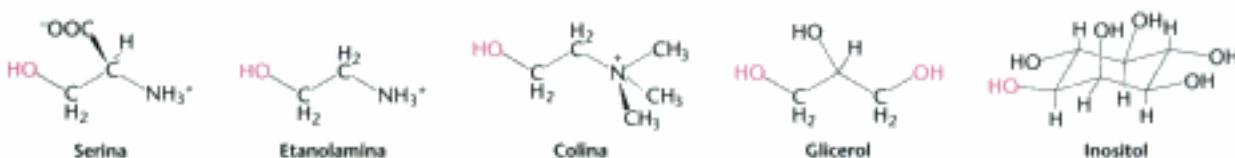


Figura 12.4 Estructura del fosfatidato (diacilglicerol 3-fosfato). Se muestra la configuración absoluta del centro de simetría del carbono 2 (C-2).

coholes. Los alcoholes comunes de los fosfoglicéridos son la serina, etanolamina, colina, glicerol e inositol.



Las fórmulas estructurales de otros fosfoglicéridos principales, es decir, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y difosfatidilglicerol, se representan en la figura 12.5.

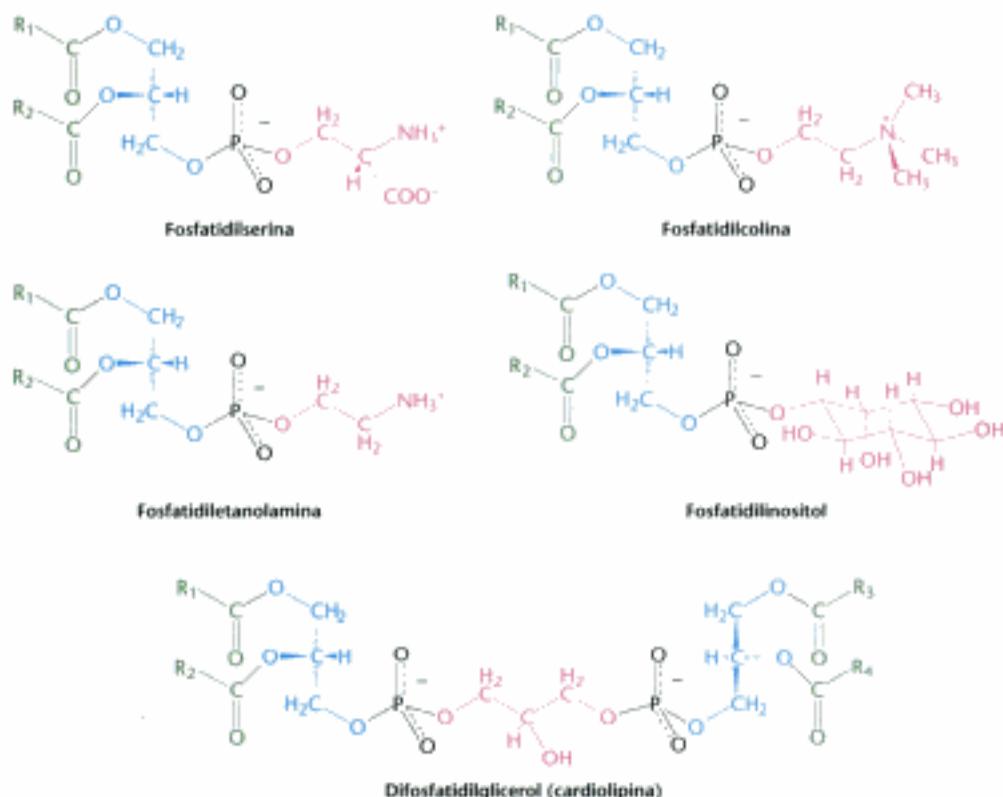


Figura 12.5 Algunos fosfoglicéridos comunes encontrados en las membranas.

La esfingomielina es el único fosfolípido de las membranas que no deriva del glicerol. En vez de ello, el esqueleto de la esfingomielina es la *esfingosina*, un aminoalcohol que contiene una cadena hidrocarbonada larga e insaturada (Figura 12.6). En

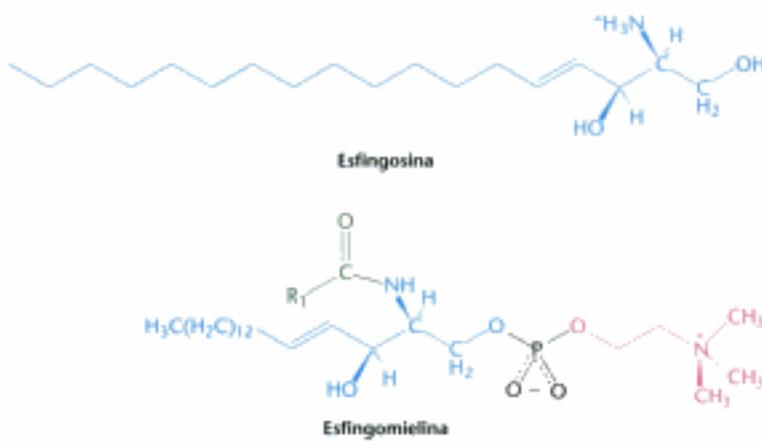


Figura 12.6 Estructuras de la esfingosina y esfingomielina. En la esfingomielina se resalta en azul la parte de la esfingosina.

la esfingomielina, el grupo amino del esqueleto de la esfingosina está ligado a un ácido graso mediante un enlace amida. Además, el grupo hidroxilo primario de la esfingosina está esterificado a la fosforilcolina.

Los lípidos de membrana pueden contener también hidratos de carbono

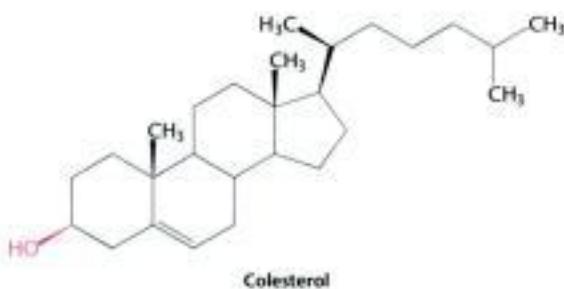
Los *glicolípidos*, como su nombre indica, son lípidos que contienen azúcares. En las células animales, los glicolípidos, al igual que la esfingomielina, derivan de la esfingosina. El grupo amino de la esfingosina está acilado por un ácido graso, como en la esfingomielina. Los glicolípidos difieren de la esfingomielina en la naturaleza de la unidad que enlaza al grupo hidroxílico primario del esqueleto de la esfingosina. En los glicolípidos, uno o más azúcares (en lugar de la fosforilcolina) van unidos a este grupo. El glicolípido más simple es el *cerebrósido*, en el que hay solamente un residuo de azúcar, glucosa o galactosa.



Los glicolípidos más complejos, tales como los *gangliósidos*, contienen una cadena ramificada de hasta siete monosacáridos. Los glicolípidos están orientados de una forma totalmente asimétrica, con el azúcar orientado siempre hacia la cara extracelular de la membrana.

El colesterol es un lípido basado en un núcleo esteroideo

El colesterol es un lípido con una estructura bastante diferente de la de los fosfolípidos. Es un esteroide formado por la unión de cuatro anillos hidrocarbonados.



A un extremo del esteroide se le une una cola hidrocarbonada y al otro un grupo hidroxilo. En las membranas la molécula se orienta paralela a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos y el grupo hidroxilo interacciona con la cabeza polar de los fosfolípidos vecinos. Los procariotas carecen de colesterol, pero éste se encuentra en distintas cantidades en todas las membranas animales. Constituye casi el 25% de los lípidos de la membrana de ciertas células nerviosas pero está prácticamente ausente en muchos compartimientos intracelulares.

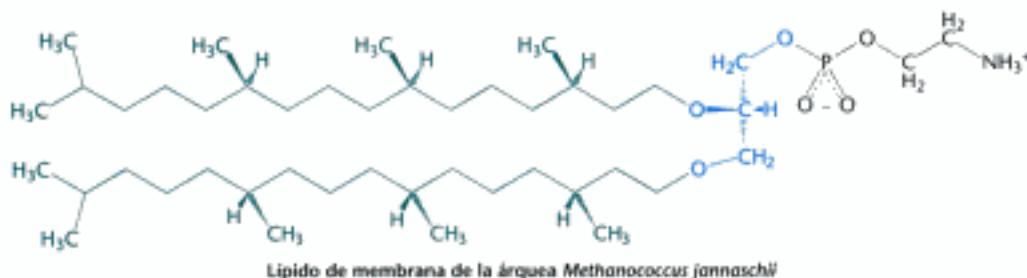
Las membranas de las arqueas (arqueobacterias) están formadas por éteres lipídicos con cadenas ramificadas

 Las membranas de arqueas difieren en composición de las de eucariotas y bacterias en tres características importantes. Dos de estas diferencias están claramente relacionadas con las condiciones de vida tremadamente hostiles en las que viven muchas de ellas (Figura 12.7). La primera, las cadenas no polares se unen



Figura 12.7 Una arquea y su entorno. Las arqueas pueden crecer en entornos tan duros como las chimeneas de los volcanes. Aquí los arqueas forman un manto naranja rodeado de depósitos sulfurosos de color amarillo. [Kraft-Explorer/Photo Researchers.]

al esqueleto de glicerol por enlaces éter y no éster. El enlace éter es más resistente a la hidrólisis. La segunda, las cadenas alquáticas son *ramificadas*, en vez de lineales. Están formadas por repeticiones de un fragmento de cinco átomos de carbono totalmente saturado. Estos hidrocarburos saturados y ramificados son más resistentes a la oxidación. La capacidad de estos lípidos de las arqueas para resistir la hidrólisis y la oxidación puede ayudar a estos organismos a soportar las condiciones extremas, altas temperaturas, bajo pH o altas concentraciones salinas, en las que crecen estos organismos. Finalmente, la estereoquímica del glicerol central está invertida respecto a la indicada en la Figura 12.4.



Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas que poseen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica

La diversidad de lípidos de membrana es extensa. Sin embargo, todos ellos tienen en común una característica muy importante: *los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas* (o anfifílicas). Contienen a la vez una parte *hidrofílica* y otra *hidrofóbica*.

Observemos el modelo espacial de un fosfoglicérido como la fosfatidilcolina. Su forma general es aproximadamente rectangular (Figura 12.8A). Las dos cadenas de ácidos grasos quedan aproximadamente paralelas entre sí, mientras que la fosforocolina apunta en dirección opuesta. La esfingomielina posee una conformación similar, como también los lípidos de arqueas descritos. Por todo ello, se ha adoptado la siguiente representación abreviada para los lípidos de membrana: su unidad hidrofílica, también denominada grupo o cabeza polar, se representa mediante un círculo, mientras que sus colas hidrocarbonadas se representan mediante líneas rectas u onduladas (Figura 12.8B).

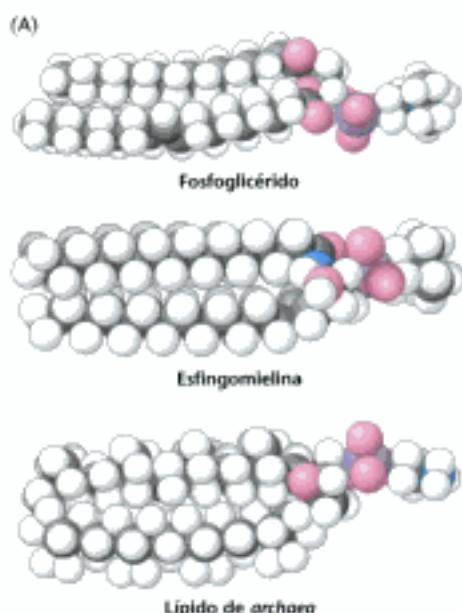
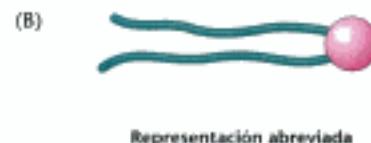


Figura 12.8 Representaciones de lípidos de membrana. (A) Modelo espacial compacto de un fosfoglicérido, de esfingomielina y de un lípido de archaea indicando la forma y distribución de los componentes hidrofílico e hidrofóbico. (B) Representación abreviada de un lípido de membrana.



12.3 Los fosfolípidos y glicolípidos forman fácilmente bicapas en medios acuosos

¿Qué propiedades permiten a los fosfolípidos formar membranas? La formación de membranas es una consecuencia de la naturaleza anfipática de las moléculas. Sus cabezas polares facilitan el contacto con el agua, mientras que sus colas hidrocarbonadas interaccionan una con otra, en lugar de hacerlo con el agua. ¿Cómo se ordenan en medio acuoso las moléculas con estas preferencias? Una manera es formar una estructura globular llamada *micela*, en la que los grupos de la cabeza polar están rodeados de agua y las colas hidrocarbonadas están secuestradas en el interior, interaccionando una con otra (Figura 12.9).

Otra ordenación que satisface tanto las preferencias hidrofílicas como hidrofóbicas de los lípidos de membrana es la de una *bicapa lipídica*, compuesta por dos capas de lípidos (Figura 12.10). Una bicapa lipídica también recibe el nombre de *lámina bimolecular*. Las colas hidrocarbonadas de cada capa individual interactúan una con otra, formando un interior hidrofóbico que actúa como barrera de permeabilidad. Los grupos de las cabezas polares interactúan con los medios acuosos a cada lado de la bicapa. Las dos capas que se enfrentan reciben el nombre de monocapas.

La estructura más favorable para la mayoría de los fosfolípidos y glicolípidos en medios acuosos es la de bicapa lipídica en vez de la de micela. La razón de ello es que sus dos cadenas de ácido graso los hacen demasiado voluminosos como para poder acomodarse en el interior de una micela. Por el contrario, las sales de los ácidos grasos (como el palmitato sódico, un ingrediente del jabón), al contener una única cadena, forman micelas rápidamente. La preferencia por una estructura de bicapa en lugar de una micelar es de una importancia biológica fundamental. Una micela es una estructura limitada, normalmente de diámetro menor de 20 nm (200 Å). En contraposición, una bicapa lipídica puede tener dimensiones macroscópicas de hasta un milímetro (10^6 nm ó 10⁷ Å) o más. Los fosfolípidos y los glicolípidos son constituyentes clave de las membranas porque forman capas bimoleculares extensas (Figura 12.11).

La formación de bicapas lipídicas es un proceso de autoensamblaje o autoasociación. En otras palabras, la estructura de la capa bimolecular es consecuencia de la estructura de las moléculas lipídicas constituyentes. La formación de bicapas lipídicas a partir de fosfolípidos es un proceso rápido y espontáneo en el agua. Las interacciones hidrofóbicas son las principales fuerzas que determinan la formación de bicapas lipídicas. Recordemos que las interacciones hidrofóbicas desempeñan también un papel dominante en el plegamiento de las proteínas en disoluciones acuosas

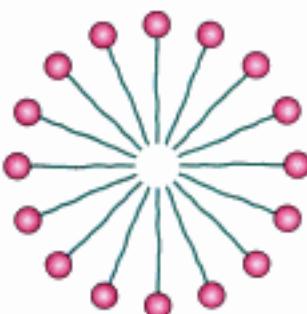


Figura 12.9 Esquema de la sección de una micela. Los ácidos grasos ionizados forman rápidamente estas estructuras, mientras que los lípidos no lo hacen.

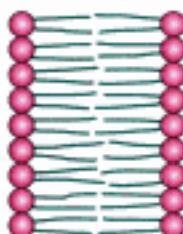


Figura 12.10 Esquema de la sección de una bicapa lipídica.

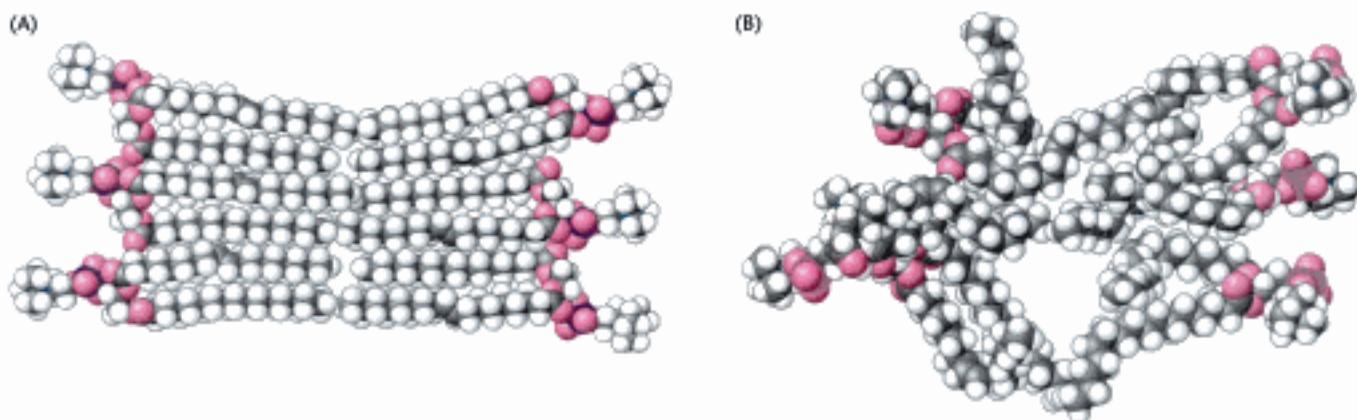


Figura 12.11 Modelo espacial compacto de una sección de una bicapa de fosfolípidos. Vista idealizada mostrando estructuras regulares. (B) Una vista más realista de la bicapa fluida que muestra estructuras más irregulares de las cadenas de ácidos grasos.

y en el apilamiento de las bases en los ácidos nucleicos (p. 10 y p. 48). Las moléculas de agua se liberan de las colas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana a medida que estas colas quedan secuestradas en el interior apolar de la bicapa. Además, existen fuerzas atractivas de *van der Waals* que favorecen el empaquetamiento compacto de las colas hidrocarbonadas. Finalmente, se producen interacciones favorables electrostáticas y de puentes de hidrógeno, entre los grupos polares de la cabeza y las moléculas de agua. Así pues, las bicapas lipídicas están estabilizadas por todo el conjunto de fuerzas que intervienen en las interacciones moleculares de los sistemas biológicos. Ya que las bicapas lipídicas se mantienen debido a muchas interacciones no covalentes (predominantemente hidrofóbicas) que se refuerzan, las bicapas son consideradas *estructuras cooperativas*. Estas interacciones hidrofóbicas tienen tres consecuencias biológicamente significativas: (1) Las bicapas lipídicas tienen una tendencia inherente a ser *extensas*; (2) las bicapas lipídicas tenderán a *cerrarse sobre sí mismas* de forma que no existan bordes con cadenas hidrocarbonadas expuestas y, por tanto, forman compartimientos; y (3) las bicapas lipídicas son *auto-sellantes* porque un agujero en una bicapa es energéticamente desfavorable.

Los fosfolípidos pueden formar vesículas lipídicas

La tendencia de los fosfolípidos a formar membranas se ha utilizado para crear una importante herramienta experimental y clínica. Las vesículas lipídicas, también llamadas liposomas, son compartimentos acuosos rodeados por una bicapa lipídica (Figura 12.12) que pueden emplearse para el estudio de la permeabilidad de la membrana o para liberar fármacos en las células. Pueden prepararse suspendiendo un lípido adecuado, como la fosfatidilcolina, en un medio acuoso. A continuación, la mezcla se *ultrasona* (es decir, se agita por medio de ondas sónicas de alta frecuencia) con lo que se consigue una dispersión de vesículas cerradas de tamaño bastante uniforme. Las vesículas formadas según los procedimientos indicados tienen forma aproximadamente esférica, con un diámetro de unos 50 nm (500 Å). Se pueden formar vesículas mayores (del orden de 10⁴ Å, ó 1 mm de diámetro) evaporando lentamente el disolvente orgánico de una suspensión de fosfolípidos en una mezcla de disolventes.

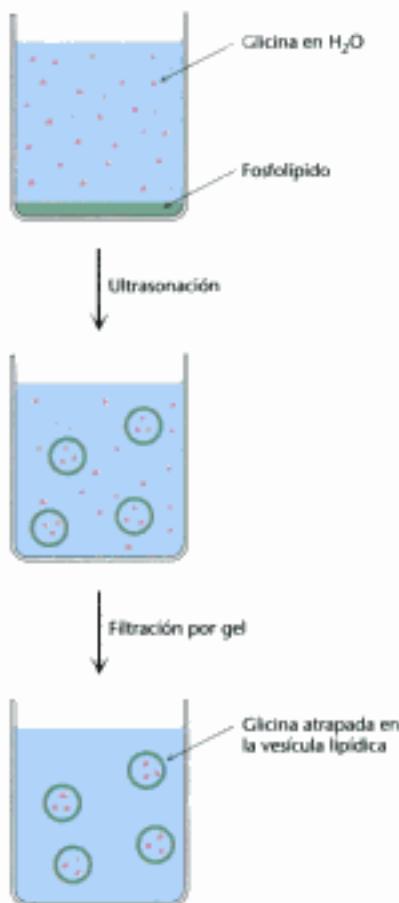


Figura 12.13 Preparación de liposomas que contienen glicina. Los liposomas que contienen glicina se forman ultrasonando fosfolípidos en presencia de glicina. La glicina libre se elimina mediante filtración por gel.



Figura 12.12 Liposoma. Un liposoma o vesícula lipídica es un pequeño compartimento acuoso rodeado de una bicapa lipídica.

Se pueden incluir iones o moléculas en el compartimento acuoso de las vesículas lipídicas formando esas vesículas en presencia de las sustancias deseadas (Figura 12.12). Por ejemplo, si se preparan vesículas de 50 nm de diámetro en una disolución de glicina 0,1 M, en cada compartimento acuoso quedarán atrapadas unas 2000 moléculas de glicina. Estas vesículas que contienen glicina pueden ser liberadas de la glicina externa por diálisis o por cromatografía de filtración por gel. A continuación se puede determinar la permeabilidad de la bicapa lipídica a la glicina midiendo la velocidad de salida del aminoácido del interior de la vesícula a la disolución externa. Proteínas específicas de membrana pueden solubilizarse en presencia de detergentes y añadirse entonces a fosfolípidos que formarán liposomas. Los complejos liposoma–proteína (proteoliposoma) son herramientas muy prácticas a la hora de examinar las funciones de una gran diversidad de proteínas de membrana.

 Se están realizando experimentos para desarrollar la utilización clínica de los liposomas. Por ejemplo, se pueden inyectar liposomas que contengan fármacos o DNA para tratamiento en pacientes en experimentos de terapia génica. Estos liposomas se fusionan con la membrana plasmática de células de muchas clases y pueden así utilizarse para introducir una gran variedad de sustancias en células impermeables a ellas. El suministro de fármacos mediante liposomas también altera la distribución del fármaco dentro del cuerpo y a menudo disminuye su toxicidad. Por ejemplo, se distribuye menos fármaco a los tejidos normales porque se ha demostrado que los liposomas que llevan mucho tiempo en la corriente circulatoria se concentran en aquellas regiones donde aumenta la circulación sanguínea, como son los tumores sólidos y los tejidos inflamados. Además la fusión selectiva de vesículas lípidicas con ciertos tipos de células constituye un prometedor medio de controlar el aporte de fármacos a sus células diana.

El otro tipo bien estudiado de membrana sintética es la *membrana bicapa plana*. Esta estructura puede formarse sobre un orificio de 1 mm, horadado en la separación entre dos compartimientos acuosos, sumergiendo un pincel en una disolución capaz de formar membranas, como fosfatidilcolina en decano. La punta del pincel se hace pasar por encima de un agujero (de 1 mm de diámetro) que se halla en la pared de separación de dos compartimientos acuosos. La película lípida que queda en el orificio tiende espontáneamente a hacerse más delgada, formando una bicapa lípida. Las propiedades de conductividad eléctrica de estas membranas macroscópicas pueden estudiarse fácilmente por medio de electrodos situados en cada compartimiento acuoso (Figura 12.14). Por ejemplo, la permeabilidad a los iones se determina midiendo el paso de corriente a través de la membrana en función de las diferencias de potencial aplicadas.

Las bicapas lípidas son muy impermeables a los iones y a la mayoría de las moléculas polares

Los estudios de permeabilidad de los liposomas y las medidas de conducción eléctrica de las bicapas planas han demostrado que las *bicapas lípidas tienen una permeabilidad muy baja para los iones y para la mayoría de las moléculas polares*. El agua es una excepción importante a esta generalización: atraviesa fácilmente tales membranas debido a su tamaño pequeño, alta concentración y ausencia completa de carga. El intervalo de los coeficientes de permeabilidad medidos es muy amplio (Figura 12.15). Por ejemplo, el Na^+ y el K^+ atraviesan estas membranas 10^9 veces más lentamente que el agua. El triptófano, un ion híbrido a pH 7, atraviesa la membrana 10^3 veces más lentamente que el indol, una molécula estructuralmente relacionada con él, a la que le faltan los grupos iónicos. De hecho, *los coeficientes de permeabilidad de moléculas pequeñas dependen directamente de sus solubilidades relativas en disolventes apolares y en agua*. Esta relación sugiere que una molécula pequeña podría atravesar una membrana lípida de la forma siguiente: primero se desprendería de su envoltura de agua de solvatación; quedaría entonces disuelta en la matriz hidrocarbonada de la membrana; finalmente difundiría desde esta parte central hasta el otro lado de la membrana, donde volvería a ser solvatada por el agua. Un ion como el Na^+ atraviesa la membrana muy lentamente porque la eliminación de las moléculas de agua, que constituyen su envoltura de solvatación, está energéticamente muy desfavorecida.

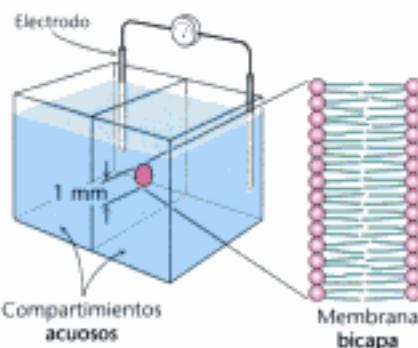


Figura 12.14 Dispositivo experimental para el estudio de bicapas planas. Se forma una bicapa a través de un orificio de 1 mm en un tabique que separa dos compartimentos acuosos. Este dispositivo permite realizar medidas de permeabilidad y de conductancia eléctrica de las bicapas lípidicas.

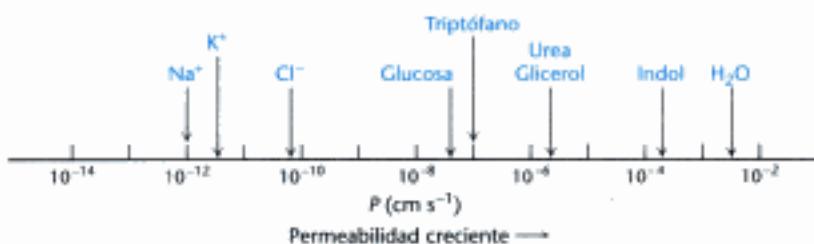


Figura 12.15 Coeficientes de permeabilidad (P) de las bicapas lípidas para algunos iones y moléculas. La capacidad de las moléculas para atravesar las membranas varía entre márgenes muy amplios.

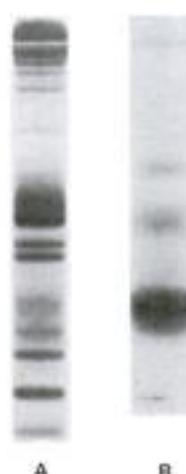


Figura 12.16 Electroforesis en gel de acrilamida-SDS. (A) membrana plasmática de los eritrocitos, (B) membrana fotorreceptora de los bastones (células cilíndricas) de la retina y (C) membrana del retículo sarcoplásmico de las células musculares. [Cortesía del Dr. Theodore Steck (parte A) y del Dr. David MacLennan (parte C).]

12.4 Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos que tienen lugar en las membranas

Volvamos ahora a las proteínas de las membranas, que son las responsables de la mayoría de los procesos dinámicos llevados a cabo por las membranas. Los lípidos de la membrana forman una barrera de permeabilidad y establecen, por ello, compartimentos, mientras que *las proteínas específicas hacen de mediadoras del resto de funciones propias de las membranas*. En particular, las proteínas transportan compuestos e información a través de la membrana. Los lípidos de las membranas crean el ambiente adecuado para la acción de tales proteínas.

Las membranas difieren en su contenido proteico. La mielina, una membrana que sirve de aislamiento alrededor de ciertas fibras nerviosas, tiene un bajo contenido en proteína (18%). Los lípidos, las especies moleculares más abundantes en la mielina, son buenos aislantes eléctricos. Por otra parte, las membranas plasmáticas de la mayoría de las células son mucho más activas. Contienen muchas bombas, compuertas, receptores y enzimas. El contenido proteico de estas membranas plasmáticas oscila en general en torno a un 50%. Las membranas relacionadas con la transducción de energía, tales como las membranas internas de las mitocondrias y cloroplastos, poseen el más alto contenido en proteínas, por término medio un 75%.

Las proteínas principales de una membrana pueden visualizarse fácilmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Como ya se ha explicado, la movilidad electroforética de muchas proteínas en este gel depende más de su masa que de su carga neta en ausencia de SDS. En la figura 12.16 se puede apreciar el aspecto de una electroforesis en gel de tres membranas: la membrana plasmática de los eritrocitos, la membrana fotorreceptora de los bastones de la retina y la membrana del retículo sarcoplásmico. Los geles revelan que estas tres membranas poseen una composición proteica muy diferente. En general, *las membranas que ejercen funciones diferentes tienen proteínas distintas*.

Las proteínas se asocian con la bicapa lipídica mediante formas muy variadas

La facilidad con la que una proteína puede disociarse de la membrana indica cuán íntima es su asociación con la membrana. Algunas proteínas de membrana pueden solubilizarse por métodos relativamente suaves, como puede ser la extracción con disoluciones de elevada fuerza iónica (por ejemplo, NaCl 1 M). Otras proteínas de membrana están unidas mucho más fuertemente y no pueden ser solubilizadas salvo mediante el uso de detergentes o de disolventes orgánicos. Las proteínas de membrana pueden dividirse en periféricas e integrales (o intrínsecas), en razón de la mencionada diferencia de solubilidad (Figura 12.17). Las *proteínas integrales* interactúan intensamente con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana, de forma que sólo pueden ser liberadas por agentes que compitan por estas interacciones apolares. De hecho, casi todas las proteínas integrales de membranas conocidas atraviesan la bicapa lipídica. Por el contrario, las *proteínas periféricas* se enlazan a las membranas por fuerzas electrostáticas y de puentes de hidrógeno y estas interacciones de tipo polar pueden romperse por adición de sales o cambio de pH. La mayoría de las proteínas periféricas de membrana están unidas a la superficie de las proteínas integrales, ya sea en la cara citosólica de la membrana, ya sea en la cara extracelular. Otras están ancladas a la bicapa lipídica a través de un enlace covalente a una cadena hidrofóbica, como un ácido graso.

Las proteínas interaccionan con las membranas de maneras muy diversas

Aunque las proteínas de membrana son más difíciles de cristalizar que las proteínas solubles en agua, los investigadores, utilizando métodos de microscopía electrónica o de cristalográfia por rayos X, han determinado la estructura tridimensional de más de 100 de estas proteínas con una resolución suficientemente alta como para distinguir los detalles moleculares. Como se ha descrito en el Capítulo 2, las estructuras

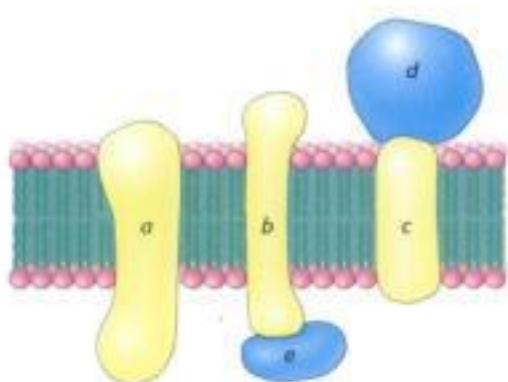


Figura 12.17 Proteínas integrales y periféricas de membrana. Las proteínas integrales de membrana (*a*, *b* y *c*) interactúan extensamente con la región hidrocarbonada de la bicapa. Casi todas las proteínas integrales de membrana conocidas atraviesan la membrana lipídica. Las proteínas periféricas de membrana (*d* y *e*) se unen a la superficie de las proteínas integrales. Algunas proteínas periféricas de membrana interactúan con los grupos de la cabeza polar de los lípidos (no mostrado).

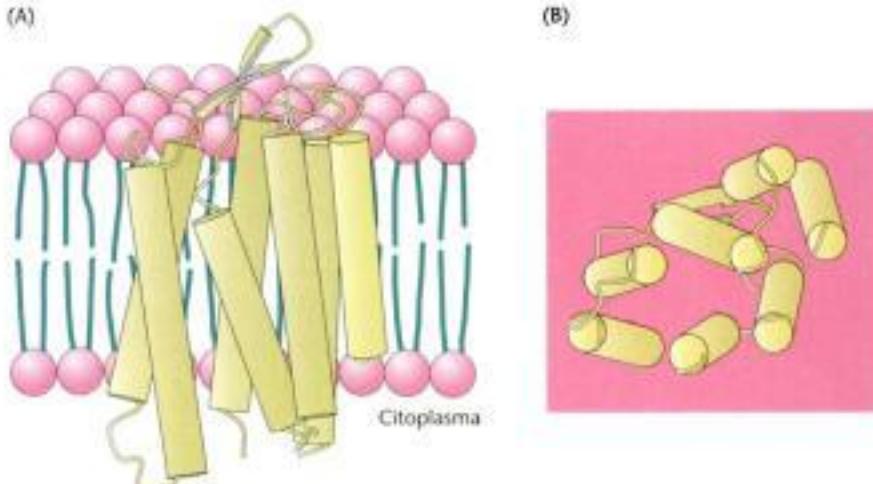


Figura 12.18 Estructura de la bacteriorrodopsina. La bacteriorrodopsina consta principalmente de hélices α transmembrana. (A) Vista a través de la bicapa de la membrana. El interior de la membrana está dibujado en verde y los grupos de las cabezas polares están en rojo. (B) Una vista desde el lado citoplasmático de la membrana. [Tomada de 1_BRX.pdb.]

de las proteínas de membrana difieren de las solubles con respecto a la distribución de los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Ahora consideraremos en detalle las estructuras de tres proteínas de membrana.

Las proteínas pueden atravesar las membranas a través de helices alfa. La primera proteína que vamos a tratar es la *bacteriorrodopsina* de arqueas que se muestra en la Figura 12.18. Esta proteína actúa en la transducción de energía utilizando la energía de la luz para transportar protones del interior al exterior de la célula. El gradiente de protones así generado se emplea en sintetizar ATP. La bacteriorrodopsina está compuesta principalmente por hélices α ; de hecho, consta de 7 hélices α estrechamente empaquetadas y distribuidas casi perpendicularmente al plano de la membrana, que atraviesan sus 45 Å de grosor. El análisis de la estructura primaria de la bacteriorrodopsina revela que la mayor parte de los aminoácidos de estas hélices transmembrana son apolares y que sólo unos pocos tienen carga (Figura 12.19). Esta distribución de los aminoácidos no polares es razonable porque estos residuos están en contacto bien con el núcleo hidrocarbonado de la membrana o uno con otro. *Las hélices α transmembrana constituyen el motivo estructural más común en proteínas de membrana.* Como comentaremos en la Sección 12.5, frecuentemente se pueden detectar estas regiones a partir, únicamente, de la información sobre la secuencia de aminoácidos.

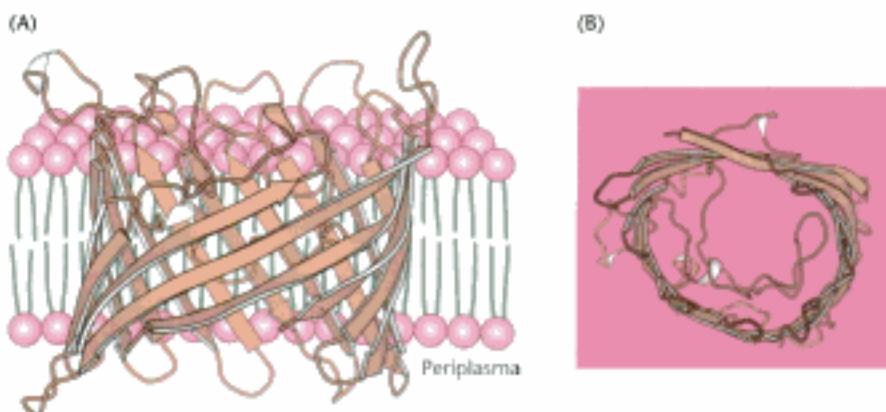
A Q I T G R P E W I W L A L G T A L M G L G T L Y F L V E G M G V S D P D A K K F Y A I T T L V P A I A F T M Y L S M L L G Y G L T M V P F G G E Q N P I Y W A R R Y A D W L F T T P L L L D L A L L V D A D Q G T I I L A L V G A D G I M I G T G L V G A L T R V Y S Y R F V W W A I S T A A M L Y I L Y V L F F G F T S K A L S M P P E V A S T F R V L I N V T V V L W S A Y V V V V W L I C S E G A G I V P L N I E T L L F M V L D V S A K V G F G L I L L R S A I F G E A E A P E E S A D G A A A T S

Figura 12.19 Secuencia de aminoácidos de la bacteriorrodopsina. Las regiones de las siete hélices se resaltan en amarillo y los residuos carboxilados en rojo.

Las láminas beta pueden formar conductos proteicos. La porina, una proteína de la membrana externa de bacterias como *E. coli* y *Rhodobacter capsulatus* representa una clase de proteínas de membrana con un tipo de estructura completamente diferente. Las estructuras de este tipo están constituidas por láminas β y no contienen hélices α . (Figura 12.20).

La distribución de las láminas β es bastante sencilla: cada hebra está unida por puentes de hidrógeno con su vecina en una organización antiparalela, formando una única lámina β . La lámina β se dobla para formar el hueco de un cilindro que funciona como unidad activa. Como su nombre sugiere, la porina forma poros o conductos en las membranas. El centro del cilindro constituido por la proteína está atravesado por el poro. La superficie externa de la porina es no polar dado que interacciona

Figura 12.20 Estructura de la porina bacteriana (de *Rhodopseudomonas blasticus*). La porina es una proteína de membrana constituida totalmente por láminas β . (A) Vista lateral (B) Vista desde el espacio periplasmático. Sólo se muestra un monómero de la proteína trimérica. [Tomado de 1 BRX.pdb.]



con el núcleo hidrocarbonado de la membrana. Por el contrario, el interior del conducto es muy hidrofilico y está lleno de agua. Esta disposición de las superficies polares y no polares se consigue por la alternancia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de cada hebra β (Figura 12.21).

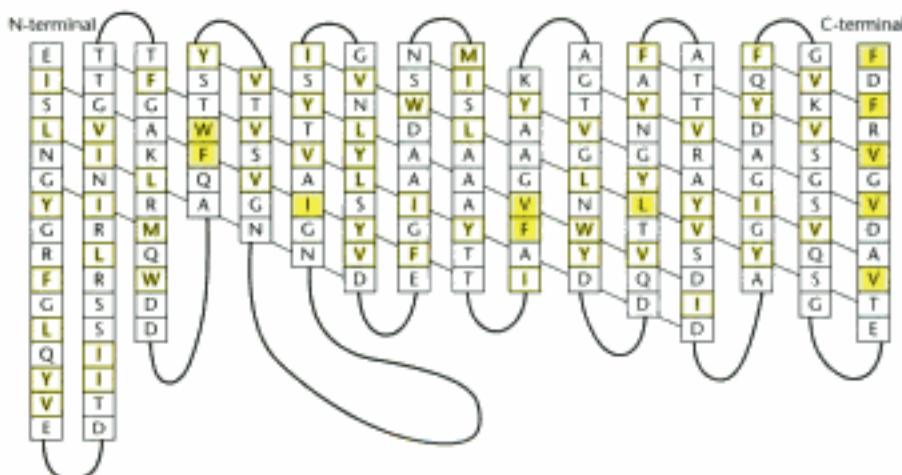
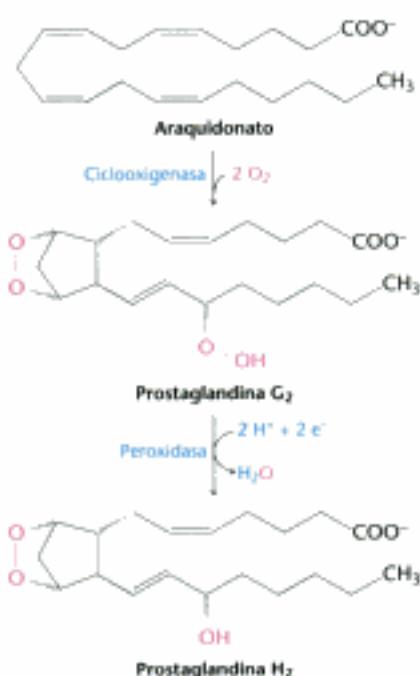
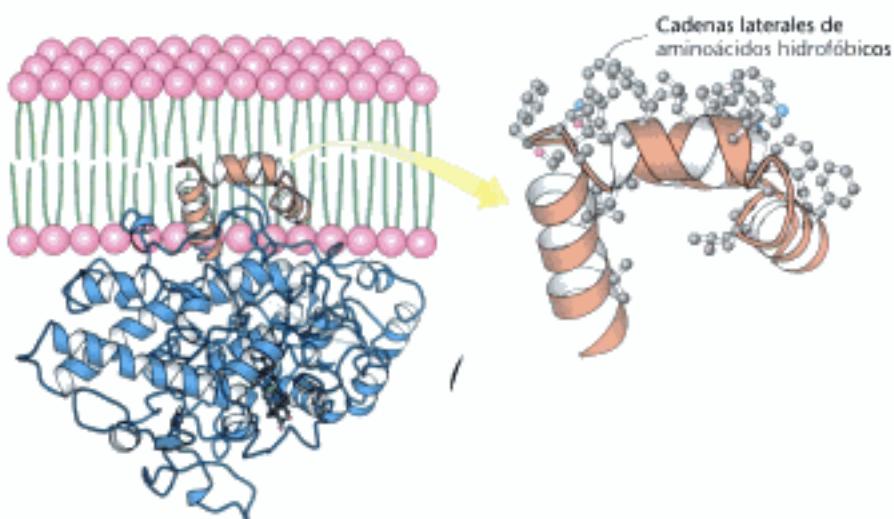


Figura 12.21 Secuencia de aminoácidos de una porina. Algunas proteínas de membrana, como las porinas, están constituidas por láminas β que tienden a presentar aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos adyacentes. Se muestra la estructura secundaria de *Rhodopseudomonas blasticus* con las líneas diagonales indicando la dirección de los puentes de hidrógeno a lo largo de la lámina β . Los residuos hidrofóbicos (F, I, L, M, V, W y Y) se indican en amarillo. Estos residuos tienden a disponerse hacia el exterior de la estructura, en contacto con la parte hidrofóbica de la membrana.



La parte de una proteína que se introduce en la membrana puede servir para anclar a toda la proteína a la superficie de la membrana. La estructura de la prostaglandina H_2 sintasa-1 unida a membrana revela que las hélices α tienen un papel muy diferente en relación con las asociaciones proteína-membrana. Este enzima cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina H_2 en dos pasos: una reacción catalizada por la ciclooxygenasa y la otra por la peroxidasa (Figura 12.22). La prostaglandina H_2 fomenta la inflamación y la secreción gástrica de ácido clorhídrico. El enzima que produce la prostaglandina H_2 es un homodímero con una estructura bastante complicada formada principalmente por hélices α . A diferencia de la bacteriorrodopsina, esta proteína no está completamente incluida en la membrana, sino que se asienta a lo largo de la superficie externa de la membrana, a la que se une firmemente a través de un grupo de hélices α .

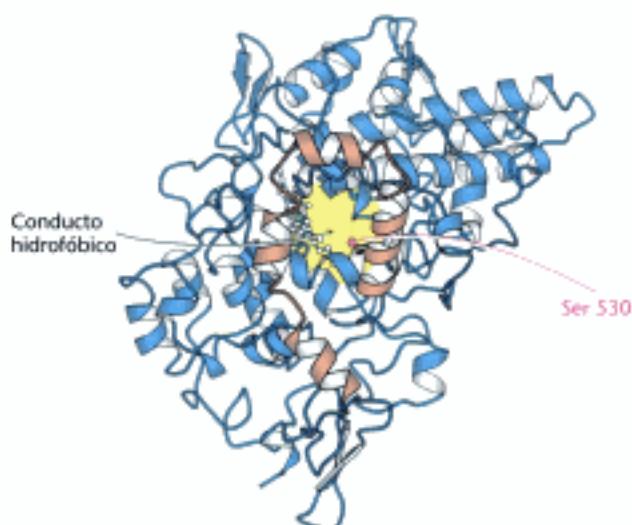
Figura 12.22 Formación de la prostaglandina H_2 . La prostaglandina H_2 sintasa-1 cataliza la formación de prostaglandina H_2 a partir del ácido araquidónico en dos pasos.



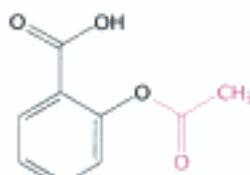
 **Figura 12.23 Unión de la prostaglandina H₂ sintasa a la membrana.** La prostaglandina H₂ sintasa se mantiene en la membrana a través de un grupo de hélices α cubiertas por cadenas laterales hidrofóbicas. Se muestra un monómero del enzima dímerico. [Tomado de 1PTH.pdb.]

con superficies hidrofóbicas, que se extienden desde la base de la proteína hacia el interior de la membrana (Figura 12.23). Esta interacción es lo suficientemente fuerte como para que sólo la acción de los detergentes sea capaz de liberar la proteína de la membrana. Así, este enzima está clasificado como proteína integral de membrana, a pesar de que no es una proteína que la atraviese.

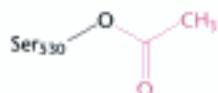
 La localización de la prostaglandina H₂ sintasa-1 en la membrana es crucial para su función. El sustrato de este enzima, el ácido araquidónico, es una molécula hidrofóbica generada por la hidrólisis de lípidos de la membrana. El ácido araquidónico alcanza el centro activo del enzima desde la membrana, sin pasar al medio acuoso, a través del conducto hidrofóbico de la proteína (Figura 12.24). Sin duda, casi todos nosotros hemos experimentado la importancia de este conducto: fármacos como la aspirina o el ibuprofeno bloquean el conducto e impiden la síntesis de prostaglandina, inhibiendo la actividad ciclooxygenasa de la sintasa. En el caso de la aspirina, este fármaco actúa a través de la transferencia de un grupo acetilo desde la aspirina a un residuo de serina (Ser 530) que se sitúa en el camino hacia el centro activo (Figura 12.25).



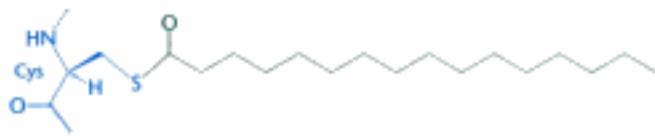
 **Figura 12.24 Conducto hidrofóbico de la prostaglandina H₂ sintasa.** Una vista desde la membrana de la prostaglandina H₂ sintasa en la que se muestra el conducto hidrofóbico que conduce al centro activo. Las hélices que permiten el anclaje a la membrana se indican en color naranja. [Tomado de 1PTH.pdb.]



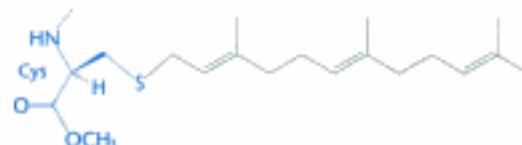
Aspirina
(Ácido acetilsalicílico)



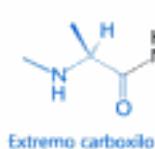
 **Figura 12.25 Los efectos de la aspirina sobre la prostaglandina H₂ sintasa-1.** La aspirina actúa transfiriendo un grupo acetilo a un residuo de serina de la prostaglandina H₂ sintasa-1.



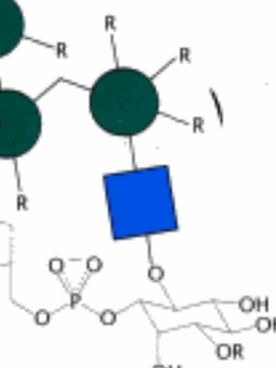
S-Palmitylcisteína



Éster metílico en el extremo C-terminal de la S-farnesilcisteína



Extremo carboxilo



Anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

Figura 12.26 Anclajes a membrana.
Los anclajes a membrana son grupos hidrofóbicos, unidos covalentemente a las proteínas (en azul) y que sujetan las proteínas a la membrana. Los círculos verdes y el cuadrado azul se corresponden respectivamente con las manosas y GlcNAc. Con R se representan puntos con modificaciones adicionales.

De nuestro análisis de estos tres ejemplos de proteínas de membrana surgen dos características importantes. Primera, las partes de la proteína que interaccionan con la región hidrofóbica de la membrana están forradas por aminoácidos con cadenas laterales no polares, mientras que aquellas partes que interaccionan con el entorno acuoso son mucho más hidrofílicas. Segunda, las estructuras situadas dentro de la membrana, son bastante regulares y, en concreto, todos los receptores y donantes de hidrógeno en el esqueleto, participan en puentes de hidrógeno. *La ruptura de los puentes de hidrógeno en el interior de la membrana es un proceso bastante desfavorable, porque no hay prácticamente agua para competir por los grupos polares.*

Algunas proteínas se asocian con las membranas mediante grupos hidrofóbicos unidos de forma covalente

Las proteínas de membrana que hemos considerado hasta ahora se asocian con las membranas a través de superficies generadas por las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos. Sin embargo, proteínas normalmente solubles en agua pueden asociarse con la membrana si se facilita esta asociación mediante grupos hidrofóbicos unidos a las proteínas. En la Figura 12.26 se muestran tres de estos grupos: (1) un grupo palmitilo unido a un residuo de cisteína por un enlace tioéster, (2) un grupo farnesilo unido a un residuo de cisteína situado en el extremo carboxilo, y (3) una estructura glicolipídica denominada anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), unida también al extremo carboxilo. Estas modificaciones se realizan a través de sistemas enzimáticos que reconocen secuencias de señales específicas cerca del centro de anclaje.

Se puede predecir la presencia de hélices transmembrana a partir de la secuencia de aminoácidos

Muchas proteínas de membrana, como la bacteriorrodopsina, utilizan hélices α para atravesar la parte hidrofóbica de la membrana. Como ya se ha visto, normalmente, la mayoría de los residuos en estas hélices α son no polares y casi ninguno está cargado. Podemos emplear esta información para identificar, a partir de la secuencia, regiones que posiblemente atraviesan la membrana? Una forma de identificar hélices transmembrana es plantearse si un segmento supuestamente helicoidal prefiere situarse en el agua o en un medio hidrocarbonado. En concreto, lo que deseamos cal-

cular es el cambio en la energía libre cuando un segmento helicoidal se transfiere del interior de una membrana al agua. En la tabla 12.2 se muestran los valores de esta energía libre para los residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la transferencia de una hélice de poli-L-arginina, un homopolímero de un aminoácido cargado positivamente, del interior de una membrana al agua se verá altamente favorecida [$-51,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-12,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) por residuo de arginina en la hélice], mientras que la transferencia de una hélice de poli-L-fenilalanina, un homopolímero de un aminoácido hidrofóbico, será muy desfavorable [$+15,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+3,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) por residuo de fenilalanina en la hélice].

La matriz hidrocarbonada de las membranas tiene un grosor de 30 Å, con lo que puede ser atravesada por una hélice α que contenga 20 residuos. A partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, podemos calcular el cambio en la energía libre al pasar, del interior de la membrana al agua, una hipotética hélice α formada por los residuos 1 a 20. Se hacen los mismos cálculos para los residuos 2 a 21, 3 a 22, etc., hasta alcanzar el final de la secuencia. Cada uno de estos conjuntos de 20 residuos se denomina *ventana*. Si representamos el cambio de energía libre frente al primer aminoácido de la ventana se genera una representación hidropática. En general, en una representación hidropática basada en una ventana de 20 residuos, un pico con un valor que iguale o supere las $+84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+20 \text{ kcal mol}^{-1}$) indica que ese segmento polipeptídico podría ser una hélice o que atraviesa la membrana. Por ejemplo, en el caso de la glicoforina, una proteína que se encuentra en las membranas de los eritrocitos, se ha identificado de acuerdo a este criterio la existencia de una sola hélice transmembrana, lo que concuerda con otros datos experimentales (Figura 12.27). Sin embargo, es necesario resaltar que un pico en una representación hidropática no basta para demostrar que un segmento sea una hélice transmembrana. Incluso las proteínas solubles pueden tener estas regiones tan altamente apolares. Recíprocamente, algunas proteínas de membrana poseen estructuras transmembrana que no se detectan empleando estas representaciones (como las láminas β transmembrana) (Figura 12.28).

TABLA 12.2 Escala de polaridad para identificar hélices transmembrana

Residuo aminoácido	Energía libre de transferencia en kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Phe	15,5 (3,7)
Met	14,3 (3,4)
Ile	13,0 (3,1)
Leu	11,8 (2,8)
Val	10,9 (2,6)
Cys	8,4 (2,0)
Trp	8,0 (1,9)
Ala	6,7 (1,6)
Thr	5,0 (1,2)
Gly	4,2 (1,0)
Ser	2,5 (0,6)
Pro	-0,8 (-0,2)
Tyr	-2,9 (-0,7)
His	-12,6 (-3,0)
Gln	-17,2 (-4,1)
Asn	-20,2 (-4,8)
Glu	-34,4 (-8,2)
Lys	-37,0 (-8,8)
Asp	-38,6 (-9,2)
Arg	-51,5 (-12,3)

Fuente: De D. M. Engelman, T. A. Steitz y A. Goldman. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15(1986): 321-353. Nota: Las energías libres se miden para la transferencia de un residuo aminoácido desde una hélice α desde el interior de la membrana al agua (adjudicándole el valor 2 a la constante dielectrénica).

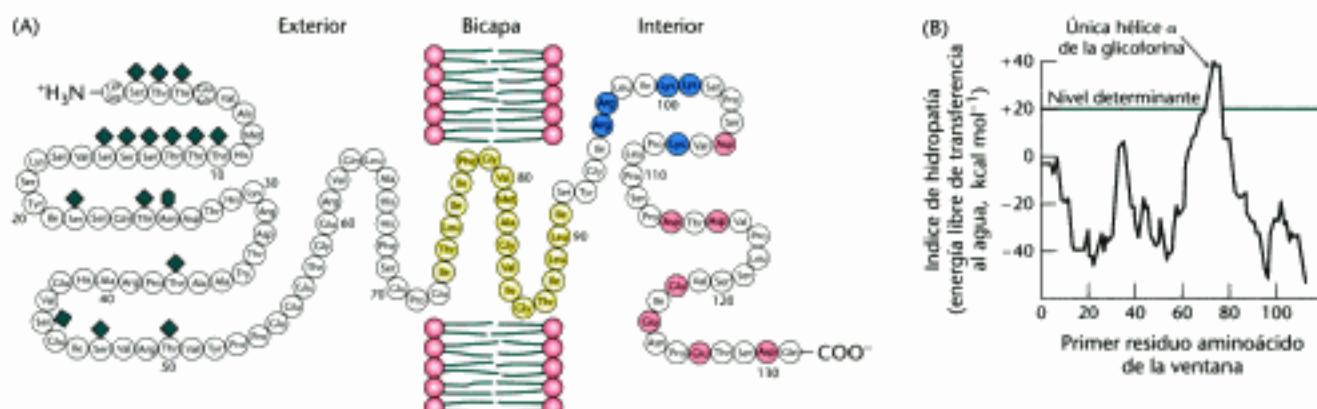
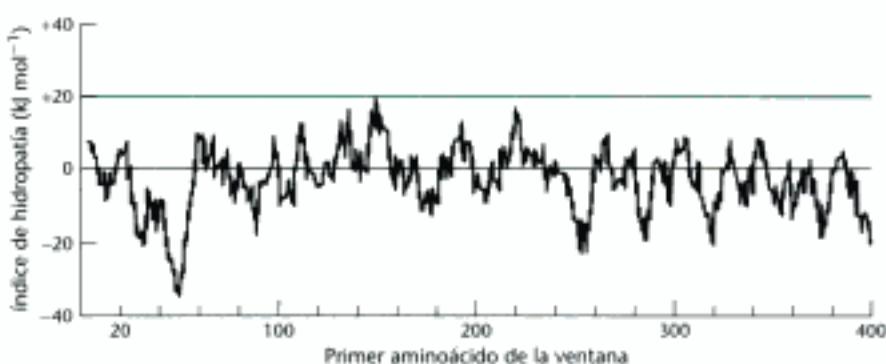


Figura 12.27 Localización de la hélice transmembrana de la glicoforina. (A) Secuencia de aminoácidos y disposición transmembrana de la glicoforina A de la membrana de eritrocito. En forma de rombos se indican 15 hidratos de carbono unidos por enlaces O-glicosídicos y, en forma hexagonal uno ligado por enlace N-glicosídico. Los residuos hidrofóbicos (en amarillo) insertos en la membrana forman una hélice α transmembrana. El extremo carboxilo, localizado en la parte citosólica de la membrana, está enriquecido en residuos cargados negativamente (en rojo) y positivamente (en azul). (B) Representación hidropática para la glicoforina. Se representa la energía libre de la transferencia de una hélice de 20 residuos, de la membrana al agua, en función de la posición del primer residuo de la hélice en la secuencia de la proteína. Picos mayores de $+84 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+20 \text{ kcal mol}^{-1}$), indican en esta representación posibles hélices transmembrana. [(A) Cortesía del Dr. Vincent Marchesi; (B) tomado de D. M. Engelman, T. A. Steitz y A. Goldman. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15(1986):321-353. Copyright en 1986 por Annual Reviews, Inc. Se reservan todos los derechos.]

Figura 12.28 Representación hidropática para la porina. No se observa ningún pico que supere el nivel crítico porque esta proteína integral de membrana está constituida por láminas β que atraviesan la membrana en lugar de hélices α .



12.5 Los lípidos y muchas proteínas difunden rápidamente en el plano de la membrana

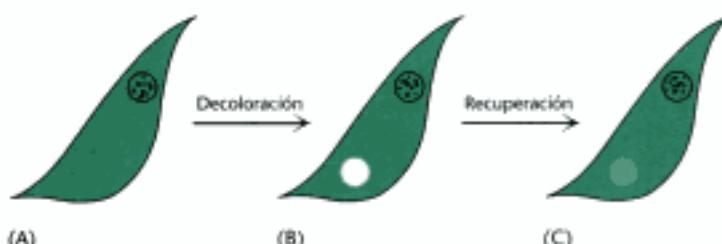
Las membranas biológicas no son estructuras rígidas, estáticas. Por el contrario, los lípidos y muchas proteínas de membrana están en movimiento lateral de forma constante, un proceso denominado *difusión lateral*. El movimiento rápido de las proteínas de membrana se ha visualizado por microscopía de fluorescencia utilizando la técnica llamada *recuperación de la fluorescencia después de fotodecoloración* (en inglés: *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP; Figura 12.29). En primer lugar, un componente de la superficie celular se marca de forma específica con un cromóforo fluorescente. Con un microscopio de fluorescencia se visualiza una pequeña región de la superficie celular ($\sim 3 \mu\text{m}^2$). Las moléculas fluorescentes de esta región se destruyen (decoloran o blanquean) con un pulso de luz muy intenso, procedente de un láser. A continuación, se controla la fluorescencia de esta región, en función del tiempo, utilizando un nivel luminoso suficientemente bajo para evitar una decoloración ulterior. Si el componente marcado es móvil, las moléculas decoloradas abandonan la región iluminada y las moléculas sin blanquear van entrando en ella, de lo que resulta un incremento de la intensidad de la fluorescencia. La velocidad de recuperación del nivel de fluorescencia depende de la movilidad lateral del componente marcado, que puede expresarse por medio de un coeficiente de difusión D . La distancia media s recorrida en dos dimensiones en el tiempo t depende de D según la fórmula

$$s = (4Dt)^{1/2}$$

El coeficiente de difusión de los lípidos en distintas membranas oscila alrededor de $1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Así pues, una molécula de fosfolípido difunde a una distancia media de $2 \mu\text{m}$ en 1 segundo. Esto significa que *una molécula de lípido puede viajar de un extremo a otro de una bacteria en un segundo*. La magnitud del coeficiente de difusión observado indica que la viscosidad de las membranas es unas cien veces mayor que la del agua, esto es, análoga a la del aceite de oliva.

Por el contrario, la movilidad lateral de las proteínas varía notablemente. *Unas proteínas son casi tan móviles como los lípidos, mientras que otras resultan prácticamente inmóviles*. Por ejemplo, la proteína fotorreceptora rodopsina (Sección 32.3)

Figura 12.29 Técnica de recuperación de la fluorescencia después de fotodecoloración. (A) fluorescencia de un componente marcado de la superficie celular en una pequeña región iluminada de la célula; (B) las moléculas fluorescentes son decoloradas por un pulso intenso de luz; (C) a medida que las moléculas decoloradas difunden fuera de la región iluminada y las no decoloradas difunden hacia adentro de ella, se recupera la intensidad de la fluorescencia; (D) la velocidad de recuperación depende del coeficiente de difusión.



es extraordinariamente móvil, con un coeficiente de difusión de $0.4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Este movimiento rápido de la rodopsina es esencial para una respuesta rápida. En el otro extremo está la fibronectina, una glicoproteína periférica que interacciona con la matriz extracelular, cuyo coeficiente de difusión es menor que $10^{-4} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. La fibronectina se mueve lentamente porque está anclada a los filamentos de actina en la otra cara de la membrana plasmática mediante la integrina. Esta proteína transmembrana enlaza la matriz extracelular y el citoesqueleto.

El modelo del mosaico fluido admite el movimiento lateral pero no la translocación a través de la membrana

Basándose en las propiedades dinámicas de las proteínas de membrana, en 1972, S. Jonathan Singer y Garth Nicolson propusieron un *modelo de mosaico fluido* para explicar la organización fundamental de las membranas biológicas (Figura 12.30). Lo esencial de este modelo es que *las membranas son disoluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados*. La bicapa lipídica juega un doble papel: es a la vez un *disolvente* para las proteínas integrales de membrana y una *barrera de permeabilidad*. Las proteínas de membrana difunden libremente en el plano de la matriz lipídica (difusión lateral) a menos que se vean restringidas por interacciones específicas.

Aunque la difusión lateral de los componentes de membrana puede ser rápida, la translocación espontánea de los lípidos de un lado a otro de una membrana es un proceso muy lento. La transición de una molécula desde una superficie de la membrana a la otra se denomina *difusión transmembrana, o flip-flop* (Figura 12.31). La difusión transmembrana de moléculas de fosfolípidos en vesículas de fosfatidilcolina se ha medido directamente mediante técnicas de resonancia de spin electrónico, las cuales demuestran que una *molécula de fosfolípido difunde transversalmente una vez cada varias horas*. Así pues, una molécula de fosfolípido tarda 10^9 veces más tiempo en cruzar, por difusión transmembrana, una membrana de 50 \AA que lo que tarda en recorrer la misma distancia en dirección lateral. Las barreras de energía libre que se oponen a la difusión transmembrana de las moléculas proteicas son aún mayores que en el caso de los lípidos porque las proteínas tienen regiones polares más extensas. De hecho, nunca se ha observado difusión transversal de una molécula proteica. Debido a esto, *la asimetría de la membrana puede mantenerse durante largos períodos de tiempo*.

La fluidez de la membrana está controlada por la composición de sus ácidos grasos y su contenido en colesterol

Muchos procesos, como el transporte o la transducción de señales, dependen de la fluidez de los lípidos de la membrana, que a su vez depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos que pueden existir en un estado ordenado o rígido, o en uno relativamente desordenado o fluido. La transición de estado rígido a estado fluido se presenta bruscamente cuando la temperatura supera la temperatura de fusión, T_m

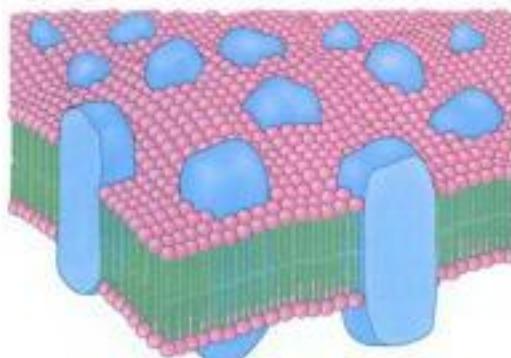


Figura 12.30 **Modelo de mosaico fluido.** [Basado en S. J. Singer y G. L. Nicolson, Science 175(1972):720-731.]

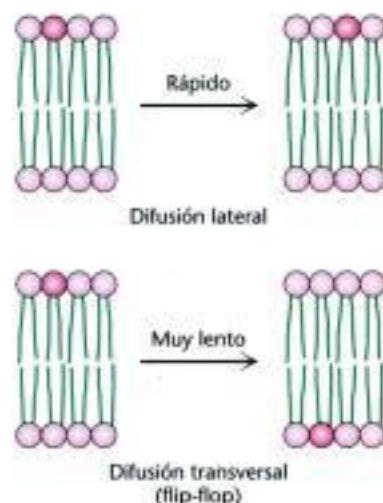


Figura 12.31 **Movimiento de lípidos en membranas.** La difusión lateral de los lípidos es mucho más rápida que la difusión transversal (flip-flop).

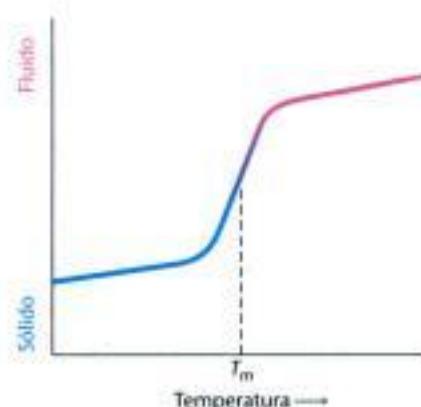


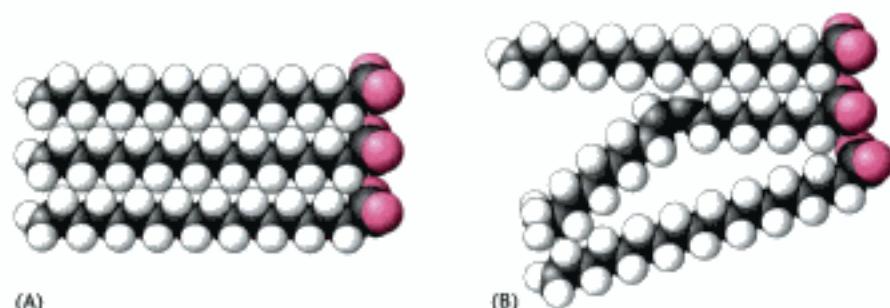
Figura 12.32 **Temperatura de la transición de fase o fusión (T_m) para un fosfolípido de membrana.** A medida que se aumenta la temperatura el fosfolípido de la membrana cambia desde un estado parecido a un sólido a otro más desordenado.

TABLA 12.3 Temperatura de fusión de fosfatidilcolina con un contenido de distintas parejas de ácidos grasos idénticos

Número de carbonos	Número de dobles enlaces	ÁCIDO GRASO		
		Nombre común	Nombre sistemático	T _m (°C)
22	0	Behenato	n-Docosanoato	75
18	0	Estearato	n-Octadecanoato	58
16	0	Palmitato	n-Hexadecanoato	41
14	0	Miristato	n-Tetradecanoato	24
18	1	Oleato	cis-Δ ⁹ -Octadecenoato	-22

(melting = fusión) (Figura 12.32). Esta temperatura de transición depende de la longitud de las cadenas de ácido graso y de su grado de insaturación (Tabla 12.3). El estado rígido viene favorecido por la presencia de residuos de ácidos saturados porque sus cadenas hidrocarbonadas rectas interaccionan muy favorablemente unas con otras. Por otro lado, un doble enlace *cis* produce un acodamiento en la cadena hidrocarbonada. Este codo interfiere con un empaquetamiento muy ordenado de los ácidos grasos, y, en consecuencia, T_m disminuye (Figura 12.33). La longitud de la cadena de los ácidos grasos afecta también a la temperatura de transición. Las cadenas hidrocarbonadas largas interaccionan mutuamente con más fuerza que las cortas. En concreto, cada grupo (CH₂) adicional contribuye favorablemente con unas -2 kJ mol⁻¹ (-0,5 kcal mol⁻¹) a la energía libre de interacción de dos cadenas hidrocarbonadas adyacentes.

Figura 12.33 Empaquetamiento de los ácidos grasos en la membrana. El empaquetamiento, altamente ordenado, de las cadenas de ácido graso queda perturbado por la presencia de dobles enlaces *cis*. Los modelos espaciales muestran el empaquetamiento de (A) tres moléculas de estearato (C₁₈ saturado) y (B) una molécula de oleato (C₁₈ insaturado) entre dos moléculas de estearato.



Las bacterias regulan la fluididad de la membrana variando el número de dobles enlaces y la longitud de las cadenas de sus ácidos grasos. Por ejemplo, en la membrana de *E. coli* la relación de los ácidos grasos saturados a los insaturados desciende de 1,6 a 1,0 cuando la temperatura del cultivo pasa de 42° a 27 °C. Esta disminución de la proporción de ácidos grasos saturados evita que la membrana se vuelva demasiado rígida a temperaturas inferiores.

En los animales, el colesterol es el principal regulador de la fluididad de las membranas. El colesterol consta de un voluminoso núcleo esteroideo con un grupo hidroxilo en un extremo y una cadena hidrocarbonada flexible en el otro. El colesterol se inserta en la bicapa con su eje longitudinal perpendicular al plano de la membrana. El grupo hidroxilo del colesterol forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del carbonilo de la cabeza de un fosfolípido, mientras que la cola hidrocarbonada del colesterol se localiza en la parte central, no polar de la bicapa. La distinta forma del colesterol comparada con la de los fosfolípidos perturba las interacciones regulares entre las cadenas de ácidos grasos. Además el colesterol parece formar complejos específicos con algunos fosfolípidos. Las estructuras resultantes se denominan a menudo *rafts* (balsas). Un resultado de estas interacciones es la modulación de la fluididad de membrana, haciendo a las membranas menos fluidas pero, al mismo tiempo, menos dispuestas a las transiciones de fase. Las estructuras autoorganizadas como las balsas lipídicas (o *rafts*) pueden tener un papel importante en la concentración de

proteínas que participan en las vías de señalización, aunque esta posibilidad es aún objeto de controversia.

Todas las membranas biológicas son asimétricas

Las membranas son estructural y funcionalmente asimétricas. Las superficies externa e interna de *todas las membranas biológicas conocidas tienen diferentes componentes y diferentes actividades enzimáticas*. Un ejemplo nítido lo suministra la bomba que regula la concentración de los iones Na^+ y K^+ en las células (Figura 12.34). Este sistema de transporte está localizado en la membrana plasmática de casi todas las células de los organismos superiores. El ensamblaje de la bomba de Na^+-K^+ está orientado en la membrana plasmática de tal manera que bombea Na^+ al exterior de la célula y K^+ hacia el interior. Además, el ATP tiene que estar en el interior de la célula para activar la bomba. La ouabaina, un inhibidor específico de la bomba, es eficaz solamente si está situado en el exterior. Explicaremos el mecanismo de esta bomba tan importante como efectiva así como la de otros integrantes de su familia en el Capítulo 13.

Las proteínas de membrana tienen una orientación determinada porque se sintetizan y se insertan de manera asimétrica. Esta asimetría absoluta se mantiene por la carencia de movimiento transmembrana de estas proteínas durante la vida de la membrana, y porque las membranas siempre se sintetizan por crecimiento de las ya existentes. También los lípidos se distribuyen asimétricamente como resultado de su propia biosíntesis, pero normalmente esta asimetría no es absoluta, excepto en el caso de los glicolípidos. Por ejemplo, en la membrana del eritrocito, las esfingomielinas y las fosfatidicolinas se sitúan con preferencia en la hoja externa de la bicapa, mientras que las fosfatidiletanolaminas y las fosfatidilserinas se sitúan en la hoja interna. En ambas hojas hay grandes cantidades de colesterol.

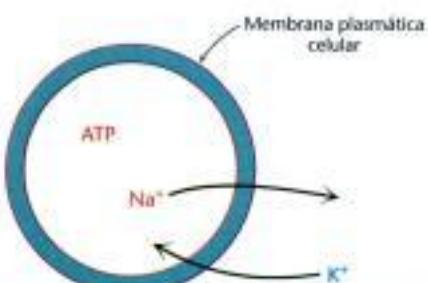


Figura 12.34 Asimetría del sistema de transporte Na^+-K^+ en membranas plasmáticas. El sistema de transporte Na^+-K^+ bombea Na^+ fuera de la célula y K^+ hacia el interior.

12.6 Las células eucarióticas contienen compartimientos delimitados por membranas internas

Hasta ahora hemos considerado sólo la membrana plasmática de las células. Muchas bacterias como *E. coli* tienen dos membranas separadas por una pared celular (formada por proteínas, péptidos e hidratos de carbono) que se encuentra entre ambas (Figura 12.35). La membrana interna actúa como barrera de permeabilidad, y la externa y la pared celular le proporcionan protección adicional. La membrana externa

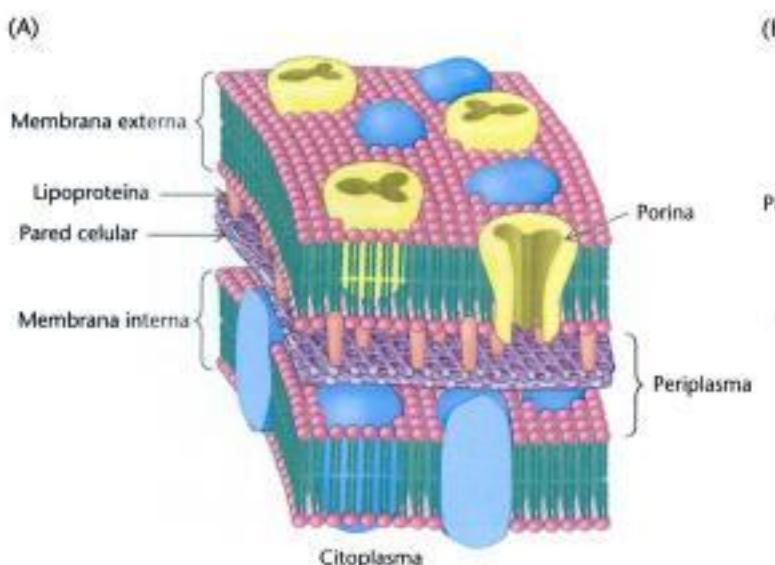


Figura 12.35 Membranas celulares de procariotas. Vista esquemática de la membrana de células bacterianas rodeadas por (A) dos membranas o (B) una membrana.

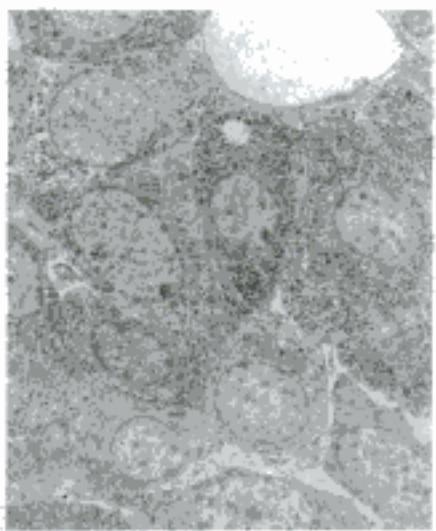


Figura 12.36 Membranas internas de eucariotas. Micrografía electrónica de una sección delgada de una célula secretora de hormonas de la hipófisis de rata, mostrando la presencia de estructuras internas unidas por membranas. [Biophoto Associates/Photo Researchers.]

es bastante permeable a las moléculas pequeñas debido a la presencia de porinas. La región comprendida entre las dos membranas y que contiene la pared celular recibe el nombre de *periplasma*.

Las células eucarióticas, con la excepción de las células vegetales, no tienen paredes celulares y sus membranas celulares consisten en una sola bicapa lipídica. En las células vegetales, la pared celular se sitúa en el exterior de la membrana plasmática. Las células de eucariotas se distinguen por la existencia de membranas en su interior formando compartimentos internos (Figura 12.36). Por ejemplo, los peroxisomas, los orgánulos que desempeñan el papel principal en la oxidación de ácidos grasos para obtener energía, se encuentran rodeados por una única membrana. Las mitocondrias, los orgánulos en los que se sintetiza el ATP, están rodeadas por dos membranas. Como en el caso de las bacterias, la membrana externa es bastante permeable a moléculas pequeñas, mientras que la membrana interna no lo es. Ciertamente, en la actualidad hay muchos indicios de que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias por *endosimbiosis* (p. 504). El núcleo también está rodeado por una membrana doble. Sin embargo, la *envoltura nuclear* no es continua sino que consta de un conjunto de membranas cerradas que se juntan en estructuras llamadas *poros nucleares*. Estos poros regulan el transporte de sustancias que entran y salen del núcleo. Las membranas nucleares están conectadas a otra estructura membranosa definida, el *retículo endoplásmico*, que desempeña diversos papeles en la célula, entre ellos la destoxicificación o eliminación de fármacos y la modificación de proteínas para la secreción. Así, una célula eucariota comprende compartimentos que interactúan entre sí y el transporte hacia dentro o hacia fuera de estos compartimentos es esencial para muchos procesos bioquímicos.

Las membranas deben ser capaces de separar o unir de forma que las células y sus compartimentos puedan captar, transportar y liberar moléculas. Muchas células captan las moléculas mediante el proceso denominado *endocitosis mediada por receptor* (Figura 12.37). En ella, una proteína o complejos mayores se unen inicialmente a un receptor localizado en la superficie celular. Tras la unión de la proteína, proteínas especializadas provocan la invaginación de la zona de la membrana alrededor de la proteína unida. La membrana invaginada finalmente se rompe y fusiona formando una vesícula.

La endocitosis mediada por receptor desempeña un papel clave en el metabolismo del colesterol (p. 745). Parte del colesterol de la sangre se encuentra formando un complejo lipoproteico llamada *lipoproteína de baja densidad* (LDL, del inglés "low density lipoprotein"). La LDL se une a un receptor específico, que es una proteína integral de membrana. El segmento de la membrana plasmática que contiene el complejo LDL-receptor de LDL se invagina y se desprende de la membrana. La LDL se separa del receptor, que se recicla y vuelve a la membrana en una vesícula distinta. La vesícula que contiene la LDL se fusiona con un *lisosoma*, un orgánulo que contiene un grupo de enzimas digestivas. El colesterol se libera dentro de la célula para ser almacenado, o para utilizarse en la biosíntesis de membranas y los restantes componentes proteicos se degradadan. Varias hormonas, proteínas transportadoras y anticuerpos utilizan la endocitosis mediada por receptor para entrar en la célula. Una consecuencia menos ventajosa es que esta vía también es utilizada por virus y toxinas para entrar en la célula. El proceso inverso, la fusión de una vesícula con la membrana es un paso clave de la liberación de neurotransmisores desde la neurona a la hendidura sináptica (Figura 12.38).

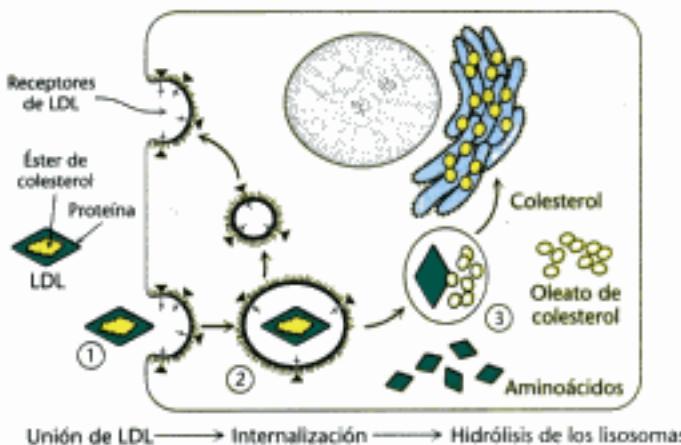


Figura 12.37 Endocitosis mediada por receptor. Se ilustra el proceso de endocitosis mediada por receptor para el complejo que transporta el colesterol, la lipoproteína de baja densidad (LDL): (1) La LDL se une a un receptor específico, el receptor de LDL; (2) este complejo se invagina y forma una vesícula interna; (3) tras la separación de su receptor, la vesícula que contiene LDL se fusiona con un lisosoma provocando la degradación de la LDL y la liberación del colesterol.

SNARE (proteína receptora del factor soluble de anclaje, sensible a *N*-etilmaleimida; *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) ayudan a dirigir a las membranas adecuadas a acercarse e iniciar el proceso de fusión. Estas proteínas, que están codificadas en todas las células eucarióticas por una familia de genes, determinan en gran medida el compartimiento con el que una vesícula fusionará. La especificidad de la fusión de membranas asegura el tráfico ordenado de las vesículas membranales y su transporte a través de células eucariotas.

Resumen

Las membranas biológicas son estructuras laminares, de un espesor de 60 a 100 Å, compuestas por moléculas de lípidos y proteínas que se mantienen unidas por medio de interacciones no covalentes. Las membranas son barreras de permeabilidad muy selectivas. Crean compartimientos cerrados que pueden ser células completas u órganulos dentro de la célula. Las proteínas de las membranas regulan las composiciones moleculares e iónicas de estos compartimientos. Las membranas también regulan el flujo de información entre las células.

12.1 Los ácidos grasos son componentes clave de los lípidos

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas de longitud y grado de insaturación variados que terminan en un grupo carboxílico. Las cadenas de ácido graso en las membranas contienen normalmente entre 14 y 24 átomos de carbono y pueden ser saturadas o insaturadas. Las longitudes de cadena más cortas y la insaturación aumentan la fluidez de los ácidos grasos y sus derivados al disminuir la temperatura de transición.

12.2 En las membranas hay tres tipos principales de lípidos

Las principales clases de lípidos de las membranas son los fosfolípidos, glicolípidos y el colesterol. Los fosfoglicéridos, un tipo de fosfolípido, contienen un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un alcohol fosforilado. La fosfatidilcolina, fosfatidilsíserina y fosfatidiletanolamina son los principales fosfoglicéridos. La esfingomielina, una clase diferente de fosfolípido, contiene un esqueleto de esfingosina en vez del de glicerol. Los glicolípidos son lípidos derivados de la esfingosina que contienen azúcares. El colesterol, que modula la fluidez de la membrana se construye a partir de un núcleo esteroideo. Una característica común de estos lípidos de membrana es que son moléculas anfipáticas, que tienen extremos hidrofílicos e hidrofóbicos.

12.3 Los fosfolípidos y glicolípidos forman fácilmente bicapas en medios acuosos

Los lípidos de membrana forman espontáneamente bicapas extensas en disoluciones acuosas. Las fuerzas que dirigen la formación de membranas son las interacciones hidrofóbicas entre las colas de los ácidos grasos de los lípidos de membrana. Los grupos hidrofílicos de las cabezas interactúan con el medio acuoso. Las bicapas lipídicas son estructuras cooperativas que se mantienen juntas mediante muchos enlaces débiles. Estas bicapas son altamente impermeables a los iones y a la mayoría de las moléculas polares, aunque son muy fluidas, lo que les permite actuar como disolvente de las proteínas de membrana.

12.4 Las proteínas llevan a cabo la mayoría de los procesos que tienen lugar en las membranas

Proteínas específicas facilitan distintas funciones en las membranas como el transporte, la comunicación y la transducción de energía. Muchas proteínas integrales de membrana atraviesan la bicapa lipídica, mientras que otras están parcialmente integradas en la membrana. Las proteínas periféricas de mem-



Figura 12.38 Liberación de neurotransmisores. Las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores se disponen cerca de la membrana plasmática de una neurona. Las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana plasmática y liberan el neurotransmisor al espacio sináptico. [T. Reese / Don Fawcett / Photo Researchers.]

brana están unidas a las superficies de las membranas a través de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Las proteínas que atraviesan la membrana tienen estructuras regulares, incluyendo láminas β , aunque las hélices α son las estructuras más comunes de entre las que atraviesan la membrana. Secuencias con 20 aminoácidos consecutivos no polares pueden servir para el diagnóstico de las regiones de hélices α transmembrana en la proteína.

12.5 Los lípidos y muchas proteínas difunden rápidamente en el plano de la membrana

Las membranas son estructural y funcionalmente asimétricas, como se ve por la presencia de residuos de azúcar exclusivamente en la superficie externa de la membrana plasmática de los mamíferos. Las membranas son estructuras dinámicas en las que las proteínas y los lípidos difunden rápidamente en el plano de la membrana (difusión lateral), a menos que se vean restringidos por interacciones especiales. Por el contrario, el movimiento de los lípidos desde una cara de la membrana a la otra (difusión transmembrana o flip-flop) es generalmente muy lento. Las proteínas no se translocaan a través de la membrana; así se puede conservar la asimetría. El grado de fluidez de una membrana depende parcialmente de la longitud de la cadena de sus lípidos y del grado en que estén insaturados sus ácidos grasos constituyentes. En los animales, el contenido en colesterol también regula la fluidez de la membrana.

12.6 Las células eucarióticas contienen compartimientos delimitados por membranas internas

En eucariotas, una extensa distribución de membranas internas crea compartimentos dentro de la célula para realizar distintas funciones bioquímicas. Por ejemplo, tanto el núcleo, donde se localiza la mayor parte del material genético de la célula, como las mitocondrias, donde se ubica la mayor parte de la síntesis del ATP, están rodeados por una membrana doble. Una membrana única rodea los otros compartimentos internos, como el retículo endoplásmico. Algunos compartimentos pueden intercambiar material a través de procesos como el de fusión o el de gemación.

Términos clave

fosfoglicérido (p. 322)
ácido graso (p. 327)
fosfolípido (p. 329)
esfingosina (p. 329)
esfingomielina (p. 330)
colesterol (p. 331)
glicolípido (p. 331)
cerebrósido (p. 331)

gangliósido (p. 331)
molécula antipática (p. 332)
bicapa lipídica (p. 333)
liposoma (p. 334)
proteína integral de membrana (p. 336)
proteína periférica de membrana (p. 336)
representación hidropática (p. 341)
difusión lateral (p. 342)

modelo del mosaico fluido (p. 343)
balsas lipídicas (*rafts*) (p. 344)
endocitosis mediada por receptor (p. 346)
proteínas SNARE (proteína receptora del factor soluble de anclaje, sensible a *N*-etilmaleimida) (p. 347)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- De Weer, P., 2000. A century of thinking about cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 919-926.
Bretscher, M. S., 1985. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253(4): 100-108.
Unwin, N. y Henderson, R., 1984. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250(2): 78-94.
Deisenhofer, J. y Michel, H., 1989. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J.* 8: 2149-2170.
Singer, S. J. y Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.

Jacobson, K., Sheets, E. D. y Simson, R., 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268: 1441-1442.

Libros

- Gennis, R. B., 1989. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer Verlag.
Vance, D. E. y Vance, J. E. (Eds.), 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. Elsevier.
Lipowsky, R. y Sackmann, E., 1995. *The structure and dynamics of membranes*. Elsevier.
Racker, E., 1985. *Reconstitutions of Transporters, Receptors, and Pathological States*. Academic Press.

Tanford, C., 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* (2d ed.). Wiley-Interscience.

Dinámica y lípidos de membrana

- Simons, K. y Vaz, W. L., 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 269-295.
- Anderson, T. G. y McConnell, H. M., 2002. A thermodynamic model for extended complexes of cholesterol and phospholipid. *Biophys. J.* 83: 2039-2052.
- Saxton, M. J. y Jacobson, K., 1997. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 373-399.
- Bloom, M., Evans, E., Mouritsen, O. G., 1991. Physical properties of the fluid lipid bilayer component of cell membranes: A perspective. *Q. Rev. Biophys.* 24: 293-397.
- Elson, E. L., 1986. Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 40: 367-383.
- Zachowski, A. y Devaux, P. E., 1990. Transmembrane movements of lipids. *Experientia* 46: 644-656.
- Devaux, P. E., 1992. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 417-439.
- Silvius, J. R., 1992. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 323-348.
- Yeagle, P. L., Albert, A. D., Boesze-Battaglia, K., Young, J. y Frye, J., 1990. Cholesterol dynamics in membranes. *Biophys. J.* 57: 413-424.
- Nagle, J. F. y Tristram-Nagle, S., 2000. Lipid bilayer structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 474-480.
- Dowhan, W., 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199-232.
- Huibregts, R. P. H., de Kroon, A. I. P. M. y de Kruijff, B., 1998. Rapid transmembrane movement of newly synthesized phosphatidylethanolamine across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273: 18936-18942.

Estructura de proteínas de membrana

- Walton, P., Cross, T. A. y Jap, B. K., 2004. Structural genomics of membrane proteins. *Genome Biol.* 5: 215.
- Werten, P. J., Remigy, H. W., de Groot, B. L., Fotiadis, D., Philippse, A., Stahlberg, H., Grubmüller, H. y Engel, A., 2002. Progress in the analysis of membrane protein structure and function. *FEBS Lett.* 529: 65-72.
- Popot, J.-L. y Engelman, D. M., 2000. Helical membrane protein folding, stability and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 881-922.

White, S. H. y Wimley, W. C., 1999. Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 319-365.

Munissi, F. M. y Opella, S. J., 1998. NMR structural studies of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 640-648.

Lipowsky, R., 1991. The conformation of membranes. *Nature* 349: 475-481.

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H. G. y Hubbell, W. L., 1990. Transmembrane protein structure: Spin labeling of bacterio-rhodopsin mutants. *Science* 248: 1088-1092.

Fasman, G. D. y Gilbert, W. A., 1990. The prediction of transmembrane protein sequences and their conformation: An evaluation. *Trends Biochem. Sci.* 15: 89-92.

Jennings, M. L., 1989. Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 999-1027.

Engelman, D. M., Steitz, T. A. y Goldman, A., 1986. Identifying non-polar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15: 321-353.

Underhill, S. y Kodukola, K., 1995. How glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 563-591.

Membranas intracelulares

Skehel, J. J. y Wiley, D. C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 531-569.

Roth, M. G., 1999. Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* 9: 174-179.

Jahn, R. y Sudhof, T. C., 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 863-911.

Stroud, R. M. y Walter, P., 1999. Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 754-759.

Teter, S. A. y Kliansky, D. J., 1999. How to get a folded protein across a membrane. *Trends Cell Biol.* 9: 428-431.

Hettema, E. H., Distel, B. y Tahak, H. E., 1999. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1451: 17-34.

Fusión de membranas

Sollner, T. H. y Rothman, J. E., 1996. Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. *Experientia* 52: 1021-1025.

Ungar, D. y Hughson, F. M., 2003. SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 493-517.

Problemas

1. **Densidad de población.** ¿Cuántas moléculas de fosfolípidos hay en una región de $1 \mu\text{m}^2$ de bicapa lípida? Suponer que cada molécula de fosfolípido ocupa un área superficial de 70 \AA^2 .

2. **Difusión lípida.** ¿Qué distancia promedio atravesará un lípido de membrana en $1 \mu\text{s}$, 1 ms y 1 s ? Suponer un coeficiente de difusión de $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

3. **Difusión de las proteínas.** El coeficiente de difusión, D , de una molécula esférica rígida viene dado por

$$D = kT/6\pi\eta r$$

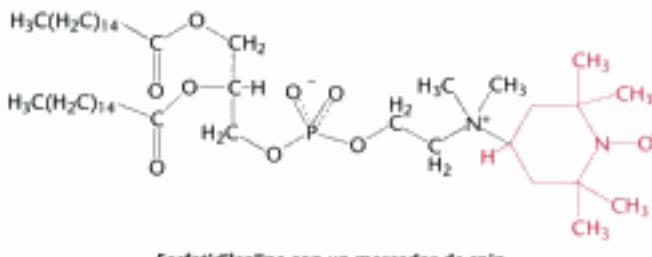
en la que η es la viscosidad del disolvente, r es el radio de la esfera, k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-16} \text{ erg grado}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta. ¿Cuál es el coeficiente de difusión a 37°C de una proteína de 100 kd en una membrana que tiene una viscosidad

efectiva de 1 poise (1 poise = $1 \text{ erg s}^{-1} \text{ cm}^{-3}$)? ¿Qué distancia promedio atravesará esta proteína en $1 \mu\text{s}$, 1 ms y 1 s ? Suponer que esta proteína es una esfera rígida, no hidratada de densidad $1,35 \text{ g cm}^{-3}$.

4. **Sensibilidad al frío.** Algunos antibióticos actúan como transportadores que se unen a un ion en una cara de la membrana, difunden a través de la membrana y liberan el ion al otro lado. La conductancia de la bicapa lípida de las membranas que contienen este tipo de antibiótico transportador disminuye bruscamente cuando se baja la temperatura de 40°C a 36°C . Por el contrario, se experimenta un cambio de conductancia con la temperatura muy pequeño si la misma bicapa contiene un antibiótico del tipo de los que forman conductos iónicos. ¿Por qué?

5. **Flip-flop.** La difusión transversal de los fosfolípidos en la bicapa de la membrana se investigó empleando un análogo paramagnético

de la fosfatidilcolina, o sea, una fosfatidilcolina con un marcador de spin.



El grupo nitróxido (NO) es el marcador de spin que se utiliza y le confiere a la fosfatidilcolina marcada un espectro de resonancia paramagnética característico. Este espectro desaparece cuando los nitróxidos se convierten en aminas mediante agentes reductores como el ascorbato.

Se prepararon por ultrasonación vesículas lipídicas que contenían un 95% de fosfatidilcolina y un 5% del análogo con el marcador de spin y se purificaron por cromatografía de filtración por gel. El diámetro externo de estos liposomas era de unos 250 Å (25 nm). La amplitud del espectro de resonancia paramagnética disminuyó a un 35% de su valor inicial en unos pocos minutos tras la adición del ascorbato. No se produjo ningún cambio detectable en el espectro, a lo largo de varios minutos, tras la adición de una segunda dosis de ascorbato. Sin embargo, la amplitud del espectro residual caía exponencialmente con un tiempo de vida medio de 6,5 horas. ¿Cómo se pueden interpretar estos cambios en la amplitud del espectro paramagnético?

6. *Flip-flop 2.* Aunque las proteínas muy raramente atraviesan las membranas por flip-flop, la distribución de los lípidos de membrana entre las dos caras de la misma no es absoluta excepto en el caso de los glicolípidos. ¿Por qué los lípidos glicosilados son menos capaces de realizar flip-flop?

7. *Cis o trans.* ¿Por qué la mayor parte de los ácidos grasos insaturados se encuentran en los fosfolípidos en configuración cis en lugar de trans? Dibujar la estructura de un ácido graso de 16 carbonos (a) saturado, (b) *trans*-monoinsaturado y (c) *cis*-monoinsaturado?

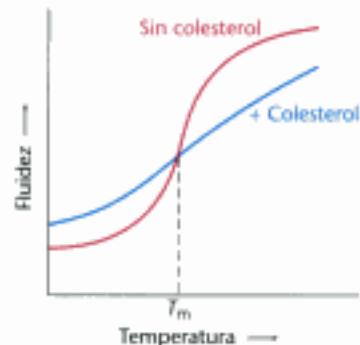
8. *Una cuestión de competición.* ¿Sería un homopolímero de alanina más propenso a formar una hélice α en agua o en un medio hidrófobico? Dar una explicación.

9. *Mantenimiento de la fluidez.* Un cultivo de bacterias cultivadas a 37 °C se pasa a 25 °C. ¿Sería de esperar que este cambio en la temperatura de cultivo alterase la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana? Dar una explicación.

10. *Contemos las posibilidades.* Cada fusión intracelular de una vesícula con la membrana requiere una proteína SNARE en la vesícula (llamada v-SNARE) y una proteína en la membrana diana (llamada t-SNARE). Asumiendo que el genoma codifica 21 miembros de la familia v-SNARE y 7 de la t-SNARE y suponiendo que no existe ninguna especificidad, ¿cuántas interacciones potenciales pueden tener lugar entre las v-SNARE y las t-SNARE?

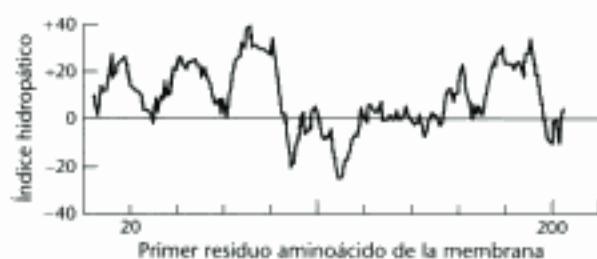
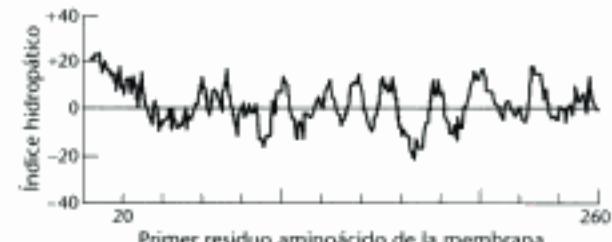
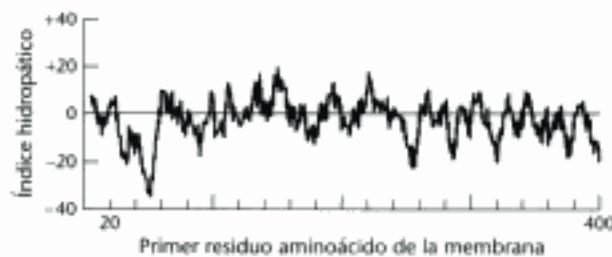
Problemas de interpretación de datos

11. *Efectos del colesterol.* La línea roja de la siguiente gráfica muestra la fluidez de los ácidos grasos de una bicapa fosfolipídica en función de la temperatura. La línea azul muestra la fluidez en presencia de colesterol.



- (a) ¿Cuál es el efecto del colesterol?
 (b) ¿Por qué puede ser este efecto biológicamente importante?

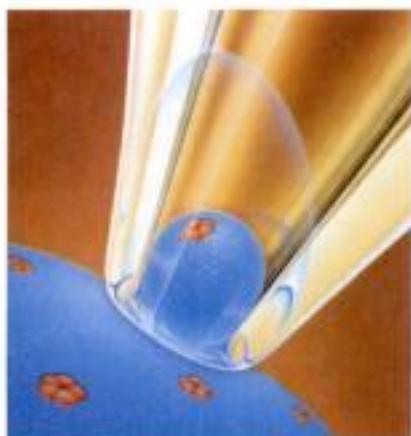
12. *Representaciones hidropáticas.* A partir de las representaciones hidropáticas para tres proteínas, predecir cuál sería una proteína de membrana. ¿Cuáles son las ambigüedades a la hora de utilizar estas representaciones para determinar si una proteína es una proteína de membrana?



Problema de integración del capítulo

13. *El entorno apropiado.* La comprensión de la estructura y función de las proteínas de membrana se ha retrasado respecto al de otros tipos de proteínas. La razón principal es que las proteínas de membrana son más difíciles de purificar y cristalizar. ¿Por qué puede ser esto?

Conductos y bombas de membrana



El flujo de iones a través de un único conducto iónico (los conductos se muestran en rojo en la ilustración de la izquierda) puede detectarse por la técnica de patch-clamp, que registra los cambios de corriente a medida que el conducto oscila entre los estados abierto y cerrado. [(Izquierda) Tomado de E. Neher y B. Sakmann. The patch-clamp technique. Derechos reservados ©1992 Scientific American Inc. Todos los derechos reservados. (Derecha) Cortesía del Dr. Mauricio Montal.]

Como ya se comentó en el Capítulo 12, la bicapa lipídica de las membranas biológicas, es intrínsecamente impermeable a los iones y a las moléculas polares aunque dichas especies deben ser capaces de cruzar estas membranas para asegurar una función celular normal. La permeabilidad se la confieren dos clases de proteínas de membrana, las *bombas* y los *conductos*. Las bombas utilizan una fuente de energía libre como el ATP o la luz para impulsar el transporte de iones o moléculas en condiciones termodinámicamente desfavorables. La acción de las bombas es un ejemplo de *transporte activo*. Los conductos, por el contrario, facilitan el flujo rápido de iones a través de la membrana a favor de gradiente. La acción de los conductos ilustra el *transporte pasivo* o *difusión facilitada*.

Las bombas son transductores de energía, pues transforman una forma de energía libre en otra. Dos tipos de bombas dirigidas por ATP, las ATPasas de tipo P y las bombas con dominio de unión a ATP (transportadores ABC o ATPasas tipo A), sufren cambios conformacionales al unirse e hidrolizarse el ATP, lo que provoca que un ion unido se transporte a través de la membrana. Un mecanismo diferente de transporte activo utiliza el gradiente de un ion para promover el transporte activo de otro. Un ejemplo de estos *transportadores secundarios* lo constituye el transportador de lactosa de *E. coli*, una proteína bien estudiada responsable de la toma por parte de la bacteria de un azúcar específico del entorno. En las membranas de nuestras células se encuentran presentes muchos transportadores de esta clase. La expresión de estos transportadores determina los metabolitos que una célula puede importar de su entorno. Por tanto, el ajuste del nivel de expresión del transportador es una forma primaria de control del metabolismo.

Las bombas pueden establecer gradientes persistentes de iones concretos a través de las membranas. *Conductos iónicos* específicos pueden permitir a estos iones fluir rápidamente a través de las membranas a favor de sus gradientes. Estos conductos se sitúan dentro de las moléculas más fascinantes en bioquímica por su capacidad de

Contenido

- 13.1 El transporte de moléculas a través de las membranas puede ser activo o pasivo
- 13.2 Dos familias de proteínas de membrana emplean la hidrólisis del ATP para bombejar iones y moléculas a través de las membranas
- 13.3 La lactosa permeasa es un arquetipo de transportadores secundarios que utilizan un gradiente de concentración para potenciar la formación de otro gradiente
- 13.4 Conductos específicos pueden realizar rápidamente el transporte de iones a través de las membranas
- 13.5 Los nexus ("gap junctions") permiten el flujo de iones y moléculas pequeñas entre células comunicantes
- 13.6 Unos conductos específicos aumentan la permeabilidad al agua de algunas membranas

permitir a algunos iones fluir libremente a través de la membrana mientras se bloquea el flujo de otras especies incluso de las estrechamente relacionadas. Estos conductos iónicos de apertura controlada desempeñan un papel crucial en el funcionamiento de nuestro sistema nervioso, actuando como interruptores que permiten el flujo rápido de la corriente.

Concluiremos el capítulo con una discusión sobre una clase de conducto diferente: el conducto intercelular o *nexus* ("gap junction") que permite el flujo de metabolitos o iones *entre células*. Por ejemplo, los nexus son responsables de la sincronización en la contracción de las células del músculo del corazón asociadas al latido.

La expresión de los transportadores define en gran medida la actividad metabólica de un determinado tipo celular

Cada tipo celular expresa un conjunto específico de transportadores en su membrana plasmática. El conjunto de transportadores expresado es crucial ya que éstos determinan en gran medida la composición iónica en el interior de las células y los compuestos que la célula puede captar del medio ambiente. En cierto sentido, la variedad de los transportadores expresados por una célula determina las características celulares porque una célula puede ejecutar sólo aquellas reacciones bioquímicas para las que ha captado los sustratos.

Un ejemplo relacionado con el metabolismo de la glucosa puede ilustrar este punto. Como veremos en el Capítulo 16 donde estudiaremos el metabolismo de la glucosa, los tejidos difieren en su capacidad para emplear diferentes moléculas como fuentes energéticas. La utilización de la glucosa por unos tejidos concretos está gobernada, en gran parte, por la expresión en diferentes tipos celulares de diversos miembros de una familia de transportadores homólogos de la glucosa denominados GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT5. El GLUT3 por ejemplo, se expresa sólo en las neuronas y unos pocos tipos celulares diferentes. Este transportador, une glucosa estrechamente de forma que estas células captan preferentemente la glucosa cuando está presente a bajas concentraciones. Este es sólo el primero de muchos ejemplos que encontraremos que demuestran el papel crítico que juega la expresión de un transportador en el control e integración del metabolismo.

13.1 El transporte de moléculas a través de las membranas puede ser activo o pasivo

Vamos a considerar, inicialmente, algunos principios generales sobre el transporte a través de membranas. Hay dos factores que determinan si una molécula atravesará una membrana: (1) la permeabilidad de la molécula a través de una bicapa lipídica y (2) la disponibilidad de una fuente energética.

Muchas moléculas requieren proteínas transportadoras para atravesar las membranas

Como se estudió en el Capítulo 12, algunas moléculas pueden atravesar las membranas celulares porque son solubles en la bicapa lipídica. Dichas moléculas se denominan *moléculas lipofílicas*. Un ejemplo fisiológico de dicho tipo de moléculas son las hormonas esteroideas. Estas moléculas relacionadas con el colesterol pueden atravesar una membrana interpuesta en su camino, pero ¿qué es lo que determina la dirección en la que van a moverse? Estas moléculas se moverán a favor del gradiente de concentración en un proceso denominado *difusión simple*. De acuerdo con la Segunda Ley de la Termodinámica las moléculas se desplazan espontáneamente desde la región de mayor a la de menor concentración.

La situación se hace más compleja cuando la molécula es altamente polar. Por ejemplo, los iones sodio están a una concentración de 143 mM fuera de la célula y 14 mM dentro; aún así el sodio no entra libremente en la célula porque el ion, de-

bido a su carga positiva, no puede atravesar el interior hidrofóbico de la membrana. En algunas circunstancias, como durante la transmisión del impulso nervioso, los iones sodio deben entrar en la célula. ¿Cómo lo hacen? Los iones sodio pasan a través de conductos específicos en la membrana constituidos por proteínas de membrana. Esta forma de atravesar la membrana se llama *difusión facilitada* porque la difusión a través de la membrana se ve facilitada por la existencia de esos conductos. Recibe también el nombre de *transporte pasivo*, porque la energía que dirige el desplazamiento del ion es el propio gradiente iónico, sin ninguna contribución por parte del sistema de transporte. Los conductos, al igual que los enzimas, muestran especificidad en el sentido de que facilitan el transporte de algunos iones pero no de otros iones aunque estén estrechamente relacionados.

¿Cómo se establece el gradiente de sodio inicial? En este caso, el sodio debe moverse o bombearse *en contra* del gradiente de concentración. Ya que desplazar los iones desde una zona de baja a otra de alta concentración produce una disminución de la entropía se requiere un aporte energético. Los transportadores proteicos que se encuentran en la membrana son capaces de emplear una fuente energética para desplazar la molécula en contra del gradiente de concentración. Debido a que se requiere un aporte de otra fuente energética, esta forma de atravesar la membrana recibe el nombre de *transporte activo*.

Se puede cuantificar la energía libre almacenada en los gradientes de concentración

Una desigualdad en la distribución de las moléculas es una situación rica en energía porque la energía libre se reduce al mínimo cuando todas las concentraciones se igualan. En consecuencia, para conseguir dicha distribución desigual de las moléculas, llamada gradiente de concentración, se requiere un aporte de energía libre. ¿Podemos cuantificar la cantidad de energía requerida para generar un gradiente de concentración (Figura 13.1)? Consideraremos una molécula de soluto no cargada. El cambio en la energía libre al transportar esta especie desde el extremo 1, donde está presente a una concentración c_1 , al extremo 2, donde está presente a concentración c_2 , es:

$$\Delta G = RT \ln(c_2/c_1) = 2,303 RT \log_{10}(c_2/c_1)$$

donde R es la constante de los gases ($8,315 \times 10^{-3}$ kJ mol $^{-1}$ o $1,987 \times 10^{-3}$ kcal mol $^{-1}$) y T es la temperatura en grados Kelvin. Para una especie cargada, debe considerarse también el potencial eléctrico que se genera a través de la membrana porque los iones serán repelidos por las cargas del mismo signo. La suma de los términos de concentración y eléctrico se denomina *potencial electroquímico*. El cambio de energía libre viene dado por:

$$\Delta G = RT \ln(c_2/c_1) + ZF\Delta V = 2,303 RT \log_{10}(c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

donde Z es la carga eléctrica de la especie transportada, ΔV es el potencial en voltios a través de la membrana y F es la constante de Faraday [equivalente a $96,5$ kJ V $^{-1}$ mol $^{-1}$ (o $23,062$ kcal V $^{-1}$ mol $^{-1}$)].

Un proceso de transporte es activo cuando ΔG es positivo, mientras que es pasivo cuando ΔG es negativo. Consideremos por ejemplo el transporte de una molécula no cargada desde $c_1 = 10^{-3}$ M a $c_2 = 10^{-1}$ M.

$$\begin{aligned} \Delta G &= 2,303RT \log_{10}(10^{-1}/10^{-3}) \\ &= 2,303 \times 8,315 \times 298 \times 2 \\ &= +11,4 \text{ kJ mol}^{-1} (+2,7 \text{ kcal mol}^{-1}) \end{aligned}$$

A 25°C (298 K), ΔG es $+11,4$ kJ mol $^{-1}$ ($+2,7$ kcal mol $^{-1}$), lo que indica que este proceso de transporte requiere el suministro de energía libre.

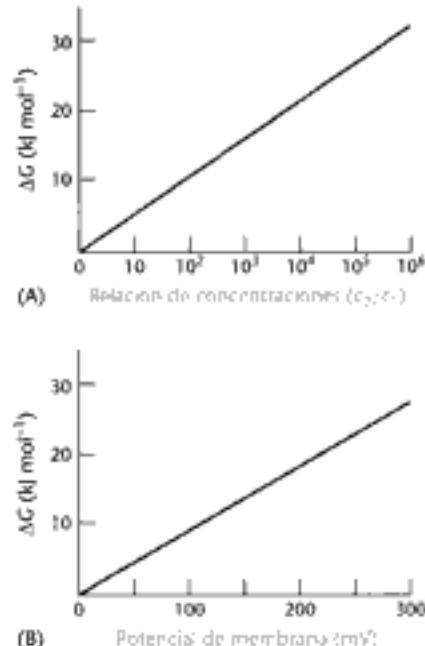


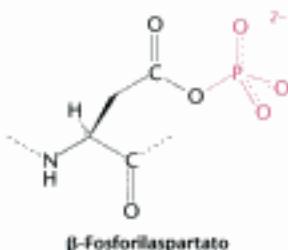
Figura 13.1 Energía libre y transporte. Variación de la energía libre en el transporte de: (A) un soluto no cargado desde un compartimiento, en el que está a concentración c_1 , a otro con concentración c_2 (B) una especie cargada a través de la membrana y que se dirige hacia el extremo en el que existe la misma carga que la del ion transportado. Obsérvese que el cambio de energía libre impuesto por un potencial de membrana de 59 mV es equivalente al producido por un ion de carga unidad cuya relación de concentraciones es $c_2/c_1 = 10$, a 25°C .

13.2 Dos familias de proteínas de membrana emplean la hidrólisis del ATP para bombear iones y moléculas a través de las membranas

El fluido extracelular de las células animales tiene una concentración salina similar a la del agua del mar. Sin embargo, las células deben controlar sus concentraciones intracelulares de sal para prevenir interacciones desfavorables con altas concentraciones de iones como el Ca^{2+} y para facilitar procesos específicos. Por ejemplo, la mayoría de las células animales contienen una alta concentración de K^+ y una baja concentración de Na^+ en relación a la del medio externo. Estos gradientes iónicos se generan por un sistema de transporte específico, un enzima que se llama *bomba de Na^+ y K^+* o *ATPasa de Na^+-K^+* . La hidrólisis de ATP por parte de la bomba suministra la energía necesaria para el transporte activo de salida de Na^+ y entrada de K^+ que genera el gradiente. La bomba recibe el nombre de *ATPasa de Na^+-K^+* porque la hidrólisis de ATP tiene lugar sólo cuando el Na^+ y el K^+ están presentes. Además, esta ATPasa, como todos estos enzimas, requiere Mg^{2+} .

Se puede calcular el cambio en energía libre asociado al transporte de Na^+ y K^+ . Supongamos que las concentraciones de Na^+ fuera y dentro de la célula son respectivamente 143 y 14 mM y que los valores correspondientes para el K^+ son 4 y 157 mM. A un potencial de membrana de -50 mV y una temperatura de 37°C , podemos emplear la ecuación de la página 353 para determinar el cambio de energía libre cuando se transportan 3 Na^+ fuera de la célula y 2 K^+ dentro será $3(5,99) + 2(9,46) 5 + 36,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+8,8 \text{ kcal mol}^{-1}$). La hidrólisis de una sola molécula de ATP por ciclo de transporte, en condiciones celulares típicas, suministra suficiente energía libre, aproximadamente -50 kJ mol^{-1} ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$), para dirigir el transporte de estos iones en contra de gradiente. El transporte activo de Na^+ y K^+ es de gran importancia fisiológica. De hecho, más de la tercera parte del ATP consumido por un animal en reposo se utiliza para bombear estos iones. El gradiente de Na^+ y K^+ en las células animales controla el volumen celular, permite que las células nerviosas y musculares sean eléctricamente excitables y dirige el transporte activo de los azúcares y aminoácidos.

 La posterior purificación de otras bombas de iones ha revelado una gran familia de bombas de iones relacionadas desde el punto de vista evolutivo, que incluyen proteínas de bacterias, árqueas y todos los eucariotas. Estas bombas son específicas para una serie de diversos tipos de iones. De particular interés son la ATPasa de Ca^{2+} , el enzima que transporta el Ca^{2+} fuera del citoplasma y al retículo sarcoplasmico de las células musculares, y la ATPasa gástrica de H^+-K^+ , el enzima responsable de bombear suficientes protones al estómago para bajar el pH por debajo de 1,0. Estos enzimas y los cientos de homólogos conocidos, que incluyen la ATPasa de Na^+-K^+ se clasifican como *ATPases tipo P* porque forman un intermediario fosforilado clave. En la formación de este intermediario, un grupo fosforilo que se obtiene de la hidrólisis del ATP, se une a la cadena lateral de un residuo de aspartato específico conservado en la ATPasa para formar fosfoaspartato.



Las ATPases tipo P acoplan la fosforilación y los cambios conformacionales para bombear iones calcio a través de las membranas

Las bombas de membrana funcionan mediante mecanismos básicamente sencillos, pero a menudo complejos en el detalle. Fundamentalmente, cada bomba proteica puede existir en dos estados conformacionales principales, uno con los centros de unión a los iones abiertos a un lado de la membrana y el otro con estos centros abiertos hacia el otro lado (Figura 13.2). Para bombear iones en una sola dirección a través de la membrana, se debe suministrar energía libre de tal manera que se pueda acoplar a la interconversión entre estos dos estados conformacionales.

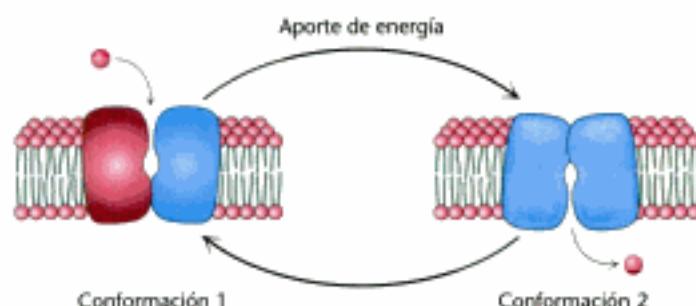


Figura 13.2 Acción de una bomba. Esquema sencillo del bombeo de una molécula a través de la membrana. La bomba cambia su conformación entre dos estados, cada uno de ellos con los centros de unión accesibles a un lado distinto de la membrana.

Consideraremos las características estructurales y mecanísticas de las ATPasas tipo P examinando la ATPasa de Ca^{2+} localizada en el retículo sarcoplasmico (*ATPasa SR de Ca^{2+}* o *SERCA*) de las células musculares. Las propiedades de este miembro de la familia se han establecido detalladamente basándose en las estructuras cristalinas de la bomba en cinco estados distintos. Este enzima, que constituye el 80% de las proteínas de la membrana del retículo sarcoplasmico, desempeña un papel importante en la contracción muscular, que se dispara por un aumento brusco del nivel de calcio en el citoplasma. La relajación muscular depende del bombeo rápido de Ca^{2+} desde el citoplasma al retículo sarcoplasmico, un compartimiento especializado en el almacenamiento de calcio, mediante la SERCA. Esta bomba mantiene una concentración de Ca^{2+} de aproximadamente $0.1 \mu\text{M}$ en el citoplasma comparado con el valor de 1.5 mM en el retículo sarcoplasmico.

La primera estructura de SERCA que se estableció tenía unido Ca^{2+} en ausencia de nucleótidos (Figura 13.3). SERCA es un polipéptido sencillo de 110 kd con un dominio transmembrana que consiste en 10 hélices α . El dominio transmembrana incluye los centros de unión de los dos iones calcio. Cada ion calcio está coordinado con siete átomos de oxígeno que proceden de una combinación de residuos de las cadenas laterales de glutamato, aspartato, treonina y asparagina, de grupos carbonilo del esqueleto y de moléculas de agua. Cerca de la mitad de la masa molecular de la proteína está constituida por una gran cabeza citoplasmática que contiene tres dominios distintos. Los tres dominios citoplasmáticos de SERCA tienen funciones distintas. Un dominio (N) une el nucleótido ATP, otra (P) acepta el grupo fosforilo en un residuo conservado de aspartato y el tercero (A) sirve como activador, conectando los cambios en los dominios N y P con la parte transmembrana del enzima.

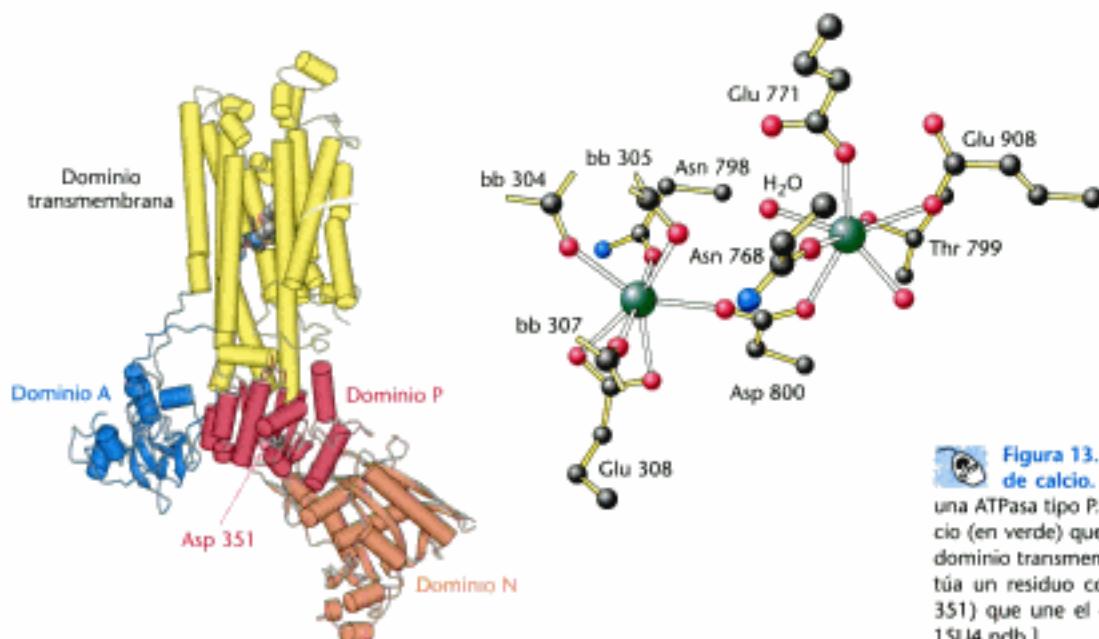


Figura 13.3 Estructura de una bomba de calcio. Estructura global de SERCA, una ATPasa tipo P. Obsérvense los dos iones calcio (en verde) que se localizan en el centro del dominio transmembrana. En el dominio P se sitúa un residuo conservado de aspartato (Asp 351) que une el grupo fosforilo. [Tomado de 1SU4.pdb.]

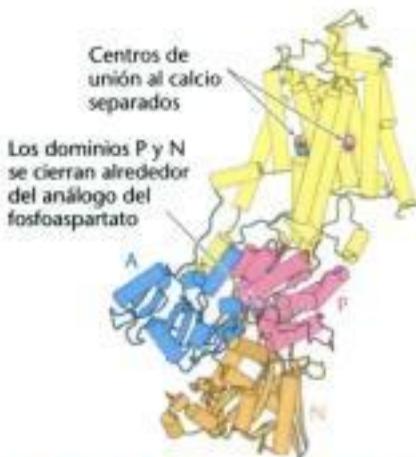


Figura 13.4 Cambios conformacionales asociados con el bombeo de calcio. Esta estructura se determinó en ausencia de calcio unido y con un análogo del fosfoaspartato presente en el dominio P. Obsérvese la diferencia con la Figura 13.3 en la que la proteína tenía iones calcio unidos; tanto la parte transmembrana (en amarillo) como los dominios A, P y N han sufrido una fuerte reorganización. [Tomado de 1WPG.pdb.]

La estructura de SERCA es tremadamente dinámica. Por ejemplo, en la figura 13.4 se muestra la estructura de SERCA sin Ca^{2+} unido y con el análogo del fosfoaspartato presente en el dominio P. Los dominios N y P se cierran alrededor del análogo del fosfoaspartato y el dominio A muestra una rotación notable con respecto a la posición que tenía en la Figura 13.3 en la que SERCA tenía Ca^{2+} unido y no existía análogo fosfoaspartato. Además, la parte transmembrana del enzima ha sufrido una reorganización sustancial y los centros de unión a Ca^{2+} , que mostraban una gran organización, se han separado. Estos centros son ahora accesibles desde el lado de la membrana opuesto a los dominios N, P y A.

Los resultados estructurales se pueden combinar con otros estudios para construir el mecanismo detallado del bombeo de Ca^{2+} por SERCA (Figura 13.5).

1. La reacción cíclica propuesta se inicia con el enzima en su forma desfosforilada y con dos iones calcio unidos. Nos referiremos a la conformación del enzima en este estado como E_1 ; con el Ca^{2+} unido será el $E_1-(\text{Ca}^{2+})_2$. En esta conformación, SERCA puede intercambiar iones calcio pero sólo con los iones calcio de la cara citoplásatica de la membrana. Esta conformación se muestra en la Figura 13.3.

2. En la conformación E_1 , el enzima puede unirse al ATP. Los dominios N, P y A sufren un fuerte cambio conformacional a medida que se cierran sobre el ATP unido, pero en el dominio transmembrana no se produce un cambio conformacional sustancial. Los iones calcio están ahora atrapados en el interior del enzima.

3. El grupo fosforilo se transfiere ahora del ATP al Asp 351.

4. Tras la liberación del ADP, el enzima experimenta un nuevo cambio conformacional que, esta vez, incluye también al dominio de membrana. Esta nueva conformación se denomina E_2 o $E_2-\text{P}$ en su forma fosforilada. Al proceso de interconversión entre las conformaciones E_1 y E_2 lo llamamos *eversión*.

En la conformación $E_2-\text{P}$, los centros de unión al Ca^{2+} se separan de forma que los iones calcio se liberan al lado de la membrana opuesto al que entraron: se ha con-

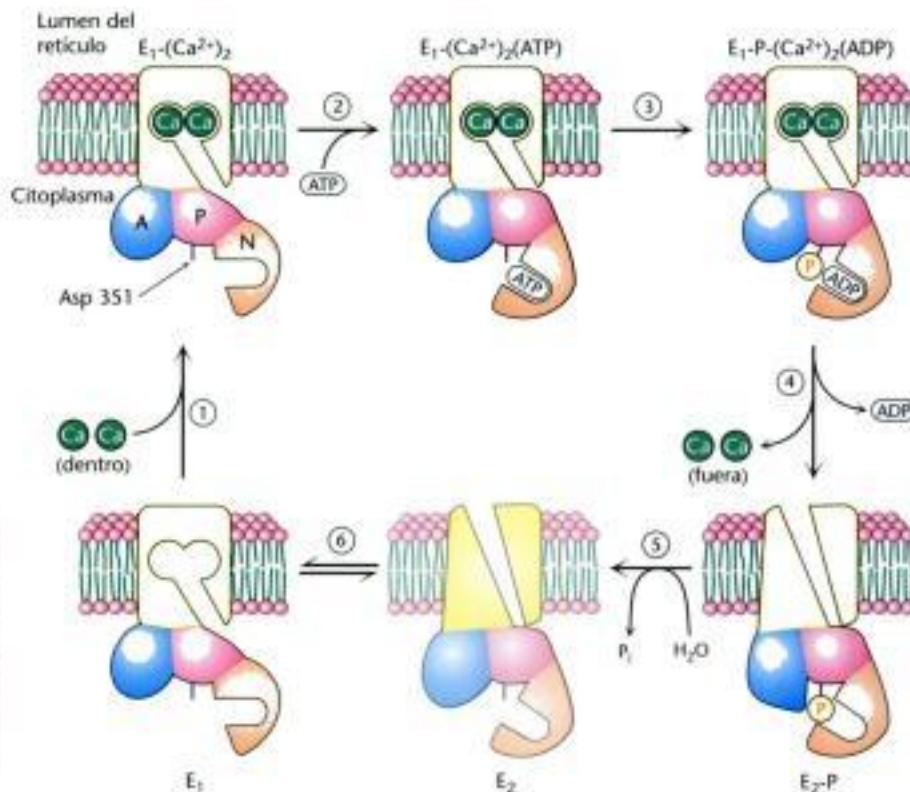


Figura 13.5 Bombeo de calcio. La ATPasa de Ca^{2+} transporta Ca^{2+} a través de la membrana mediante un mecanismo que incluye (1) Unión del calcio del citoplasma, (2) Unión del ATP, (3) hidrólisis del ATP y transferencia del grupo fosforilo al Asp 351 del enzima, (4) Liberación de ADP y eversión del enzima para liberar el Ca^{2+} en el lado opuesto de la membrana, (5) hidrólisis del residuo fosfoaspartato, y (6) eversión para prepararse a una nueva unión de Ca^{2+} del citoplasma.

seguido realizar el transporte de los iones. Esta conformación se muestra en la Figura 13.4.

5. Se hidroliza el residuo fosfoaspartato y se libera el grupo fosfato.

6. Con la liberación del fosfato, se pierden las interacciones que estabilizaban la conformación E₂ y el enzima revierte a la conformación E₁.

La unión de dos iones calcio del lado citoplasmático de la membrana completa el ciclo.

Este mecanismo puede aplicarse básicamente a otras ATPasas tipo P. Por ejemplo, la ATPasa de Na⁺-K⁺ que es un tetramero α₂β₂. Su subunidad α es homóloga a SERCA e incluye un residuo aspartato clave, análogo al Asp 351. La subunidad β, no participa directamente en el proceso de transporte iónico. Se puede aplicar un mecanismo de transporte análogo al mostrado en la Figura 13.5, con tres iones Na⁺ uniéndose desde el interior de la célula a la conformación E₁ y dos iones K⁺ uniéndose desde el exterior de la célula a la conformación E₂.

La digital inhibe específicamente la bomba de Na⁺ y K⁺ porque bloquea su desfosforilación

Ciertos esteroides derivados de plantas son potentes inhibidores ($K_i \approx 10$ nM) de la bomba de Na⁺ y K⁺. La digitoxigenina y la ouabaina pertenecen a esta clase de inhibidores que se conocen como *esteroides cardiotónicos*, a causa de sus intensos efectos sobre el corazón (Figura 13.6). Estos compuestos inhiben la desfosforilación de la forma E₂-P al ser aplicados en la *cara externa* de la membrana.

La *digital*, que es una mezcla de esteroides cardiotónicos que se obtiene de las hojas desecadas de la dedalera (*Digitalis purpurea*), tiene una gran importancia clínica. La digital aumenta la fuerza de contracción del músculo cardíaco, lo que la convierte en un fármaco de elección en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. La inhibición de la bomba de Na⁺ y K⁺ por la digital conduce a un mayor nivel de Na⁺ en el interior de la célula, disminuyendo así por tanto el gradiente de Na⁺ a través de la membrana. Como consecuencia, disminuye también la salida de Ca²⁺ producida por el transportador que intercambia Na⁺ exterior por Ca²⁺ interior. El consiguiente aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ eleva la contractibilidad del músculo cardíaco. Es interesante señalar que la digital se utilizó con éxito mucho antes del descubrimiento de la ATPasa de Na⁺-K⁺. En 1785, William Withering, médico británico, relató historias acerca de una anciana conocida como "la anciana de Shropshire" que curaba a la gente de hidropesía (que hoy en día se diagnosticaría como insuficiencia cardíaca congestiva) con un extracto de digital. Withering realizó el primer estudio científico sobre el efecto del digital en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y documentó su eficacia.



La dedalera (*Digitalis purpurea*) es la fuente de la digital, una de los fármacos más ampliamente utilizados. [Inga Spence/Visuals Unlimited.]

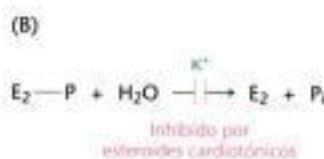
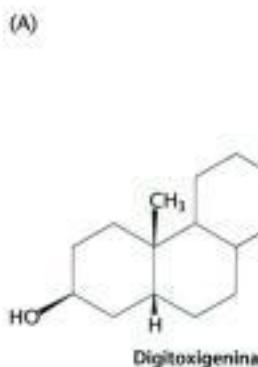


Figura 13.6 Digitoxigenina. Los esteroides cardiotónicos como la digitoxigenina inhiben la bomba de Na⁺ y K⁺ por bloqueo de la desfosforilación de la forma E₂-P.

Las ATPasas de tipo P están conservadas desde un punto de vista evolutivo y desarrollan una amplia gama de funciones

 El análisis del genoma completo de levaduras ha revelado la presencia de 16 proteínas que pertenecen claramente a la familia de las ATPasas de tipo P. Un análisis más detallado de las secuencias sugiere que dos de estas proteínas transportan iones H^+ , dos transportan Ca^{2+} , tres transportan Na^+ y dos transportan metales como el Cu^{2+} . Además, cinco miembros de esta familia parecen que participan en el transporte de fosfolípidos con aminoácidos en su cabeza polar. Estas últimas proteínas contribuyen al mantenimiento de la simetría de las membranas transportando lípidos como la fosfatidilserina desde la monocapa externa de la membrana a la interna. Estos enzimas reciben el nombre de "flipasas". Más impresionante es el hecho de que el genoma humano codifica 70 ATPasas tipo P. Todos los miembros de esta familia de proteínas utilizan el mismo mecanismo fundamental. La energía libre de la hidrólisis del ATP dirige el transporte a través de la membrana produciendo cambios conformacionales asociados a la adición o eliminación de un grupo fosforilo a un centro aspartato análogo en cada proteína.

La multirresistencia a fármacos y la fibrosis quística han llamado la atención sobre una familia de proteínas de membrana con dominios de unión a ATP de tipo cassette

 Los estudios sobre enfermedades humanas han revelado la existencia de otra familia grande e importante de proteínas que participan en transporte activo, con estructuras y mecanismos muy distintos de los de la familia de las ATPasas tipo P. Las células tumorales en cultivo a menudo se vuelven resistentes a drogas que les eran inicialmente muy tóxicas. Es llamativo que el desarrollo de la resistencia a un fármaco o una droga hace menos sensible a las células respecto a toda una serie de otros compuestos. Este fenómeno se conoce como *multirresistencia a fármacos*. A través de un descubrimiento significativo se encontró que el inicio de la múltiple resistencia a drogas estaba correlacionado con la expresión y actividad de una proteína de membrana con una masa molecular aparente de 170 kd. Esta proteína actúa como una bomba dependiente de ATP que expulsa de las células que la expresan una amplia gama de moléculas pequeñas. La proteína recibe el nombre de *MDR* (del inglés *multidrug resistance protein*) o *glucoproteína P* ("glico" porque contiene azúcares). Así, cuando se exponen las células a la droga, la MDR bombea la droga fuera de la célula antes de que ésta surta efecto.

 El análisis de las secuencias de aminoácidos de MDR y otras proteínas homólogas revelaron una arquitectura común (Figura 13.7). Cada proteína está compuesta por cuatro dominios: dos dominios que atraviesan la membrana y dos dominios de unión a ATP de tipo cassette (en inglés *ATP-binding cassette*, ABCs) y son homólogos a dominios de una extensa familia de proteínas transportadoras de bacterias y arqueas. A los transportadores que incluyen estos dominios se les llama transportadores ABC. De hecho, al contar con 79 miembros, las proteínas ABC constituyen la mayor familia de proteínas transportadoras identificadas en el genoma de *E. coli*. El genoma humano incluye más de 150 genes de transportadores ABC.

Las proteínas ABC son miembros de la superfamilia de NTPasas de bucle P (p. 267). Se han determinado las estructuras tridimensionales de muchos miembros de la familia de transportadores ABC. En la Figura 13.8 se muestra una de estas estructuras, la de un transportador de lípidos de *Vibrio cholerae*. Esta proteína es un dímero de cadenas de 62 kd. La mitad de cada proteína cercana al extremo amino es el dominio que atraviesa la membrana y la mitad próxima al extremo carboxilo es el dominio de unión a ATP tipo cassette. En contraste con la proteína eucariótica MDR, algunas proteínas ABC, particularmente las de procariotas, son proteínas con múltiples subunidades, bien dímeros, como en el caso que acabamos de describir, o heterotetrámeros con dos subunidades que atraviesan la membrana y dos subunidades tipo cassette que unen ATP. El paso de la situación en procariotas, con actividades

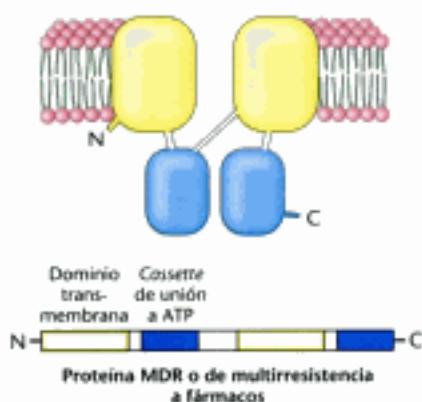


Figura 13.7 Transportadores ABC. La proteína de multirresistencia a fármacos (MDR) es una representante de una extensa familia de proteínas homólogas compuestas de dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP, denominados cassettes de unión a ATP (ABCs).

enzimáticas repartidas en distintas cadenas polipeptídicas, a la de eucariotas, con las distintas actividades en una cadena única, es un tema que volveremos a tratar. Las dos *cassettes* de unión a ATP están en contacto pero, en ausencia de ATP unido, su interacción no es fuerte. En base a su estructura y la de otras proteínas así de la información recogida mediante otros experimentos, se ha desarrollado un mecanismo para el transporte activo realizado por estas proteínas (Figura 13.9).

1. El ciclo catalítico se inicia con el transportador libre tanto de ATP como de sustrato. El transportador puede interconvertirse entre sus formas abierta y cerrada.
2. El sustrato entra desde el interior de la célula a la cavidad central de la forma abierta del transportador. La unión al sustrato induce el cambio conformacional en la *cassette* de unión a ATP aumentando su afinidad por el mismo.
3. El ATP se une a las *cassettes* de unión a ATP cambiando su conformación de modo que los dos dominios interactúan fuertemente entre sí.
4. La fuerte interacción entre las *cassettes* de unión a ATP induce un cambio en la relación entre los dos dominios que atraviesan la membrana y liberando el sustrato al exterior de la célula.
5. La hidrólisis de ATP y la liberación del fosfato inorgánico restaura la proteína para iniciar un nuevo ciclo.

Mientras que los transportadores ABC eucarióticos actúan, generalmente, exportando moléculas del interior de la célula, los transportadores ABC procarióticos actúan a menudo para importar moléculas específicas desde el *exterior* de la célula. Una proteína específica de unión actúa de forma concertada con los transportadores ABC bacterianos, entregando el sustrato al transportador y estimulando la hidrólisis de ATP dentro de la célula. Estas proteínas de unión están presentes en el periplasma de la célula bacteriana, el compartimiento entre las dos membranas que rodean algunas células bacterianas.

Por tanto, los transportadores ABC emplean un mecanismo sustancialmente diferente del de las ATPasa tipo P para acoplar la reacción de hidrólisis del ATP con

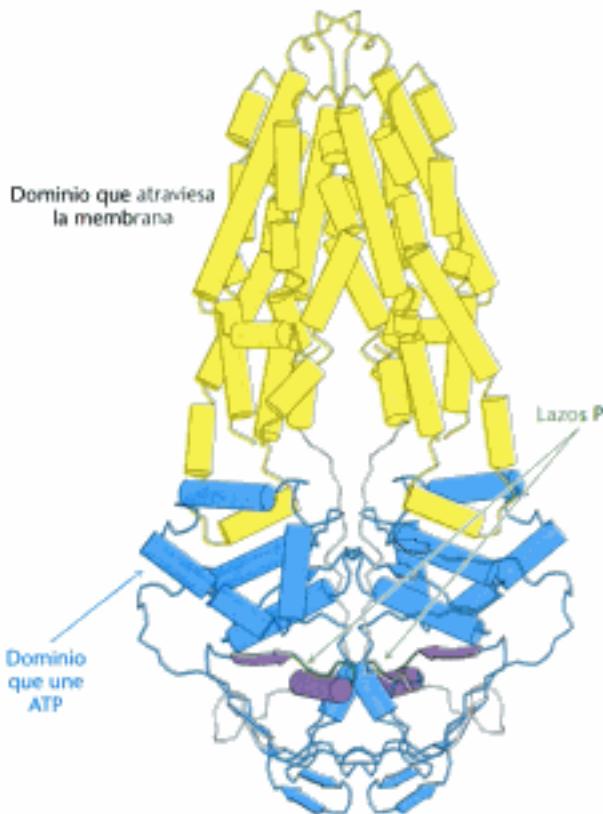


Figura 13.8 Estructura de un transportador ABC. La estructura de un transportador de lípido de *Vibrio cholerae* un transportador ABC representativo. Las dos cossettes de unión a ATP (en azul) están relacionados con los lazos P de las NTPasas y, como ellas, contienen lazos P (en verde). Las hojas β que la rodean y las hélices α se muestran en púrpura. [Tomado de 1PF4.pdb.]

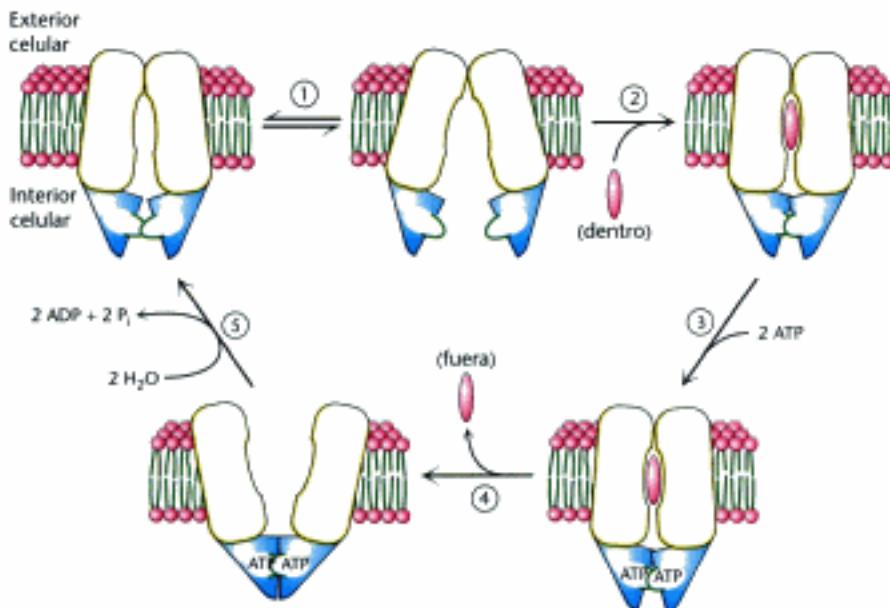


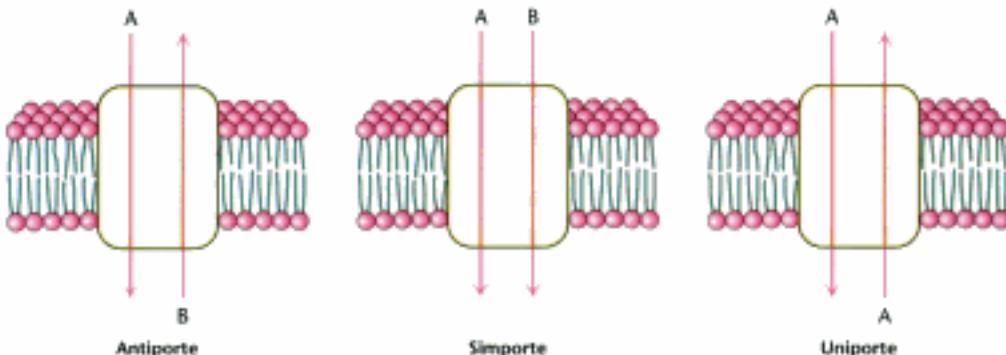
Figura 13.9 Mecanismo de un transportador ABC. El mecanismo incluye los siguientes pasos: (1) Apertura del conducto hacia el interior de la célula; (2) unión del sustrato y cambio conformacional de las cossettes de unión a ATP; (3) unión del ATP y cambios conformacionales consiguientes; (4) separación de los dominios que atraviesan la membrana y liberación del sustrato al otro lado de la membrana y (5) hidrólisis del ATP y restauración del transportador a su estado inicial.

los cambios conformativos. A pesar de ello, el resultado neto es el mismo: los transportadores se convierten de una conformación capaz de unirse al sustrato de un lado de la membrana a otra que libere el sustrato al otro lado.

13.3 La lactosa permeasa es un arquetipo de transportadores secundarios que utilizan un gradiente de concentración para potenciar la formación de otro gradiente

Muchos procesos de transporte activo no están directamente impulsados por la hidrólisis del ATP. En su lugar, el flujo de un ion o molécula contra gradiente se acopla al flujo, a favor de gradiente, de una especie química diferente. Las proteínas de membrana que bombean iones o moléculas contra gradiente por este mecanismo son denominadas *transportadores secundarios* o *cotransportadores*. Estas proteínas cotransportadoras pueden clasificarse como proteínas de *antiporte* o de *simporte*. Las proteínas de antiporte acoplan el flujo a favor de gradiente de una especie con el flujo contra gradiente de otra en *sentido opuesto*, las proteínas de simporte utilizan el flujo de una especie para impulsar el flujo de otra en *el mismo sentido* a través de la membrana. Otras proteínas relacionadas son los uniportes, que, como los conductos iónicos, son capaces de transportar moléculas específicas en una u otra dirección según sea el gradiente de concentración de esas sustancias a ambos lados de la membrana (Figura 13.10).

Figura 13.10 Proteínas de antiporte, proteínas de simporte y proteínas de uniporte. Los transportadores secundarios pueden transportar dos sustratos en direcciones opuestas (proteínas de antiporte) o dos sustratos en la misma dirección (proteínas de simporte). Las proteínas de uniporte son proteínas relacionadas que facilitan la difusión de una molécula específica a través de la membrana.



Los transportadores secundarios son máquinas moleculares muy antiguas, comunes hoy en día tanto entre bacterias, como en arqueas y eucariotas. Por ejemplo, aproximadamente 160 proteínas de las cerca de 4000 codificadas por el genoma de *E. coli* parecen ser transportadores secundarios. La comparación de la secuencia y los análisis de hidropatía sugieren que los miembros de la familia más extensa tienen 12 hélices transmembrana que parecen haber surgido por duplicación y fusión de una proteína de membrana con 6 hélices transmembrana. Dentro de esta familia se incluye la lactosa permeasa de *E. coli*. Esta proteína de simporte utiliza el gradiente de H^+ a través de la membrana de *E. coli*, generado por la oxidación de moléculas combustibles, para impulsar la toma de lactosa y otros azúcares en contra de sus gradientes de concentración. Este transportador ha sido exhaustivamente estudiado durante muchas décadas y es un arquetipo útil para esta familia.

Se ha determinado la estructura de la lactosa permeasa (Figura 13.11). Como era de esperar por el análisis de secuencia, esta estructura consiste en dos mitades, cada una de las cuales contiene seis hélices α que atraviesan la membrana. Algunas de estas hélices son un tanto irregulares. Las dos mitades están bien separadas y se encuentran unidas por una única cadena polipeptídica. En esta estructura, el azúcar se aloja en un bolsillo en el centro de la proteína accesible por una vía comunicada con el interior de la célula. En base a esta estructura y a los resultados obtenidos con un amplio conjunto de experimentos distintos, se ha establecido un mecanismo para la acción de una

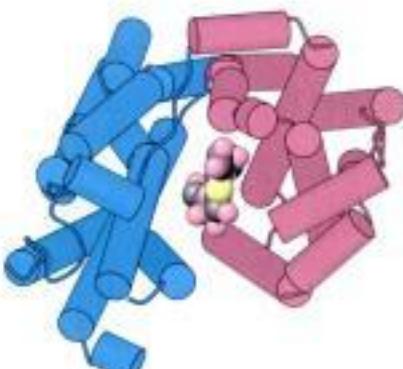
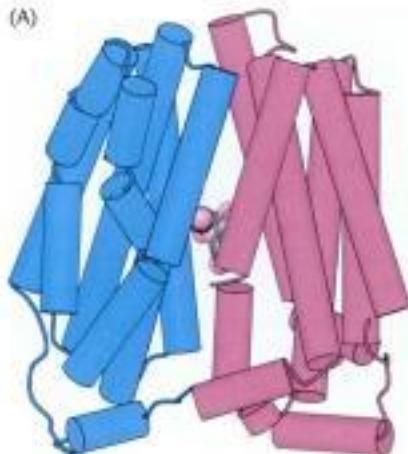


Figura 13.11 Estructura de la lactosa permeasa unida a un análogo de la lactosa. La mitad amino terminal de la proteína se representa en azul y la mitad carboxilo terminal, en rojo. (A) Visión lateral. (B) Visión desde la base (desde dentro de la célula). Nótese que la estructura consiste en dos mitades que rodean al azúcar y que se unen una a la otra por una tira única de polipéptido. [Tomado de 1PV7.pdb.]

proteína transportadora por simporte. Este mecanismo (Figura 13.12) comparte muchas características comunes con el de las ATPasas tipo P y los transportadores ABC.

1. El ciclo se inicia con las dos mitades orientadas de forma que el bolsillo de unión al azúcar es accesible desde el exterior de la célula, en una conformación distinta de la observada en las estructuras que, hasta el momento, se han resuelto. Un protón procedente del exterior de la célula se une a un residuo de la permeasa, probablemente al Glu 269.
2. En su forma protonada, la permeasa une lactosa del exterior de la célula.
3. La estructura cambia de conformación adoptando la observada en la estructura cristalina (ver Figura 13.11).
4. La permeasa libera la lactosa al interior de la célula.
5. La permeasa libera un protón en el interior de la célula.
6. La permeasa vuelve a cambiar de conformación para completar el ciclo.

El lugar de la protonación cambia, probablemente, a lo largo este ciclo.

Probablemente se puede aplicar este mismo mecanismo de cambio conformacional (por eversión o inversión) a todos los transportadores secundarios cuya arquitectura global sea similar a la de la lactosa permeasa.

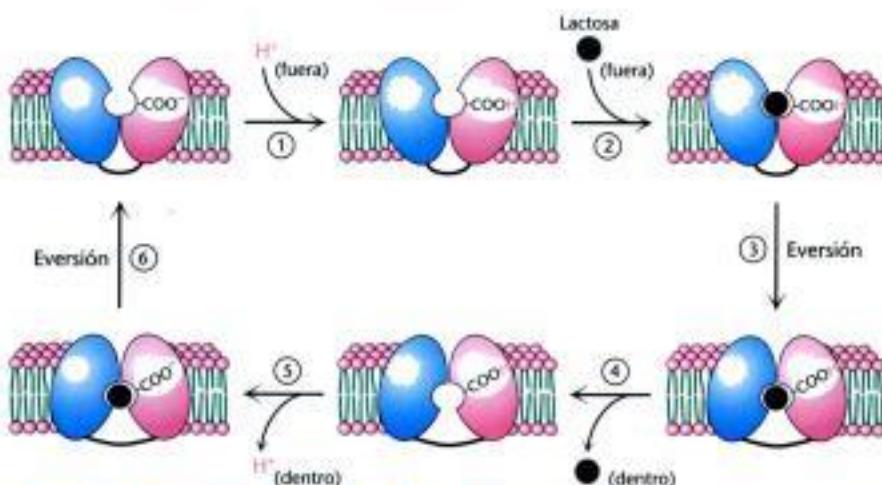


Figura 13.12 Mecanismo de acción de la lactosa permeasa. El mecanismo se inicia con la permeasa abierta hacia el exterior de la célula (superior izquierda). La permeasa une un protón del exterior de la célula (1) y, entonces, une el sustrato (2). La permeasa cambia de conformación (3) luego libera el sustrato (4) y un protón (5) al interior de la célula. Posteriormente cambia de conformación (6) para completar el ciclo.

13.4 Conductos específicos pueden realizar rápidamente el transporte de iones a través de las membranas

Las bombas y los transportadores secundarios pueden transportar iones a razón de varios miles de iones por segundo. Otras proteínas de membrana, *los conductos iónicos*, que son sistemas de transporte pasivo, son capaces de transportar iones a velocidades unas mil veces mayores. Estas velocidades de transporte a través de los conductos iónicos están cercanas a las esperadas para la libre difusión de iones en disoluciones acuosas. Aun así, los conductos iónicos no son simples tubos que atraviesan las membranas, a través de los cuales los iones fluyen rápidamente, sino que son máquinas moleculares muy complejas que responden a los cambios químicos y físicos de su entorno y experimentan cambios conformacionales.

Los potenciales de acción están mediados por cambios transitorios en la permeabilidad al Na^+ y K^+

Una de las manifestaciones más importantes de la acción de los conductos iónicos es el impulso nervioso, que es el medio fundamental de comunicación en el sistema nervioso. *Un impulso nervioso* es una señal eléctrica producida por el flujo de iones que circulan a través de la membrana plasmática de una neurona. El interior de la neurona, como la mayoría de las demás células, tiene una concentración baja de Na^+ y una elevada de K^+ . Estos gradientes iónicos se originan por acción de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. La membrana celular tiene un potencial eléctrico determinado por la relación entre las concentraciones internas y externas de los iones. En estado de reposo, el potencial de membrana es de -60 mV . El impulso nervioso o *potencial de acción* se origina cuando el potencial de membrana se despolariza por encima de un umbral crítico (esto es de -60 a -40 mV). En un milisegundo, el potencial de membrana se vuelve positivo y alcanza el valor de $+30\text{ mV}$, antes de hacerse nuevamente negativo. Esta despolarización amplificada se propaga a lo largo de la fibra nerviosa (Figura 13.13).

Alan Hodgkin y Andrew Huxley llevaron a cabo ingeniosos experimentos que demostraron que el potencial de acción se debe a cambios grandes y transitorios de la permeabilidad de la membrana del axón respecto a los iones Na^+ y K^+ . En primer lugar cambia la conductancia de la membrana para el Na^+ . La despolarización de la membrana por encima del umbral lleva a la apertura de los conductos de Na^+ . Los iones sodio fluyen hacia el interior de la célula debido al fuerte gradiente electroquímico creado a través de la membrana plasmática. La entrada ulterior de Na^+ despolariza la membrana y de este modo se abren muchas compuertas para el Na^+ . Esta retroalimentación positiva entre despolarización y entrada de Na^+ da lugar a un cambio muy rápido y profundo del potencial de la membrana del axón, cambio que va desde -60 mV a $+30\text{ mV}$ en un milisegundo.

La membrana se hace, espontáneamente, menos permeable a los iones sodio y más permeable a los iones potasio. Por tanto, salen de la célula iones potasio y el potencial de membrana vuelve a su valor negativo. El potencial de reposo de -60 mV se restablece al cabo de algunos milisegundos, a medida que la conductancia para el K^+ disminuye hasta los valores característicos del estado no estimulado. La onda de despolarización seguida por una repolarización se desplaza rápidamente a lo largo de la neurona. La propagación de estas ondas permite que el tacto con la punta de nuestros dedos sea detectado por el cerebro en unos pocos milisegundos.

Este modelo para el potencial de acción postulaba la existencia de dos conductos específicos para Na^+ y K^+ . Estos conductos deben abrirse en respuesta a cambios en el potencial de membrana y después cerrarse tras haber permanecido abiertos durante un breve periodo de tiempo. Esta atrevida hipótesis predecía la existencia de moléculas, con una serie de propiedades muy definidas, mucho antes de que existieran las técnicas para su detección y caracterización directas.

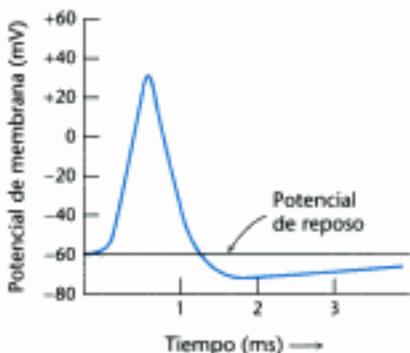


Figura 13.13 Potencial de acción. Las señales se transmiten a través de las neuronas gracias a la despolarización y posterior repolarización de la membrana.

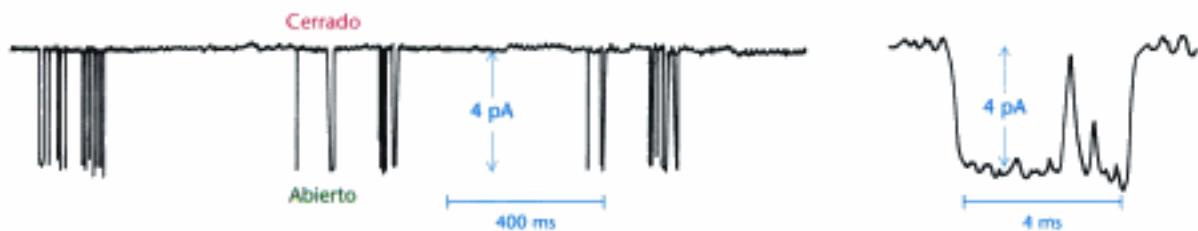


Figura 13.14 Observando conductos individuales. Los resultados de un experimento de patch-clamp revelan las transiciones entre sus formas cerrada y abierta de un único conducto.

Las medidas de conductancia por “patch-clamp” revelan la actividad de conductos individuales

La demostración directa de la existencia de estos conductos se alcanzó mediante la técnica de patch-clamp introducida por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 (Figura 13.14). Esta poderosa técnica permite medir la actividad iónica a través de un pequeño fragmento de la membrana celular. La conductancia de la membrana muestra cambios escalonados correspondientes a la apertura y cierre de conductos iónicos individuales. En esta técnica, una pipeta limpia de vidrio con una punta de una micra de diámetro, se presiona contra una célula intacta de modo que la pipeta queda intimamente adherida a la membrana (Figura 13.15). Una ligera succión da lugar a la formación de un cierre hermético, de modo que la resistencia entre la parte interna de la pipeta y la disolución externa es de muchos gigaohmios (un gigaohmio es igual a 10^9 ohmios). Así pues, un cierre de gigaohmios (llamado *gigaseal* o *gigasellado*) asegura que la corriente eléctrica que fluye a través de la pipeta sea idéntica a la corriente que fluye a través de la membrana que cubre el extremo de la pipeta. El gigasellado permite realizar medidas de corriente con alta resolución cuando se aplica a través de la membrana un voltaje conocido. El flujo de iones que circulan a través de un solo conducto y las transiciones entre sus estados abierto y cerrado pueden visualizarse directamente con un tiempo de resolución de microsegundos. Además, puede observarse directamente la actividad de los conductos en su entorno de mem-

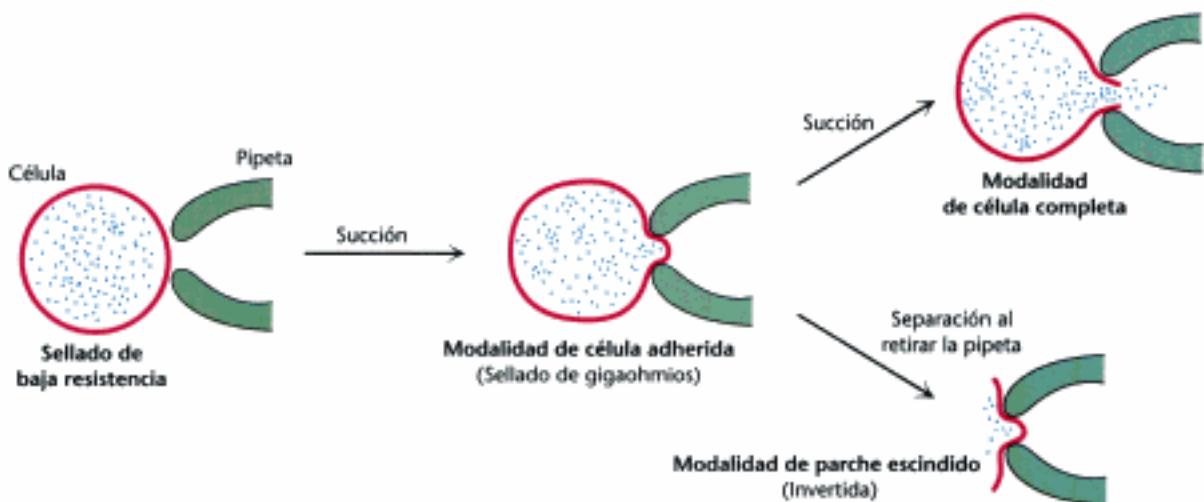


Figura 13.15 Modalidades de patch-clamp. La técnica del patch-clamp para controlar la actividad de un conducto presenta aplicaciones variadas. Entre la pipeta y el pequeño parche de membrana plasmática se forma un cierre de elevada resistencia (*gigaseal* o *gigasellado*). Esta configuración se denomina *célula adherida*. La ruptura del parche de membrana al incrementar la succión origina una vía de baja resistencia entre la pipeta y el interior de la célula. En esta modalidad de *célula completa* se puede controlar la actividad de los conductos de la membrana plasmática completa. Para preparar una membrana en la *modalidad de parche escindido* la pipeta debe retirarse de la célula. Así podemos estudiar una porción de membrana plasmática, con su cara citoplasmática mirando hacia el medio externo (polaridad invertida).

brana nativa, e incluso en células intactas. Los métodos de patch-clamp han suministrado una de las primeras posibilidades de observar a biomoléculas individuales en acción. Posteriormente, se han desarrollado otros métodos que permiten observar una sola biomolécula, lo que ha abierto nuevas perspectivas a la bioquímica a su nivel más fundamental.

La estructura de un conducto iónico de potasio es un arquetipo de muchas estructuras de conductos iónicos

Una vez establecida firmemente la existencia de conductos iónicos mediante la técnica de patch-clamp los científicos vieron la posibilidad de identificar las moléculas que forman los conductos iónicos. El conducto de sodio se purificó por primera vez a partir del órgano eléctrico de la anguila eléctrica, que es una fuente rica en la proteína que forma el conducto. La proteína se purificó aprovechando su capacidad para unir una neurotoxina específica. La tetrodotoxina, que es un compuesto orgánico aislado del pez hinchable (fugu), se une al conducto de sodio con gran afinidad ($K_i \approx 1 \text{ nM}$). La dosis letal de este veneno para el ser humano adulto es de unos 10 ng.

La proteína aislada consta de una sola cadena de 260 kd. Posteriormente, se han clonado y secuenciado cDNAs que codifican conductos de sodio. Es interesante el hecho de que el conducto contiene cuatro repeticiones internas, o unidades de homología que, poseyendo secuencias similares de aminoácidos, sugieren que el gen de este conducto se ha producido por duplicación y divergencia de genes. Los perfiles de hidrofobicidad indican que cada unidad de homología contiene cinco segmentos hidrofóbicos (S1, S2, S3, S5 y S6). Cada repetición también contiene un segmento S4 cargado positivamente en el que uno de cada tres residuos es arginina o lisina. Se sugirió que los segmentos S1 a S6 eran helicoides α transmembrana. Los residuos del segmento S4 cargados positivamente se propuso que actuaban como sensores de voltaje del conducto.

La purificación de los conductos de potasio resultó mucho más difícil debido a su escasa abundancia y a la ausencia de ligandos conocidos que se les unieran con una afinidad tan alta como la ya mencionada para la tetrodotoxina por los conductos de sodio. Esta situación cambió a partir de los estudios con mutantes de la mosca de la fruta que se agitan violentamente cuando son anestesiadas con éter. El clonaje y cartografiado del gen responsable de este defecto, denominado "shaker" (agitador), reveló la secuencia de aminoácidos codificada por el gen del conducto de potasio. El cDNA de shaker codifica una proteína de 70 kd que contiene 4 subunidades. Cada polipéptido contiene secuencias que se corresponden con las de los segmentos S1 a S6 en cada una de las unidades repetidas en el conducto de Na^+ . Así, una subunidad del conducto de potasio es homóloga a una de las unidades repetitivas de homología de los conductos de sodio. De acuerdo con esta hipótesis, cuatro subunidades del conducto de potasio se ensamblan para formar un conducto funcional. Más recientemente, se han descubierto otros conductos de potasio en bacterias, que contienen sólo dos regiones transmembrana, que se corresponden con los segmentos S5 y S6. Ésta y otras informaciones indican que S5

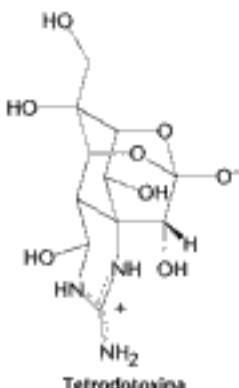


Figura 13.16 Relaciones entre las secuencias de los conductos iónicos. La igualdad de colores indica regiones estructuralmente similares en los conductos de sodio, calcio y potasio. Cada uno de estos conductos exhibe una simetría cuaternaria, bien dentro de una sola cadena polipeptídica (conductos de sodio y calcio) o a través de la formación de tetrameros (conductos de potasio).

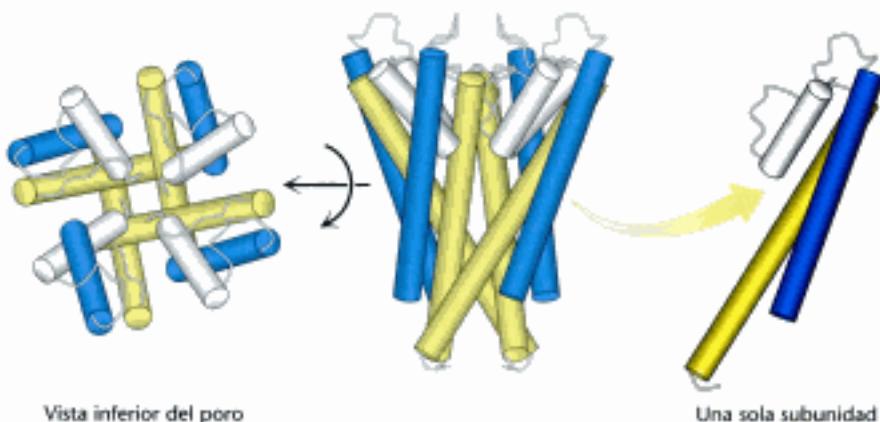


Figura 13.17 Estructura del conducto de potasio.

El conducto de potasio, compuesto por cuatro subunidades idénticas, tiene forma cónica, con la apertura mayor asomando al interior de la célula (centro). Una vista inferior del poro, mirando hacia el exterior de la célula, muestra la relación de las subunidades individuales (izquierda). Una de las cuatro subunidades idénticas del poro se muestra a la derecha, con la región integrante del poro iluminada en gris. [Tomado de 1K4C.pdb.]

y S6 y la región comprendida entre ellos forman el poro real del conducto iónico de potasio. Los segmentos S1 a S4 contienen el sistema de apertura del poro. Las relaciones entre las secuencias de estos conductos iónicos se resumen en la Figura 13.16.

En 1998, Roderick MacKinnon y colaboradores determinaron, por cristalografía de rayos X, la estructura de un conducto de potasio bacteriano (de *Streptomyces lividans*). Este conducto contiene sólo los segmentos que forman el poro: S5 y S6. Como era de esperar, el conducto de potasio es un tetramero de subunidades idénticas, cada una de las cuales incluyen las dos hélices α transmembrana (Figura 13.17). Las cuatro subunidades se ensamblan para formar el poro en forma de cono que se establece hacia el centro de la estructura.

La estructura del conducto de potasio revela la base de su especificidad iónica

La estructura que se muestra en la Figura 13.17 representa, probablemente, el conducto de potasio en su forma cerrada. Sin embargo, nos sugiere la forma en que el conducto es capaz de excluir todos aquellos iones que no sean potasio. Empezando desde el interior de la célula, el poro se inicia con un diámetro de unos 10 Å y luego se estrecha a una cavidad menor con un diámetro de 8 Å. Tanto la apertura al exterior como la cavidad central del poro están llenas de agua, y un ion potasio puede ajustarse al poro sin perder su cubierta de moléculas de agua unidas. Cuando se han recorrido aproximadamente dos tercios del camino a través de la membrana, el poro se estrecha adicionalmente (a un diámetro de 3 Å). En este punto, cualquier ion K^+ debe liberarse de sus moléculas de agua e interaccionar directamente con grupos de la proteína. La estructura del conducto reduce la anchura efectiva de la membrana de 34 a 12 Å al permitir a los iones solvatados penetrar en la membrana antes de que los iones deban interaccionar directamente con el conducto (Figura 13.18).

Para que los iones potasio abandonen sus moléculas de agua, las interacciones con el agua deben ser reemplazadas por otras interacciones polares. La parte más restrictiva del poro está construida a partir de residuos entre las dos hélices α transmembrana. En concreto, un tramo de cinco aminoácidos dentro de esta región funciona como un *filtro de selectividad* que determina la preferencia por el K^+ sobre otros iones (Figura 13.19). Ese tramo tiene la secuencia Thr-Val-Gly-Tyr-Gly, que se conserva en todos los conductos de potasio y se ha establecido como una secuencia característica de utilidad, a la hora de identificar posibles conductos de K^+ . La región de la hebra que contiene la secuencia conservada se encuentra en una conformación relativamente extendida y está orientada de tal forma que los grupos carbonilo

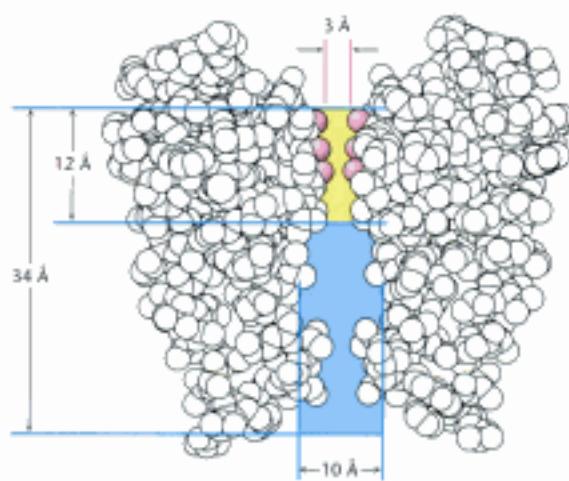


Figura 13.18 El camino a través del conducto.

Un ion potasio que entra en el conducto de potasio puede atravesar una distancia de 22 Å en la membrana permaneciendo solvatado con agua (en azul). En este punto, el diámetro del poro se estrecha a 3 Å (en amarillo), y el potasio debe eliminar su cubierta de agua e interaccionar con los grupos carbonilo (en rojo) de los aminoácidos del poro.

Figura 13.19 El filtro de selectividad del conducto de potasio. Los iones potasio interactúan con los grupos carbonilo de la secuencia TVCGYG del filtro de selectividad localizado en el poro de 3 Å de diámetro del conducto de potasio. Sólo se muestran dos de las cuatro subunidades del conducto.

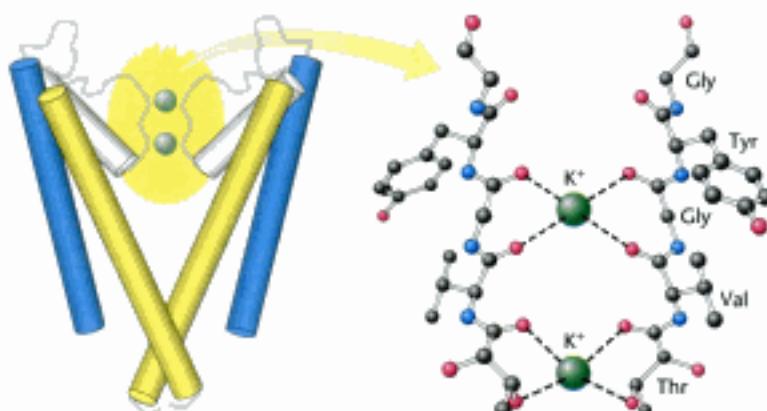


TABLA 13.1 Propiedades de los iones alcalinos

Ion	Radio iónico (Å)	Energía libre de hidratación en kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Li^+	0,60	-410 (-98)
Na^+	0,95	-301 (-72)
K^+	1,33	-230 (-55)
Rb^+	1,48	-213 (-51)
Cs^+	1,69	-197 (-47)

nílo del péptido se dirigen hacia el conducto, lo que facilita la interacción con los iones potasio.

Los conductos de potasio son 100 veces más permeables al K^+ que al Na^+ . ¿Cómo se consigue este alto grado de selectividad? El diámetro estrecho (3 Å) del filtro de selectividad del conducto de potasio permite al filtro rechazar los iones que tengan un radio mayor de 1,5 Å. Sin embargo, un Na^+ desnudo es suficientemente pequeño para atravesar el poro (Tabla 13.1). De hecho, el radio iónico del Na^+ es sustancialmente menor que el del K^+ . ¿Entonces, cómo se rechaza al Na^+ ?

La clave nos la da el coste de energía libre para la deshidratación de estos dos iones, que es considerable [Na^+ , 301 kJ mol^{-1} (72 kcal mol $^{-1}$) y K^+ , 230 kJ mol^{-1} (55 kcal mol $^{-1}$)]. *El conducto paga el coste de la deshidratación del K^+ suministrando interacciones compensatorias con los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo que forran el filtro de selectividad.* Sin embargo, estos átomos de oxígeno están localizados de tal manera que no interactúan favorablemente con el Na^+ porque éste resulta ser demasiado pequeño (Figura 13.20). El coste mayor para la deshidratación del Na^+ no se puede compensar y entonces el Na^+ es rechazado. Los radios iónicos del oxígeno, potasio y sodio son 1,4, 1,33 y 0,95 Å respectivamente. El conducto iónico de potasio no puede abrazar adecuadamente los iones sodio que, por tanto, se mantienen hidratados y no pueden atravesar el conducto.

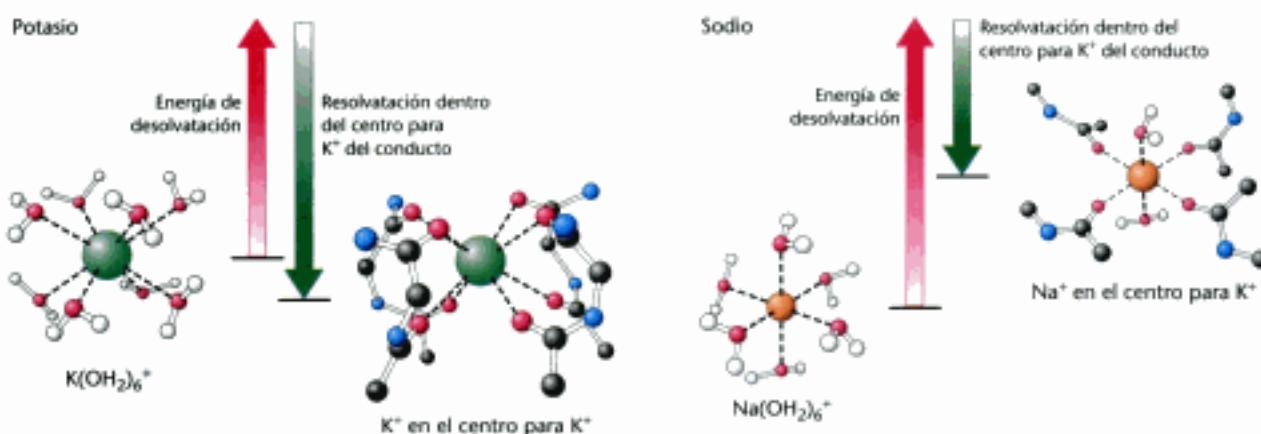


Figura 13.20 Bases energéticas de la selectividad a los iones. El coste energético de la deshidratación del ion potasio se compensa por las interacciones favorables con el filtro de selectividad. Debido a que el sodio es demasiado pequeño para interactuar favorablemente con el filtro de selectividad, la energía libre de la desolvatación no se puede compensar, y el sodio no pasa a través del conducto.

 La estructura establecida para los conductos de K^+ es un buen inicio para considerar las relaciones estructurales y funcionales de los conductos de Na^+ y Ca^{2+} , debido a su homología con los conductos de K^+ . Las comparaciones de secuencias y los resultados experimentales de mutagénesis han implicado también a los segmentos S5 y S6 en la selectividad iónica en los conductos de Ca^{2+} . En los conductos de Ca^{2+} , un residuo glutamato de esta región en cada una de las cuatro unidades desempeña un papel primordial en la determinación de la selectividad iónica.

nica. Los residuos en las posiciones correspondientes al glutamato en los conductos de Ca^{2+} son componentes principales del filtro de selectividad del conducto de Na^+ . Estos residuos son aspartato, glutamato, lisina y alanina en unidades 1, 2, 3 y 4 respectivamente (el locus DEKA). Así, la posible simetría tetramérica del conducto se rompe claramente en esta región, suministrando una explicación de por qué los conductos de Na^+ comprenden cadenas polipeptídicas únicas y grandes en lugar de un ensamblaje no covalente de cuatro subunidades idénticas. La selección del Na^+ sobre el K^+ , por parte del conducto de Na^+ , depende de los radios iónicos; el diámetro del poro es lo suficientemente restrictivo como para dejar pasar iones pequeños como Na^+ y Li^+ pero impedir el paso de iones mayores como K^+ .

La estructura del conducto de potasio explica las rápidas velocidades del transporte

La especificidad de los sitios de unión requerida para los iones haría suponer que esto hace más lento su avance, pero los conductos iónicos alcanzan unas velocidades muy rápidas para el transporte iónico. ¿Cómo se puede resolver esta paradoja? El análisis estructural a alta resolución del conducto de K^+ suministra una clara explicación. Los resultados de estos estudios muestran la presencia de cuatro centros de unión a potasio en la región más estrecha del conducto de potasio, que son cruciales para el flujo rápido de los iones. Consideremos el proceso de la conductancia iónica empezando desde el interior de la célula. Un K^+ hidratado penetra en el conducto a través de su parte más ancha. Entonces libera la mayoría o toda su agua de coordinación y se une a un centro en la región del filtro de selectividad. El ion se puede mover entre los cuatro centros dentro del filtro de selectividad porque todos tienen similares afinidades iónicas. A medida que un nuevo ion potasio se desplaza hacia el filtro de selectividad, su carga positiva repelerá al ion potasio que se halla en el centro más próximo, provocando su desplazamiento a un centro más alejado y, al mismo tiempo, empujando hacia arriba a cualquier ion potasio previamente unido a un centro situado más arriba. Este mecanismo de múltiples centros de unión resuelve la paradoja aparente entre la alta selectividad iónica y el flujo rápido.

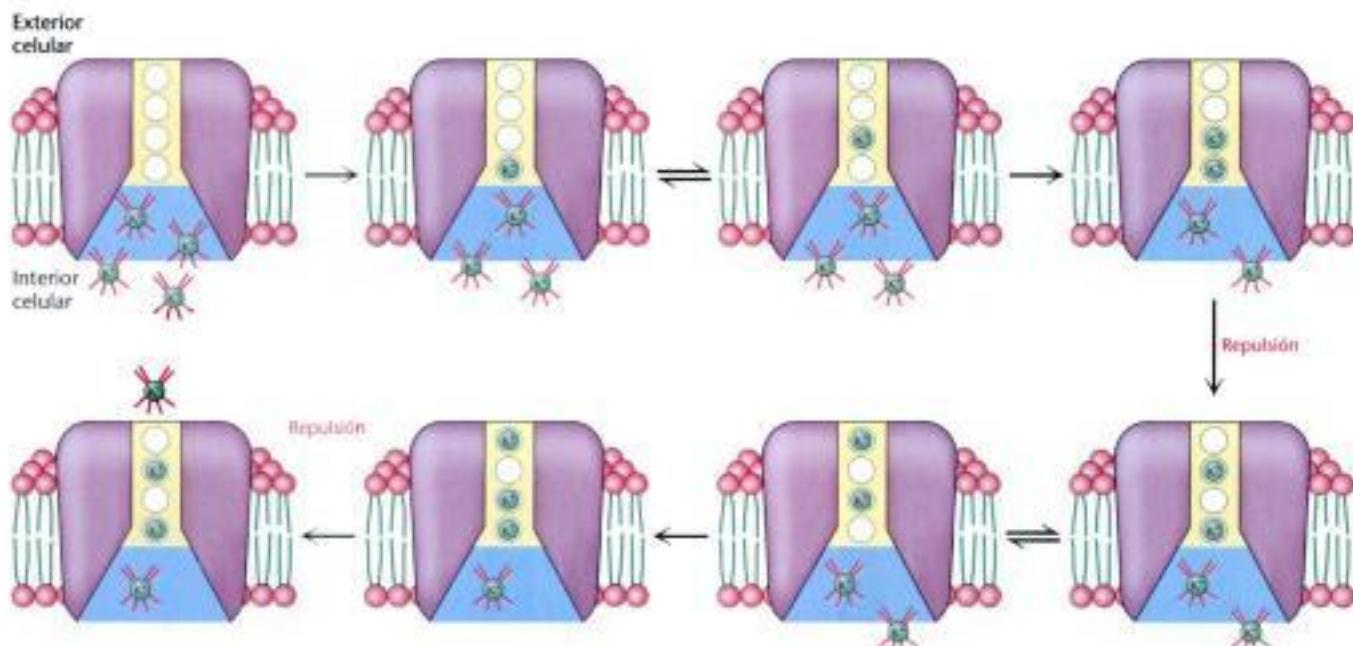


Figura 13.21 Modelo para el transporte iónico en el conducto de potasio. El filtro de selectividad tiene cuatro centros de unión. Los iones potasio hidratados pueden entrar en estos centros, uno cada vez, perdiendo su cubierta de hidratación. Cuando dos iones ocupan centros adyacentes, la repulsión electrostática les hace alejarse. De esta forma, a medida que los iones entran en el conducto, desde un lado, se expulsan otros iones en el lado opuesto.

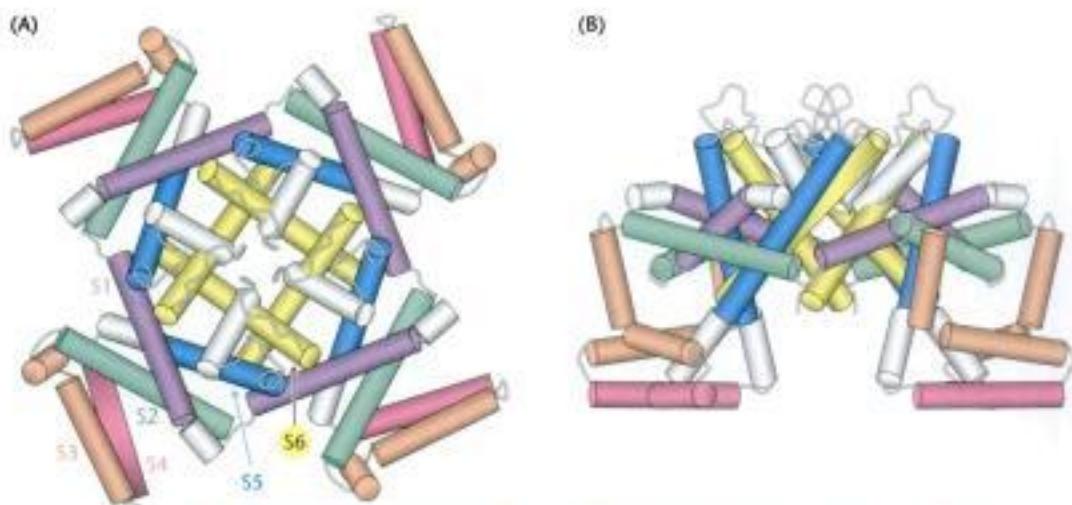


Figura 13.22 Estructura de un conducto de potasio controlado por voltaje. (A) Vista superior del poro mirando hacia el interior de la célula. (B) Vista lateral. Obsérvese que la región S4 cargada positivamente (en rojo) se sitúa en el exterior de la estructura en la parte inferior del poro. [Tomado de 1ORQ.pdb.]

El control de la apertura, regulado por voltaje, requiere importantes cambios conformacionales en dominios específicos del conducto iónico

Algunos conductos de Na^+ y K^+ poseen un control de su apertura que está regulado por el potencial de membrana, es decir, adquieren la forma altamente conductora mediante un cambio conformacional que se produce en respuesta a cambios de voltaje a través de la membrana. Como se ha indicado anteriormente, estos conductos regulados por voltaje incluyen los segmentos S1 a S4 además de los S5 y S6, que forman el poro propiamente dicho. Se ha determinado, mediante cristalografía de rayos X, la estructura del conducto de K^+ controlado por voltaje de *Aeropyrum pernix* (Figura 13.22). Los segmentos S1 a S4 forman dominios denominados remos ("paddles") que se extienden desde el centro del conducto. Estos remos incluyen al segmento S4, que es el sensor de voltaje. El segmento S4 consiste en una hélice α revestida de residuos con carga positiva. Al contrario de lo esperado, los segmentos S1 a S4 no se hallan encerrados en la proteína sino que se extienden sobre la propia membrana.

De acuerdo con esta estructura y con los resultados de otros experimentos, Roderrick MacKinnon y colaboradores han propuesto un modelo para el sistema de apertura controlado por voltaje (Figura 13.23). En la forma cerrada, los remos se hallan tumbados sobre la membrana. Cuando ésta se despolariza, los remos se mueven hacia una posición en la que se orientan verticalmente. En esta posición, empujan las cuatro caras de la base, separándolas, lo que aumenta el acceso al filtro de selectividad y abre el conducto.

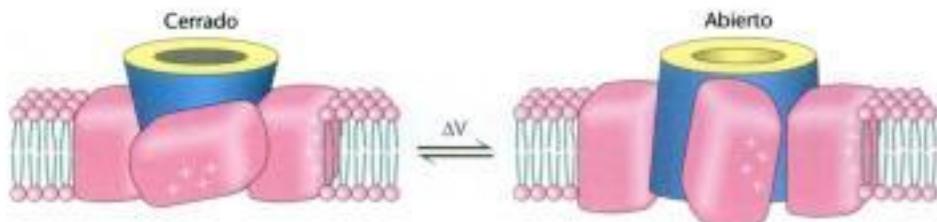


Figura 13.23 Un modelo para el mecanismo del control de apertura regulado por voltaje. Con el conducto cerrado, los remos sensores del voltaje se encuentran tumbados (izquierda). La despolarización de la membrana provoca el movimiento de estos remos a través de la membrana. Este movimiento empuja la base del conducto, separándola y abriendo el conducto.

Un conducto puede inactivarse por oclusión del poro: El modelo de la cadena de presidiario (*ball-and-chain model*)

El conducto del potasio sufre, al igual que el del sodio, una inactivación dentro de los milisegundos siguientes a la apertura del conducto (Figura 13.24). La primera pista sobre este mecanismo de inactivación la proporcionó el hecho de que el tratamiento con tripsina del lado citoplasmático de cualquiera de los conductos producía un conducto recortado que permanecía persistentemente abierto después de la despolarización. Además, un mutante *shaker* del conducto que carece de 42 aminoácidos cerca del extremo aminico se abre en respuesta a la despolarización pero no se inactiva. Lo más revelador de esto es que se puede restablecer la inactivación añadiendo un péptido sintético correspondiente a los 20 primeros residuos del conducto nativo.

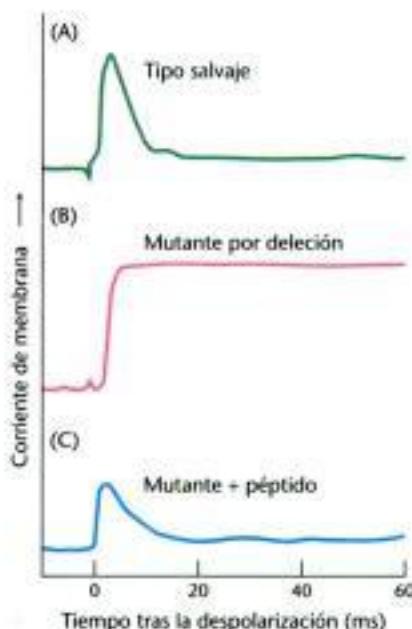


Figura 13.24 Inactivación del conducto de potasio. La región del extremo aminico de la cadena del conducto del potasio es crítica para la inactivación. (A) El conducto del potasio de la cepa salvaje Shaker muestra una inactivación rápida a continuación de la apertura. (B) El conducto de un mutante al que le faltan los residuos del 6 al 46 no se inactiva. (C) Se puede restaurar la inactivación añadiendo un péptido formado por los residuos 1 a 20 a una concentración 100 μ M. [Tomado de W. N. Zagotta, T. Hoshi y R. W. Aldrich. Science 250 (1990): 568-571.]

Estos experimentos apoyan con fuerza el *modelo de la cadena de presidiario* (*ball-and-chain model*) para la inactivación del conducto, que se había propuesto unos años antes (Figura 13.25). De acuerdo a este modelo, los primeros 20 residuos del conducto del potasio forman una unidad citoplasmática (la *bola*) que está unida a un segmento flexible del polipéptido (la *cadena*). Cuando el conducto está cerrado, la bola rota libremente en el espacio acuoso. Cuando el conducto se abre, la bola encuentra un centro complementario en el poro y lo tapona. Por lo tanto, el conducto se abre durante un intervalo breve antes de sufrir la inactivación por taponamiento.

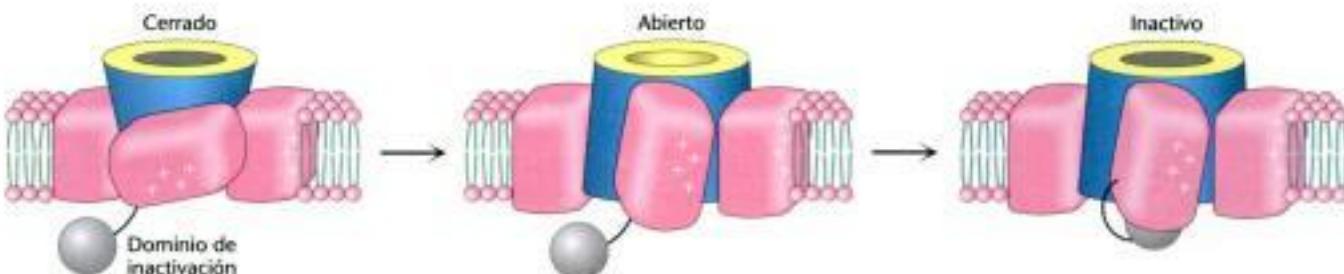


Figura 13.25 Modelo de la cadena de presidiario para la inactivación del conducto. El dominio de inactivación (la "bola" en gris) está enlazado al conducto por una cadena flexible. En el estado cerrado, la bola está localizada en el citoplasma. La despolarización abre el conducto y crea un centro de unión para la bola cargada positivamente, cerca de la boca del poro. El desplazamiento de la bola hacia este centro inactiva el conducto taponándolo.

Si acortamos la cadena aceleramos la inactivación porque la bola encuentra su objetivo más rápidamente. A la inversa, si alargamos la cadena ralentizamos la inactivación. Por lo tanto, la duración del estado abierto está controlada por la longitud y flexibilidad de la cadena. En cierto sentido, los dominios de la bola, que incluyen una región significativa con cargas positivas, pueden imaginarse como grandes cationes encadenados que se empujan hacia el interior del poro abierto donde se estancan y bloquean la conductancia a otros iones.

El receptor de acetilcolina es el arquetipo para los conductos regulados por ligando

Los impulsos nerviosos se transmiten a través de la mayoría de las sinapsis mediante moléculas pequeñas y difusibles llamadas *neurotransmisores*. Un ejemplo de neurotransmisor es la *acetilcolina*. La membrana presináptica de una sinapsis está separada de la membrana postsináptica por un hueco de unos 50 nm denominado *hendidura sináptica*. La llegada de un impulso nervioso provoca la exportación sincronizada de unas 300 vesículas a la hendidura (Figura 13.26). La unión de acetilcolina a la membrana postsináptica cambia profundamente su permeabilidad a los iones, desencadenando un potencial de acción. La acetilcolina abre un solo tipo de conducto de cationes, llamado *receptor de acetilcolina*, que es permeable por igual tanto al Na^+ como al K^+ .

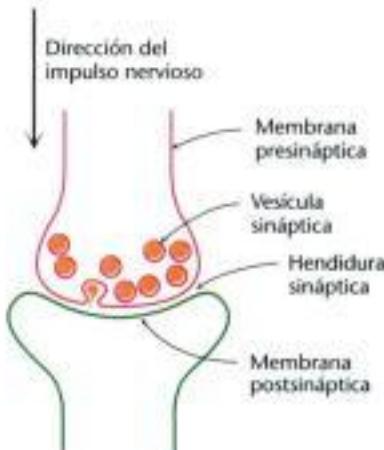
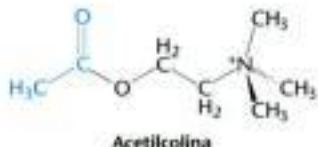


Figura 13.26 Representación esquemática de una sinapsis.



El pez-torpedo (*Torpedo marmorata*, también conocido como raya eléctrica) tiene un órgano eléctrico, rico en receptores de acetilcolina, que pueden liberar una descarga de unos 200 V durante aproximadamente 1 s. [Yves Gladu/Jacana/Photo Researchers.]

El receptor de acetilcolina es el mejor conocido de entre los *conductos regulados por ligando*. Este tipo de conductos está regulado no por voltaje sino por la presencia de ligandos específicos. La unión de acetilcolina al conducto desencadena su apertura transitoria. El órgano eléctrico de *Torpedo marmorata*, la raya eléctrica, es una fuente importante para el estudio de los receptores de acetilcolina porque sus electroplacas (células generadoras de voltaje) están muy enriquecidas en membranas postsinápticas colinérgicas. Los receptores están densamente empaquetados en estas membranas ($\sim 20\,000/\mu\text{m}^2$). El receptor de acetilcolina del órgano eléctrico se ha solubilizado añadiendo a las preparaciones de membrana postsináptica un detergente no iónico y se ha purificado por cromatografía de afinidad en una columna que contenía cobratoxina unida covalentemente (la cobratoxina es una toxina de serpientes constituida por una proteína pequeña que tiene una alta afinidad por los receptores de acetilcolina). Mediante la utilización de técnicas explicadas en el Capítulo 3, se estableció que este receptor de 268 kd es un pentámero formado por cuatro clases de subunidades transmembrana distintas — α_2 , β , γ y δ — distribuidas en forma anular de modo que forma un poro a través de la membrana.

El clonaje y la secuenciación de los cDNAs que codifican estas subunidades (50–58 kd) han demostrado que las cuatro tienen secuencias muy semejantes; los genes de estas cuatro subunidades α , β , γ y δ han aparecido por duplicación y diver-

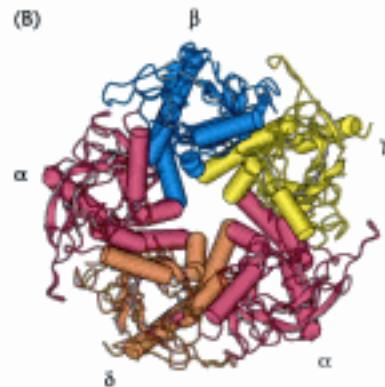
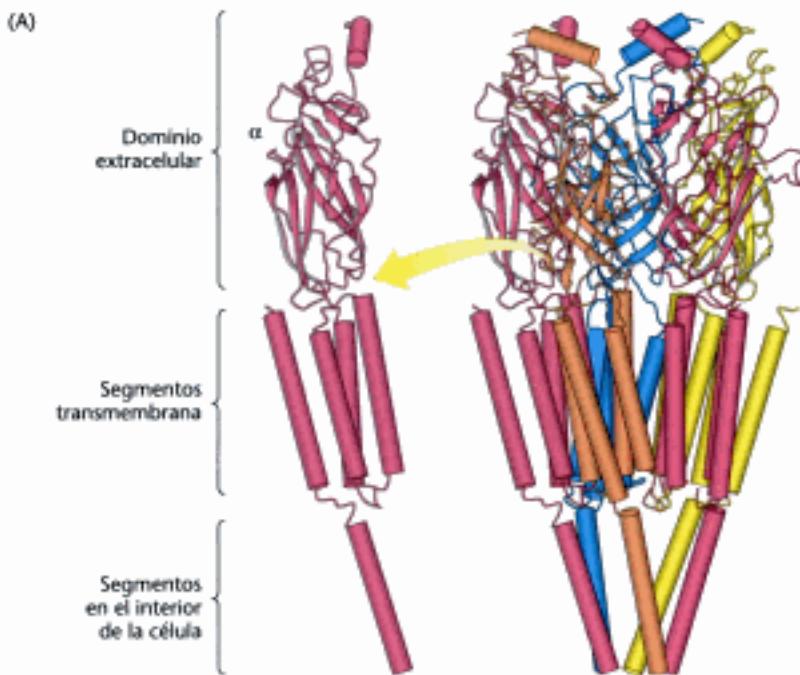


Figura 13.27 Estructura del receptor de la acetilcolina. El modelo de la estructura del receptor de la acetilcolina deducido a partir de estudios de microscopía electrónica de alta resolución revela que cada subunidad consta de un gran dominio extracelular, integrado principalmente por hebras β , cuatro hélices α transmembrana y una hélice α final en el interior de la célula. (A) Vista lateral del receptor pentamérico que muestra cada tipo de subunidad con un color distinto. Aisladamente se representa una copia de la subunidad α (B) Vista superior del conducto tomada desde el exterior de la célula. [Tomado de 2BG9.pdb.]

gencia de un gen ancestral común. Cada subunidad tiene un gran dominio extracelular seguido, en el extremo carboxilo, por cuatro segmentos, predominantemente hidrofóbicos que atravesan la bícapa de la membrana. La acetilcolina se une en las interfasas de $\alpha-\gamma$ y $\alpha-\delta$. Estudios por microscopía electrónica de receptores de acetilcolina purificados demostraron que la estructura tiene aproximadamente una simetría quinaria o pentagonal, en armonía con la similitud de sus cinco subunidades constituyentes (Figura 13.27).

¿Cuál es el mecanismo de la apertura del conducto? A este respecto puede ser muy revelador un análisis comparativo de las estructuras de las formas abierta y cerrada, pero esta comparación ha sido difícil de realizar. Criomicrografías electrónicas muestran que la unión de la acetilcolina al dominio extracelular provoca una alteración estructural que inicia la rotación de los cinco segmentos α -helicoides que revisten el poro transmembrana. Las secuencias aminoacídicas de estas hélices apuntan a la presencia de crestas alternantes de residuos pequeños polares o neutros (serina, treonina, glicina) y otros grandes apolares (isoleucina, leucina, fenilalanina). En el estado cerrado, los residuos grandes pueden obturar el conducto formando un anillo hidrofóbico ajustado (Figura 13.28). De hecho, cada subunidad tiene una voluminosa leucina en una posición crítica. La unión de la acetilcolina puede hacer rotar alosteíricamente las hélices transmembrana de forma que el poro quede forrado por residuos polares pequeños en lugar de estarlo por los residuos grandes hidrofóbicos. El poro, ahora más ancho y polar, estará abierto al paso de iones Na^+ y K^+ .

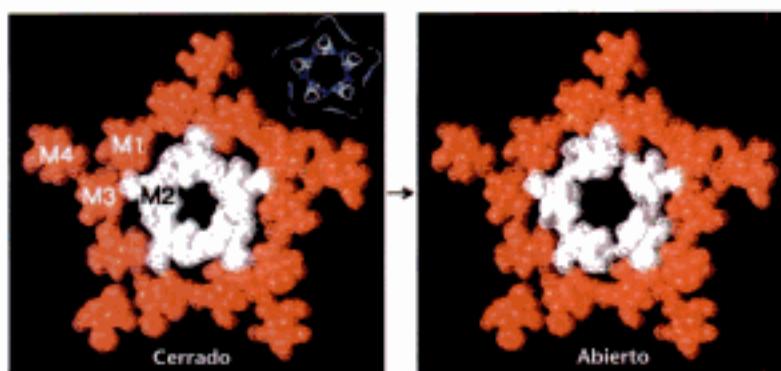


Figura 13.28 Apertura del poro del conducto de la acetilcolina. Secciones transversales de reconstrucciones, generadas por microscopía electrónica, del receptor de acetilcolina; a la izquierda se muestra la forma cerrada y, a la derecha, la abierta. (La forma abierta corresponde con la estructura reflejada en la Figura 13.27). Las zonas marcadas M1, M2, M3 y M4 corresponden a los cuatro helicoides α transmembrana de una subunidad. Las secciones transversales del conducto abierto se generaron mediante tratamiento del receptor con acetilcolina y congelando la muestra en 20 ms. Nótese que el hueco en el centro del conducto es significativamente mayor en la estructura abierta. La expansión del hueco se debe a la rotación de los helicoides M2 en unos 15 grados a lo largo de los ejes longitudinales. [Cortesía de Nigel Unwin.]

Los potenciales de acción integran el funcionamiento concertado de muchos conductos iónicos

Para comprobar como se coordina el funcionamiento de los conductos regulados por voltaje con los regulados por ligando vamos a repasar el potencial de acción que hemos mencionado al principio de esta sección. Inicialmente necesitamos introducir el concepto de *potencial de equilibrio*. Supongamos que una membrana separa dos soluciones que contienen concentraciones distintas del catión X⁺ (Figura 13.29). Sea [X⁺]_d la concentración de X⁺ en uno de los lados de la membrana (el correspondiente al interior, o "dentro" de la célula) y [X⁺]_f la concentración de X⁺ en el otro lado (es decir, el exterior de la célula o "fuera" de la célula). Suponer que se abre un conducto iónico que permite el movimiento de X⁺ a través de la membrana. ¿Qué pasará? Parece obvio que X⁺ se moverá a través de la membrana desde el compartimiento donde está a más concentración (A) al de menos concentración (B). Sin embargo, las cargas positivas empezarán a acumularse en la cara B, haciendo más difícil el desplazamiento de cada catión adicional a la cara B. El equilibrio se alcanzará cuando la fuerza impulsora del gradiente de concentración se contrarresta con la fuerza electrostática que se resiste al movimiento de cargas adicionales. En estas circunstancias el potencial de membrana viene dado por la *ecuación de Nernst*:

$$V_{eq} = -(RT/zF) \ln([X]_d/[X]_f)$$

$$= -(2,303)(RT/zF) \log_{10}([X]_d/[X]_f)$$

Donde R es la constante de los gases y F es la constante de Faraday (p. 353) y z es la carga del ion X (por ejemplo, +1 para X⁺).

El potencial de membrana en el equilibrio se denomina potencial de equilibrio para un determinado ion a una relación de concentraciones dada a través de la membrana. Para el sodio con [Na⁺]_d = 14 mM y [Na⁺]_f = 143 mM, el potencial de equilibrio es +62 mV a 37 °C. De forma similar, para el potasio con [K⁺]_d = 157 mM y [K⁺]_f = 4 mM, el potencial de equilibrio es -98 mV. En ausencia de estímulo, el potencial de reposo para una neurona típica es -60 mV. Este valor está cercano al potencial de equilibrio del K⁺ por el hecho de que hay un número pequeño de conductos de K⁺ abiertos.

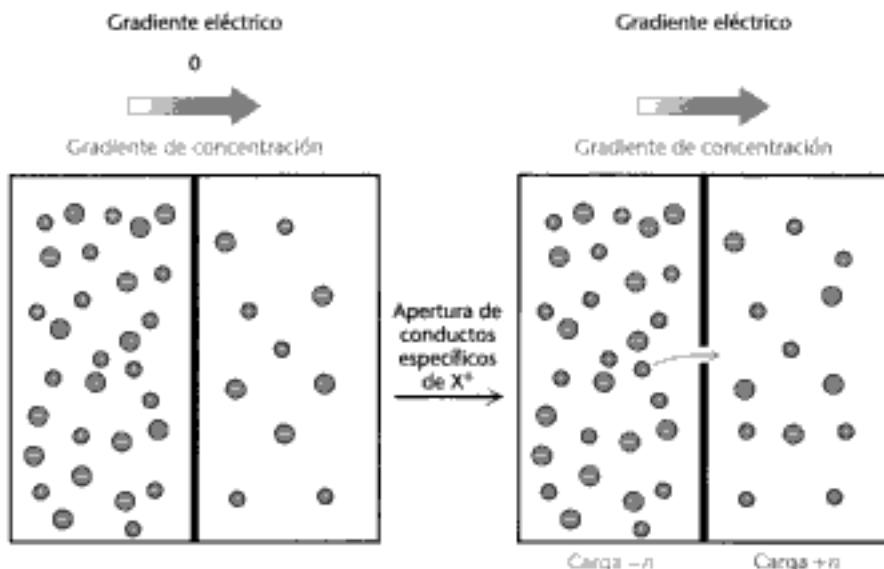


Figura 13.29 Potencial de equilibrio. El potencial de membrana alcanza el equilibrio cuando se compensa la fuerza impulsora debida al gradiente de concentración con la repulsión entre cargas del mismo signo, que se opone a la anterior.

Estamos ahora preparados para estudiar lo que pasa en la generación del potencial de acción (Figura 13.30). Inicialmente se libera un neurotransmisor como la acetilcolina desde una célula adyacente. La acetilcolina liberada se une a su receptor, provocando su apertura en menos de un milisegundo. El receptor de acetilcolina es un conducto inespecífico de cationes. Los iones sodio entran en la célula y los iones potasio salen de la célula. Sin más eventos adicionales, el potencial de membrana se movería hasta un valor que se correspondería con el promedio entre los potenciales de equilibrio de Na^+ y K^+ , aproximadamente -20 mV . Sin embargo, a medida que el potencial de membrana se aproxima a -40 mV , los remos sensores de voltaje de los conductos de Na^+ se mueven hacia la membrana, abriendo los conductos de Na^+ . Con estos conductos abiertos, los iones sodio fluyen rápidamente al interior de la célula y el potencial de membrana aumentará rápidamente hacia el potencial de equilibrio del Na^+ . Los remos sensores de voltaje de los conductos de K^+ también se mueven hacia la membrana a causa del cambio producido en el potencial de membrana, pero lo hacen más lentamente que los remos de los conductos de Na^+ . Sin embargo, tras aproximadamente 1 ms, empiezan a abrirse muchos conductos de K^+ . Al mismo tiempo, los dominios de inactivación, la “bola” bloquean los conductos abiertos, disminuyendo la corriente de Na^+ . Los receptores de acetilcolina, que desencadenaron estos sucesos, también se inactivan en esta escala de tiempo. Con los conductos de Na^+ inactivados y abiertos sólo los conductos de K^+ , el potencial de membrana cae rápidamente hacia el potencial de equilibrio del K^+ . Los conductos de K^+ abiertos también son susceptibles de inactivación por sus dominios “bola” y por tanto, también se bloquean sus corrientes. Con un potencial de membrana cercano al inicial, se liberan los dominios de inactivación y los conductos vuelven a sus estados originales cerrados. Estos eventos se propagan a lo largo de la neurona a medida que la despolarización de la membrana abre conductos en los fragmentos de membrana cercanos.

¿Cuánta corriente se establece en estos procesos? Esta pregunta puede dirigirse en dos direcciones complementarias. Primero, una célula nerviosa típica contiene 100 conductos de Na^+ por micra cuadrada. A un potencial de membrana de $+20\text{ mV}$, cada conducto tiene un flujo de 10^7 iones por segundo. Así, en un período de 1 milisegundo, fluyen aproximadamente 10^5 iones en cada micra cuadrada de superficie de membrana. Suponiendo un volumen celular de $10^4 \mu\text{m}^3$ y una superficie de área $10^4 \mu\text{m}^2$, esta velocidad de flujo iónico se corresponde con un aumento en la concentración de Na^+ menor del 1%. ¿Cómo puede ser esto? Se genera un potencial de acción robusto porque el potencial de membrana es muy sensible incluso a pequeños cambios en la distribución de carga. Esta sensibilidad hace que el potencial de acción sea un medio muy eficiente de señalización a lo largo de grandes distancias y con rápidas velocidades de repetición.

13.5 Los nexus (“gap junctions”) permiten el flujo de iones y moléculas pequeñas entre células comunicantes

Los conductos iónicos que hemos considerado hasta ahora tienen poros estrechos y son moderada o altamente selectivos para los iones a los que resultan permeables. Están cerrados en el estado de reposo y los estados abiertos tienen tiempos de vida cortos, normalmente de un milisegundo, lo que les permite transmitir señales nerviosas de alta frecuencia. Ahora nos centraremos en otro tipo de conducto con un propósito distinto. Son los *nexus* o *uniones íntimas* (en inglés: “gap junctions”), denominados también *conductos célula-célula*, porque comunican el interior de células contiguas. Los *nexus* se agrupan en regiones discretas de las membranas plasmáticas de células adyacentes. Las micrografías electrónicas de preparaciones laminares de *nexus* demuestran que están constituidos por unidades estrechamente empaquetadas en una disposición hexagonal regular (Figura 13.31) en las que destaca un orificio central de 20 Å de diámetro. Estos conductos atraviesan el espacio intermedio entre las células en contacto, es decir, la brecha (*gap* en inglés, de ahí el nombre de *gap junction*). La anchura del *nexus* entre los citoplasmas de las dos células es de unos 35 Å.

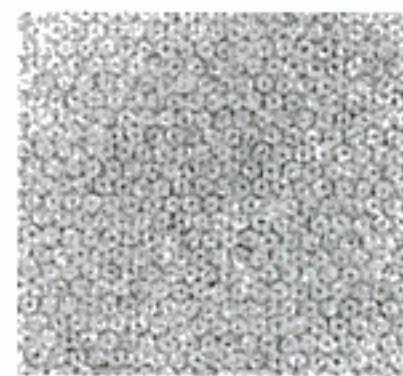
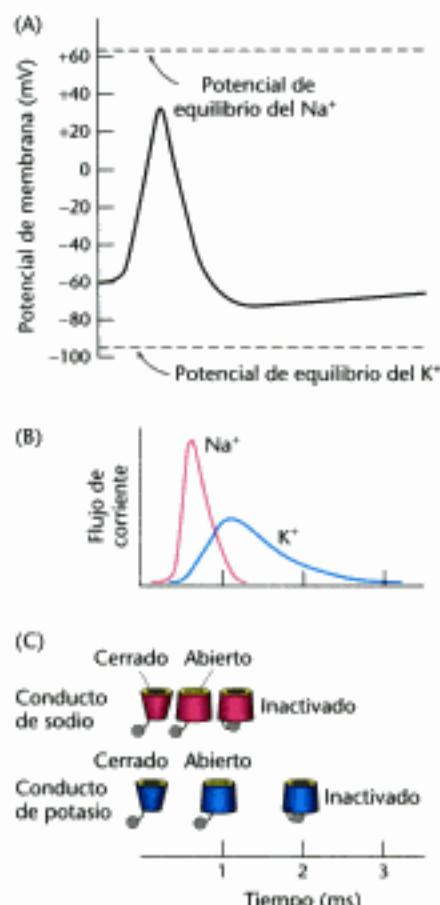


Figura 13.31 Nexus o uniones íntimas. Micrografía electrónica de láminas aisladas de uniones nexus (gap junctions). Estos nexus cilíndricos con una longitud de 85 Å están organizados formando un entramado hexagonal. El orificio electrodenso central tiene un diámetro de unos 20 Å. [Cortesía de los Dres. Nigel Unwin y Guido Zam-pighi.]

Tanto las pequeñas moléculas hidrofílicas como los iones pueden pasar a través de estos conductos o *nexus*. De hecho, el calibre de estos conductos se determinó mediante microinyección de una serie de moléculas fluorescentes en el interior de las células y observación de su paso a las células contiguas. Todas las moléculas polares con una masa inferior a 1 kd podían pasar fácilmente por estos conductos célula-célula. En otras palabras, *los iones inorgánicos y la mayoría de los metabolitos (azúcares, aminoácidos y nucleótidos) pueden fluir entre los citoplasmas de células conectadas por este tipo de unión*. Por el contrario, las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos son moléculas demasiado grandes para atravesar estos conductos. *Los nexus son importantes para la comunicación intercelular*. Las células de algunos tejidos excitables como el músculo cardíaco están conectadas por un rápido flujo de iones a través de estas uniones que asegura una respuesta rápida y sincrónica al estímulo. Los *nexus* son también esenciales para la nutrición de células que están alejadas de los vasos sanguíneos, como las del cristalino y el hueso. Además, estos conductos comunicantes revisten también importancia en el desarrollo y la diferenciación. Por ejemplo, el útero grávido, que durante la gestación es un protector del feto, se transforma en un potente eyector al comienzo del parto; en ese momento la formación de *nexus* funcionales crea un sincio de células musculares que se contraen sincrónicamente.

Un conducto célula-célula está constituido por doce moléculas de una proteína transmembrana llamada *conexina*, perteneciente a una familia de proteínas transmembrana con masas moleculares entre 30 y 42 kd. Cada molécula de conexina parece tener 4 hélices transmembrana. Seis moléculas de conexina se ensamblan hexagonalmente y forman un semiconducto denominado *conexión* o *hemicodo* (Figura 13.32). El ensamblaje de dos conexiones de células contiguas por sus extremos situados en el espacio intercelular determina la formación de un conducto funcional entre las dos células, que quedan así comunicadas. Los conductos de los *nexus* presentan tres diferencias respecto a otros conductos de membrana: (1) atraviesan *dos* membranas, en lugar de una; (2) comunican el citoplasma de una célula con el citoplasma de otra, en lugar de comunicar el citoplasma con el espacio extracelular o el interior de un orgánulo; (3) los conexiones que forman un conducto son sintetizados por células distintas. Los *nexus* se forman fácilmente cuando las células entran en contacto. Una vez formado, el conducto intercelular suele permanecer abierto durante unos segundos o minutos. Se cierra por efecto de altas concentraciones de ion calcio y por un descenso del pH. *El cierre de los nexus por Ca^{2+} e H^+ aísla las células normales de las estructuras vecinas traumatizadas o necrosadas*. Los *nexus* también están controlados por el potencial de membrana y por la fosforilación inducida por hormonas.

El genoma humano codifica 21 conexinas distintas. Diferentes miembros de esta familia se expresan en distintos tejidos. Por ejemplo, la conexina 26 se expresa en tejidos clave del oído. Las mutaciones en esta conexina están asociadas con sordera hereditaria. El mecanismo base para esta sordera parece asociarse con una insuficiencia en el transporte, entre células sensoriales, de iones o moléculas que son segundos mensajeros, como el inositol trifosfato.

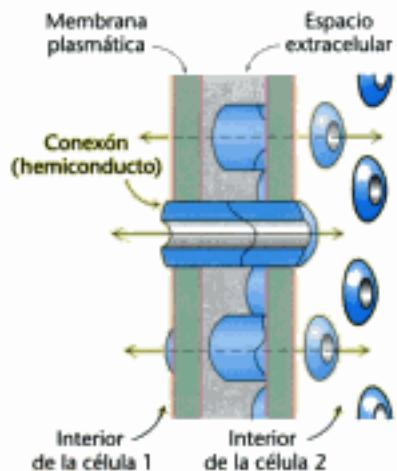


Figura 13.32 Representación esquemática de un *nexus*. [Cortesía del Dr. Werner Lowenstein.]

13.6 Unos conductos específicos aumentan la permeabilidad al agua de algunas membranas

Una clase importante de conductos no participa en absoluto en el transporte iónico. En su lugar, estos conductos aumentan la velocidad a la que fluye el agua a través de las membranas. Como se indicó en el Capítulo 12, las membranas son razonablemente permeables al agua. Entonces, ¿para qué se requieren los conductos de agua? En ciertos tejidos y bajo ciertas circunstancias, es necesario el transporte rápido del agua a través de las membranas. Por ejemplo, en el riñón, el agua debe reabsorberse rápidamente a la circulación sanguínea tras la filtración. Análogamente, en la secreción de la saliva o las lágrimas, el agua debe fluir rápidamente a través de las membranas. Estas observaciones sugieren la existencia de conductos específicos para el agua, pero, inicialmente, los conductos no pudieron identificarse.

Los conductos (ahora llamados *acuaporinas*) fueron descubiertos casi por azar. Peter Agre apreció en la membrana de eritrocitos la presencia de altos niveles de una proteína que antes no se había detectado porque la proteína no se tinte bien con azul Coomassie.

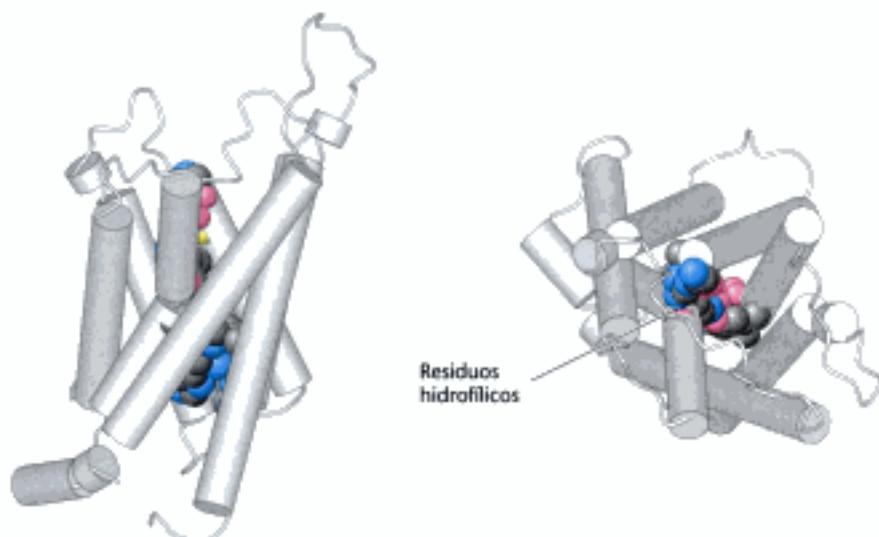


Figura 13.33 Estructura de la acuaporina.

La estructura de la acuaporina en una visión lateral (izquierda) y superior (derecha). Nótese que los residuos hidrofílicos (representados en modelos espaciales compactos) alinean el agua en el conducto. [Tomado de 1J4N.pdb.]

masie. Esta proteína se encontraba a altas concentraciones en los eritrocitos y en ciertos tejidos como riñones y córneas, precisamente aquellos tejidos que se pensaba contenían conductos de agua. En base a esta observación, se desarrollaron otros estudios que demostraron que esta proteína de membrana, de 24 kd, era ciertamente un conducto de agua.

Se ha determinado la estructura de la acuaporina (Figura 13.33). La proteína consiste en 6 hélices α transmembrana. El conducto en sí está forrado por dos lazos que contienen residuos hidrofílicos. Las moléculas de agua lo atraviesan en fila india a una velocidad de 10^6 moléculas por segundo. Es importante que, residuos específicos, cargados positivamente, y que se sitúan hacia el centro del conducto, evitan el transporte de protones a través de la acuaporina. De esta forma, los conductos de acuaporina no romperán el gradiente de protones, que juega un papel fundamental en la transducción de energía, como se verá en el Capítulo 18. Las acuaporinas revelan que los conductos pueden evolucionar de forma que no transporten iones, como lo pueden hacer aquellas.

Resumen

13.1 El transporte de moléculas a través de las membranas puede ser activo o pasivo

Para conseguir el desplazamiento neto de moléculas a través de las membranas se requieren dos condiciones: (1) la molécula debe ser capaz de atravesar una barrera hidrofóbica, y (2) una fuente de energía debe potenciar el movimiento. Las moléculas lipofílicas pueden moverse a través del interior hidrofóbico de la membrana por difusión simple. Estas moléculas se trasladan a favor de sus gradientes de concentración. Las moléculas polares o cargadas requieren proteínas que constituyan pasadizos a través de la barrera hidrofóbica. Cuando un ion o molécula cargada se desplaza a favor de su gradiente de concentración lo hace mediante transporte pasivo o difusión facilitada. Si una molécula se desplaza en contra de su gradiente de concentración, se precisa de una fuente de energía externa; este movimiento se denomina transporte activo y genera un gradiente de concentración. El potencial electroquímico mide la contribución combinada del gradiente de concentración y la distribución asimétrica de cargas a la hora de impulsar el transporte de diversas especies a través de la membrana.

13.2 Dos familias de proteínas de membrana emplean la hidrólisis del ATP para bombear iones a través de las membranas

El transporte activo se realiza a menudo a expensas de la hidrólisis de ATP. Las ATPasas de tipo P bombean iones en contra de gradiente de concentración y, durante el proceso de transporte, se fosforilan transitoriamente en un residuo de ácido aspártico. Las ATPasas de tipo P, dentro de las que se incluyen la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmico y la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, son proteínas integrales de membrana con estructuras y mecanismos catalíticos evolutivamente con-

servados. Otra familia de bombas dependientes de ATP la constituyen las proteínas de membrana con dominios de unión a ATP tipo *cassette*. Cada bomba contiene cuatro dominios principales: dos dominios que atraviesan la membrana y otros dos que contienen el lazo P con la *cassette* de unión a ATP de las estructuras ATPasa. Estas bombas no se fosforilan durante el bombeo; en su lugar, emplean la energía procedente de la unión e hidrólisis del ATP en impulsar los cambios conformacionales que resultan en el transporte de sustratos específicos a través de las membranas. Las proteínas de resistencia múltiple a fármacos confieren la resistencia a las células cancerosas mediante el bombeo de los fármacos de quimioterapia al exterior de la célula antes de que puedan ejercer sus efectos.

13.3 La lactosa permeasa es un arquetipo de transportadores secundarios que utilizan un gradiente de concentración para potenciar la formación de otro gradiente

Muchos sistemas de transporte activo acoplan el flujo en contra de gradiente de un ion o molécula al flujo a favor de gradiente de otra. Estas proteínas de membrana llamadas transportadores secundarios o cotransportadores pueden clasificarse como de antiporte o de simporte y de uniporte. Los transportadores por antiporte acoplan el flujo a favor de gradiente de un tipo de ion en una dirección al flujo de otro, en contra de gradiente, en la dirección contraria. Los transportadores por simporte desplazan ambos tipos de iones en la misma dirección. Los transportadores por uniporte facilitan la difusión de un sustrato en cualquier dirección siendo ésta determinada por la diferencia del potencial electroquímico a través de la membrana de dicha sustancia. Los estudios de la lactosa permeasa de *E. coli* han proporcionado una gran cantidad de información tanto de la estructura como del mecanismo de los transportadores secundarios.

13.4 Conductos específicos pueden realizar rápidamente el transporte de iones a través de las membranas

Los conductos iónicos permiten el movimiento rápido de iones a través de la barrera hidrofóbica de la membrana. Se puede estudiar la actividad individual de las moléculas de los conductos iónicos mediante técnicas de patch-clamp. Muchos de estos conductos iónicos tienen un marco estructural común. En el caso de los conductos de K^+ , los iones potasio hidratados deben perder transitoriamente sus moléculas de agua de coordinación para atravesar el conducto por su zona más estrecha, denominada filtro de selectividad. En el filtro de selectividad, hay grupos carbonilo peptídicos que se coordinan con los iones. El flujo rápido de los iones a través del filtro de selectividad está facilitado por las fuerzas de repulsión ion-ion, por las que un ion empuja al siguiente a través del conducto. Algunos conductos iónicos están regulados por voltaje; cambios en el potencial de membrana inducen cambios conformacionales que abren estos conductos. Muchos conductos, después de abrirse, se inactivan durante un periodo de tiempo corto. En algunos casos, la inactivación se produce por la unión a la entrada del conducto de un dominio denominado "bola" que lo bloquea. Otros conductos, exemplarizados por el receptor de la acetilcolina, se abren o cierran en respuesta a la unión a ligandos. Los conductos regulados por ligando y los regulados por voltaje operan concertadamente para generar el potencial de acción.

13.5 Los nexus ("gap junctions") permiten el flujo de iones y moléculas pequeñas entre células comunicantes

En contraste con muchos conductos, que conectan el interior de la célula con su entorno, los nexus o conductos intercelulares sirven para conectar el interior de grupos de células contiguas. Un conducto intercelular está compuesto de 12 moléculas de conexina que se asocian de 6 en 6 para formar dos conexiones.

13.6 Unos conductos específicos aumentan la permeabilidad al agua de algunas membranas

Algunos tejidos contienen proteínas que aumentan la permeabilidad de las membranas al agua. Cada proteína que forma el conducto al agua, llamada acuaporina, consta de seis hélices α y un conducto central rodeado de residuos hidrofilicos que permiten pasar las moléculas de agua en fila india. Las acuaporinas no transportan protones.

Términos clave

- bomba (p. 351)
 conducto (p. 351)
 transporte activo (p. 351)
 difusión facilitada (transporte pasivo) (p. 351)
 bombas impulsadas por ATP (p. 351)
 transportador secundario (p. 351)
 conducto iónico (p. 351)
 difusión simple (p. 352)
 potencial electroquímico (potencial de membrana) (p. 353)
 bomba de Na^+ y K^+ (ATPasa de Na^+ - K^+) (p. 354)
 ATPasa tipo P (p. 354)
 ATPasa de Ca^{2+} (ATPasa SR de Ca^{2+} o SERCA) (p. 355)
 eversión (p. 356)
- ATPasa de H^+ -K gástrica (p. 357)
 esteroide cardiotónico (p. 357)
 digital (p. 357)
 múltiple resistencia a drogas (p. 358)
 dominio cassette de unión a ATP (dominio ABC) (p. 358)
 transportador tipo ABC (p. 358)
 transportador por cotransporte (p. 360)
 transportador por antiporte (p. 360)
 transportador por simporte (p. 360)
 lactosa permeasa (p. 360)
 conducto iónico (p. 362)
 impulso nervioso (p. 362)
 potencial de acción (p. 362)
 técnica de patch-clamp (p. 363)
- gigasellado (p. 363)
 filtro de selectividad (p. 365)
 conducto regulado por voltaje (p. 366)
 modelo de la bola y la cadena (cadena de presidiario) (p. 367)
 neurotransmisor (p. 368)
 acetilcolina (p. 368)
 hendidura sináptica (p. 368)
 receptor de acetilcolina (p. 368)
 conducto regulado por ligando (p. 368)
 potencial de equilibrio (p. 372)
 ecuación de Nernst (p. 372)
 nexus (gap junction) (p. 373)
 conexina (p. 374)
 conexión (bienconducto) (p. 374)
 acuaporina (p. 374)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Lancaster, C. R. 2004. Structural biology: Ion pump in the movies. *Nature* 432: 286-287.
- Unwin, N. 2003. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 555: 91-95.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Venner, G., Iwata, S. y Kaback, H. R. 2003. The lactose permease of *Escherichia coli*: Overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* 555: 96-101.
- Lienhard, G. E., Slot, J. W., James, D. E. y Mueckler, M. M., 1992. How cells absorb glucose. *Sci. Am.* 266(1): 86-91.
- King, L. S., Kozono, D. y Agre, P. 2004. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 687-698.
- Neher, E. y Sakmann, B., 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 28-35.
- Sakmann, B., 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256: 503-512.

Libros

- Ashcroft, F. M., 2000. *Ion Channels and Disease*. Academic Press.
- Conn, P. M. (Ed.), 1998. *Ion Channels*, vol. 293, *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Aidley, D. J. y Stamford, P. R., 1996. *Ion Channels: Molecules in Action*. Cambridge University Press.
- Hille, B., 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2d ed.). Sinauer.
- Lüger, P., 1991. *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer.
- Stein, W. D., 1990. *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*. Academic Press.
- Hodgkin, A., 1992. *Chance and Design: Reminiscences of Science in Peace and War*. Cambridge University Press.

ATPasas tipo P

- Sorensen, T. L., Moller, J. V. y Nissen, P. 2004. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304: 1672-1675.
- Sweadner, K. J. y Donnet, C. 2001. Structural similarities of Na-K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 356: 685-704.

- Toyoshima, C. y Mizutani, T. 2004. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analog. *Nature* 430: 529-535.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
- Aer, M., Scarborough, G. A. y Kuhlbrandt, W. 1998. Three-dimensional map of the plasma membrane H^+ -ATPase in the open conformation. *Nature* 392: 840-843.
- Axelsen, K. B. y Palmiter, M. G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.
- Pedersen, P. A., Jorgensen, J. R. y Jorgensen, P. L. 2000. Importance of conserved α -subunit $^{108}\text{GDGVND}$ for Mg^{2+} binding, phosphorylation, energy transduction in Na-K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 37588-37595.
- Blanco, G. y Mercer, R. W. 1998. Isoenzymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275: F633-F650.
- Estes, J. W. y White, P. D. 1965. William Withering and the purple foxglove. *Sci. Am.* 212(6): 110-117.

Proteínas ABC o con cassette de unión a ATP

- Locher, K. P. 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 426-431.
- Locher, K. P., Lee, A. T. y Rees, D. C. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296: 1091-1098.
- Reyes, C. L. y Chang, G. 2005. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 308: 1028-31.
- Burts, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T. y Rees, D. C. 2002. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16642-16647.
- Chang, G. 2003. Structure of MsbA from *Vibrio cholerae*: A multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J. Mol. Biol.* 330: 419-430.
- Dong, J., Yang, G. y McHershey, H. S. 2005. Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308: 1023-1028.
- Akabas, M. H. 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* 275: 3729-3732.

- Chen, J., Shamma, S., Quirocho, F. A. y Davidson, A. L. 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 1525-1530.
- Sheppard, D. N. y Welsh, M. J. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* 79: S23-S45.
- Jones, P. M. y George, A. M. 2000. Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters: What goes around comes around. *Eur. J. Biochem.* 287: 5298-5305.
- Chen, Y. y Simon, S. M. 2000. In situ biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. *J. Cell Biol.* 148: 863-870.
- Saier, M. H., Jr., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A. y Nikaido, H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12: 265-274.

Transportadores por simporte o antiporte

- Abrahamson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R. y Iwata, S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615.
- Philipson, K. D. y Nicoll, D. A. 2000. Sodium-calcium exchange: A molecular perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 111-133.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. y Saier, M. H., Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbial Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- Wright, E. M., Hirsch, J. R., Lee, D. D. y Zampighi, G. A. 1997. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* 200: 287-293.
- Kaback, H. R., Bibi, E. y Roepe, P. D. 1990. β-Galactoside transport in *E. coli*: A functional dissection of lac permease. *Trends Biochem. Sci.* 8: 309-314.
- Hilgemann, D. W., Nicoll, D. A. y Philipson, K. D. 1991. Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature* 352: 715-718.
- Hediger, M. A., Turk, E. y Wright, E. M. 1989. Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *Escherichia coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 5748-5752.

Conductos iónicos regulados por ligando

- Zhou, Y. y MacKinnon, R. 2003. The occupancy of ions in the K selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333: 965-975.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. y MacKinnon, R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417: 523-526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. y MacKinnon, R. 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 42-48.
- Mackinnon, R. 2004. Structural biology: Voltage sensor meets lipid membrane. *Science* 306: 1304-1305.
- Becerrilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80: 555-592.
- Sheehan, C.-C., Coghill, M., Sullivan, J. P. y Gopalakrishnan, M. 2000. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* 52: 557-594.
- Hoorn, R. 2000. Conversation between voltage sensors and genes of ion channels. *Biochemistry* 39: 15653-15658.

- Peronio, E., Cortes, D. M. y Cuello, L. G. 1999. Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* 285: 73-78.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. y MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Marban, E., Yamagishi, T. y Tomaselli, G. F. 1998. Structure and function of the voltage-gated Na⁺ channel. *J. Physiol.* 508: 647-657.
- Miller, R. J. 1992. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 267: 1403-1406.
- Cantrell, W. A. 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: A tale of two calcium channels. *Cell* 64: 871-874.

Bombas de iones impulsadas por ATP

- Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346: 967-989.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. y Unwin, N. 1999. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: Transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol. Biol.* 288: 765-786.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515-522.
- Barrantes, F. J., Antolini, S. S., Blaum, M. P. y Prieto, M. 2000. Topography of the nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J. Biol. Chem.* 275: 37333-37339.
- Cordero-Erausquin, M., Marubio, L. M., Klink, R. y Changeux, J. P. 2000. Nicotinic receptor function: New perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 211-217.
- Le Novère, N. y Changeux, J. P. 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40: 155-172.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumazawa, T., Nakanishi, S., Jingami, H. y Morikawa, K. 2000. Structural basis of glutamate recognition by dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-978.
- Betz, H., Kuhse, J., Schmitz, V., Laube, B., Kirsch, J. y Harvey, R. J. 1999. Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 868: 667-676.
- Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373: 37-43.
- Colquhoun, D. y Sakmann, B. 1981. Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels. *Nature* 294: 464-466.

Nexus ("gap junctions")

- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D. y Beyer, E. C. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83: 1359-1400.
- Revilla, A., Bennett, M. V. L. y Barrio, L. C. 2000. Molecular determinants of membrane potential dependence in vertebrate gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14760-14765.
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B. y Yeager, M. 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283: 1176-1180.
- Simon, A. M. 1999. Gap junctions: More roles and new structural data. *Trends Cell Biol.* 9: 169-170.
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukanovas, F. F., Pozzan, T. y Mammano, E. 2005. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat. Cell Biol.* 7: 63-69.
- White, T. W. y Paul, D. L. 1999. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 283-310.

Conductos de agua

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A. y Nielsen, S. 2002. Aquaporin water channels: From atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3-16.

Agre, P. y Kozono, D. 2003. Aquaporin water channels: Molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555: 72-78.
de Groot, B. L., Engel, A. y Grubmüller, H. 2003. The structure of the aquaporin-1 water channel: A comparison between cryoelectron microscopy and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* 325: 485-493.

Problemas

1. *El precio de la expulsión.* ¿Cuál es el coste en energía libre para la expulsión de Ca^{2+} de la célula cuando su concentración en el citoplasma es $0.4 \mu\text{M}$, la extracelular es 1.5 mM , y el potencial de membrana es -60 mV ?

2. *¡Qué dulce es!* La glucosa se transporta, en algunas células, mediante un transporte por simple impulsado por la entrada simultánea de Na^+ . La entrada de Na^+ suministra, en condiciones celulares típicas, un aporte de energía libre de 10.8 kJ mol^{-1} ($2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) (suponer $[\text{Na}^+]_{\text{interior}} = 14 \text{ mM}$ y $[\text{Na}^+]_{\text{exterior}} = 143 \text{ mM}$ y un potencial de membrana = -50 mV). ¿Qué gradiente de concentración de glucosa se puede generar con esta aportación de energía libre?

3. *Variaciones sobre el tema.* Realizar un esquema que describa el mecanismo detallado para el transporte por la ATPasa de Na^+-K^+ basándose en su analogía con el mecanismo de la ATPasa de Ca^{2+} mostrado en la Figura 13.5.

4. *Bombeo de protones.* Diseñar un experimento para demostrar que se puede invertir el funcionamiento de la lactosa permeasa *in vitro* y bombear protones.

5. *Sentidos diferentes.* Los conductos de sodio y los de potasio tienen estructuras similares y están distribuidos con la misma orientación en la membrana celular, pero el conducto de sodio permite la entrada de sodio en la célula, y el de potasio, su salida. Proporcionar una explicación.

6. *Relaciones estructura-actividad.* Basándose en la estructura de la tetrodotoxina, proponer un mecanismo por el que esta toxina inhibía el flujo de sodio a través del conducto de sodio.

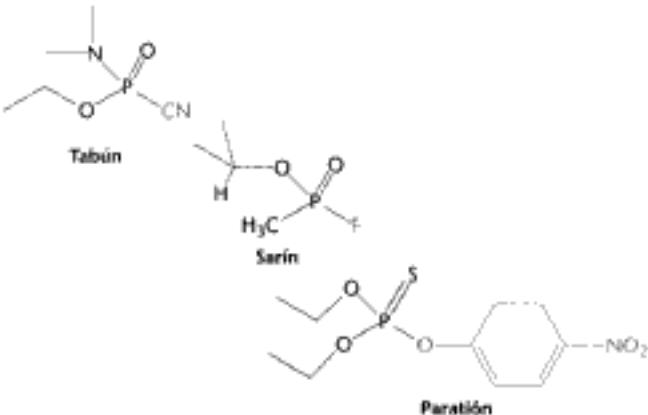
7. *Un caracol peligroso.* Los caracoles del género *Cowles* son carnívoros; inyectan un potente conjunto de toxinas a su presa, provocando su rápida parálisis. Muchas de estas toxinas se unen específicamente a proteínas que son conductos iónicos. ¿Por qué son tan tóxicas esas moléculas? ¿En qué forma resultan útiles esas toxinas para los estudios bioquímicos?

8. *Sólo unos pocos.* ¿Por qué se precisa el flujo de sólo unos pocos iones sodio a través del conducto de sodio para cambiar significativamente el potencial de membrana?

9. *Conductos mecanosensores.* Muchas especies contienen conductos iónicos que responden a estímulos mecánicos. Basándose en las propiedades de otros conductos iónicos, sería de esperar que el flujo de iones a través de un único conducto mecanosensor abierto aumentara en respuesta a un estímulo apropiado. Justificar la respuesta.

10. *Apertura concertada.* Suponer que el funcionamiento de un conducto obedece al modelo alostérico concertado (modelo MWC, p. 200). La unión de un ligando al estado R (la forma abierta) es 20 veces más fuerte que la misma unión al estado T (la forma cerrada). En ausencia de ligando, la proporción de conductos cerrados a abiertos es de 10^5 . Si el conducto es un tetramero, ¿cuál es la fracción de conductos abiertos cuando están unidos 1, 2, 3 o 4 ligandos?

11. *Parálisis respiratoria.* El neurotransmisor acetilcolina se degrada por un enzima específico que se inactiva por el tabúin, sarín y paratón. Según sus estructuras aquí representadas, proponer cuál puede ser la base molecular de sus acciones letales.



12. *Apertura de conductos regulada por ligando.* La proporción entre las formas abierta y cerrada del conducto del receptor de la acetilcolina que contiene 0, 1 y 2 acetilcolinas unidas es 5×10^{-6} , 1.2×10^{-3} y 14, respectivamente.

- ¿En qué factor se aumenta la proporción forma abierta/cerrada por la unión de la primera acetilcolina y por la segunda acetilcolina?
- ¿Cuáles son las aportaciones de energía libre correspondientes a la apertura del conducto a 25°C ?
- ¿Se adecua esta transición alostérica al modelo concertado de MWC (p. 200)?

13. *Rana venenosa.* La batracotoxina (BTX) es un alcaloide esteroideo de la piel de una rana colombiana (*Phrynobatrachus terribilis*) que es venenoso, y se emplea en los dardos de las cerbatanas. En presencia de BTX, los conductos del sodio de una zona estudiada por patch-clamp permanecen persistentemente abiertos cuando se despolariza la membrana. Se cierran cuando la membrana se repolariza. ¿Qué transición está bloqueada por el BTX?

14. *Diana del Valium.* El ácido γ -aminobutírico (GABA) abre conductos específicos para los iones cloruro. El conducto del receptor GABA_A es farmacológicamente importante al ser la molécula-diana del Valium, un medicamento que se utiliza para disminuir la ansiedad.

- La concentración extracelular de Cl^- es 123 mM , y la intracelular, 4 mM . ¿En qué sentido fluirá el Cl^- a través del conducto abierto cuando el potencial de membrana se encuentre en el margen de -60 mV a $+30 \text{ mV}$?
- ¿Cuál es el efecto de la apertura del conducto del cloruro en la excitabilidad de una neurona?

(c) El perfil de hidropatía del receptor GABA_A se parece al del receptor de la acetilcolina. Predecir el número de subunidades en este conducto de cloruro.

Problema de integración del Capítulo

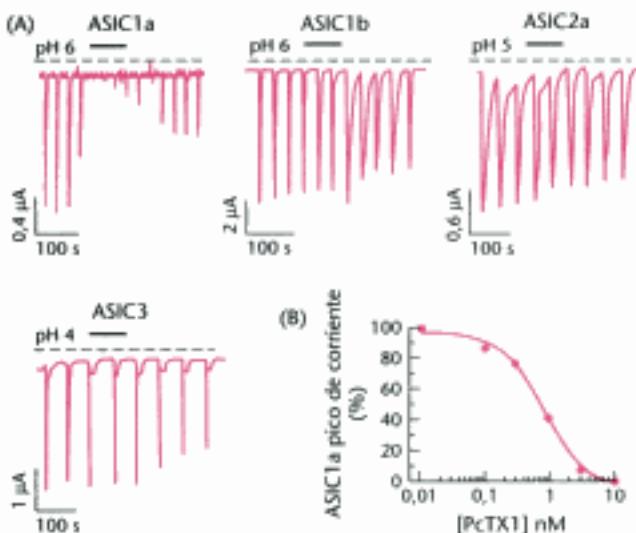
15. *Un caso de velocidad y eficiencia.* La acetilcolina se destruye rápidamente por la acetilcolinesterasa. Este enzima que tiene un número de recambio de 25 000 por segundo ha alcanzado la perfección catalítica con un k_{cat}/K_M de $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. ¿Por qué es desde el punto de vista fisiológico tan crucial que este enzima sea muy eficiente?

Problema sobre mecanismo

16. *Recuerdos de mecanismos pasados.* La acetilcolinesterasa convierte la acetilcolina en acetato y colina. Como las proteasas de serina, la acetilcolinesterasa se inhibe por DIPF. Proponer un mecanismo catalítico para la digestión de la acetilcolina por la acetilcolinesterasa. Mostrar la reacción según las estructuras químicas.

Problema de interpretación de datos

17. *La toxina de la tarántula.* La sensación de ácido se relaciona con el dolor, el gusto y otras actividades biológicas (Capítulo 32). La percepción del ácido se realiza por un conducto regulado por ligando que permite una entrada de Na⁺ en respuesta a los H⁺. Esta familia de conductos iónicos sensibles al ácido (ASICs) comprende un gran número de miembros. La Psalmotoxina 1 (PcTX1), un veneno de la tarántula, inhibe algunos miembros de esta familia. En la parte inferior se muestran registros electrofisiológicos de células que contienen alguno de los muchos miembros de la familia ASIC realizados en presencia de la toxina a una concentración de 10 nM. Los conductos se abren cambiando el pH desde 7,4 al valor indicado en cada caso. La PcTX1 estaba presente durante un tiempo corto (indicado por la barra negra encima de los registros) tras el cual se eliminó rápidamente del sistema mediante lavado.



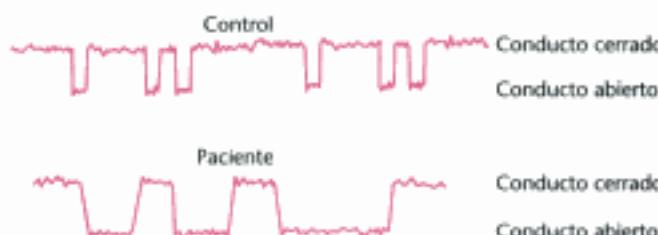
(A) Registros electrofisiológicos de células expuestas a la toxina de la tarántula. (B) Representación del pico de corriente de una célula que contiene la proteína ASIC frente a la concentración de toxina. [De P. Escoubas et al; 2000, J.Biol.Chem., 275: 25116-25121.]

(a) ¿Cuál de los miembros de la familia ASIC (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a o ASIC3) es la más sensible a la toxina?

(b) ¿Es reversible el efecto de la toxina? Dar una explicación.

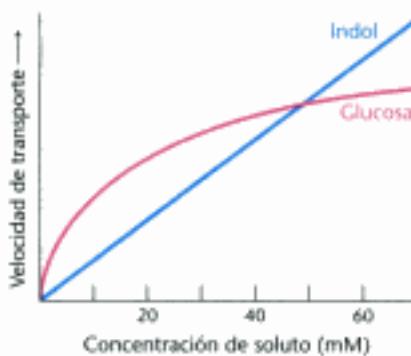
(c) ¿Qué concentración de PcTX1 produce el 50% de la inhibición del conducto?

18. *Problema de conducto 1.* Como consecuencia de mutaciones en el conducto receptor de la acetilcolina se producen algunas situaciones patológicas. Una de estas mutaciones en la subunidad β , $\beta V266M$, provoca debilidad muscular y fatiga rápida. Una investigación de las corrientes generadas por la acetilcolina a través del conducto del receptor de la acetilcolina para el control y el paciente proporcionaron los resultados siguientes. ¿Cuál es el efecto de la mutación en la función del conducto? Sugerir alguna posible explicación bioquímica para ese efecto.

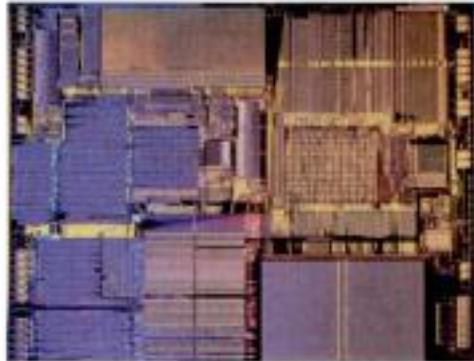


19. *Problema de conducto 2.* El conducto del receptor de la acetilcolina puede sufrir también una mutación que provoca el síndrome del conducto rápido (PCS) con manifestaciones clínicas similares a las del síndrome del conducto lento (SCS). ¿Cómo serían los registros electrofisiológicos en este síndrome? Sugerir una explicación bioquímica.

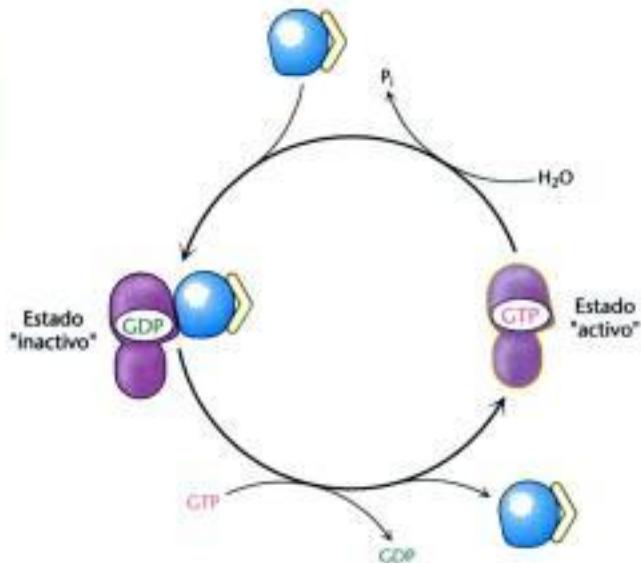
20. *Diferencias en el transporte.* Abajo se muestran las velocidades del transporte de dos moléculas, indol y glucosa, a través de las membranas celulares. ¿Cuáles son las diferencias entre los mecanismos del transporte de estas dos moléculas? Suponer que la ouabafina inhibía el transporte de la glucosa. ¿Qué sugeriría esta inhibición acerca del mecanismo de transporte?



Vías de transducción de señales



En los sistemas biológicos, los circuitos de transducción de señales tienen conmutadores activo/inactivo similares a los existentes en los ordenadores (arriba) que transmiten cuando están "activos". Entre estos conmutadores moleculares son frecuentes las proteínas G (derecha), que transmiten la señal cuando están unidas a GTP y permanecen silentes cuando están unidas a GDP. [Izquierda] Cortesía de Intel.]



La célula responde de forma extremadamente significativa a determinados compuestos químicos de su entorno: puede adaptar su metabolismo o alterar el patrón de expresión de genes al sentir su presencia. En organismos pluricelulares, estas señales químicas son cruciales para coordinar las respuestas fisiológicas (Figura 14.1). Tres ejemplos de señales moleculares que estimulan una respuesta fisiológica son la adrenalina (también llamada epinefrina), la insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Cuando un organismo sufre una amenaza, las glándulas adrenales, localizadas sobre los riñones, liberan la hormona adrenalina, la cual estimula la movilización de los almacenes de energía dirigida a mejorar las funciones cardíacas. Después de una comida, las células β del páncreas liberan insulina, que estimula la captura de glucosa del torrente sanguíneo y produce otros cambios fisiológicos. La liberación del factor de crecimiento epidérmico en respuesta a una herida, estimula el crecimiento y división de células específicas. En todos estos casos, la célula recibe la información de que una molécula concreta en su entorno está presente a una concentración por encima de cierto umbral. La cadena de eventos que convierten el mensaje "esta molécula está presente" en la respuesta fisiológica final se denomina *transducción de la señal*.

Las vías de transducción de señales se caracterizan a menudo, por contener varios componentes y ramificaciones. Pueden ser extremadamente complicadas y confusas. Sin embargo, las estrategias y las clases de moléculas se repiten en muchas vías de señalización. Examinando los principios que subyacen en estos hechos comunes se puede desvelar la lógica de las vías de transducción de señales. Presenta-

Contenido

- 14.1 Las proteínas G heterotriméricas transmiten señales y se desactivan a sí mismas
- 14.2 Señalización por insulina: las cascadas de fosforilación son primordiales en muchos procesos de transducción de señales
- 14.3 Señalización por EGF: los sistemas de transducción de señales están preparados para responder
- 14.4 Muchos elementos de las diferentes vías de transducción de señales son recurrentes con variaciones
- 14.5 Los defectos en las vías de transducción de señales pueden provocar cáncer y otras enfermedades

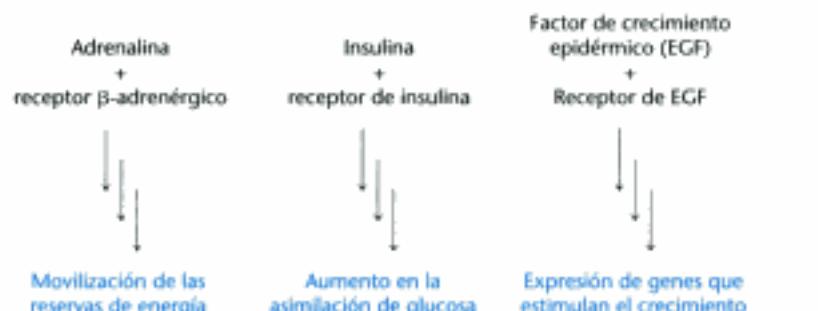


Figura 14.1 Tres vías de transducción de señales. La unión de las moléculas de señalización a sus receptores inicia las vías que producen respuestas fisiológicas importantes.

mos los principios de la transducción de señales aquí porque las vías de transducción de señales afectan esencialmente a todas las vías metabólicas que exploraremos a lo largo del resto del libro.

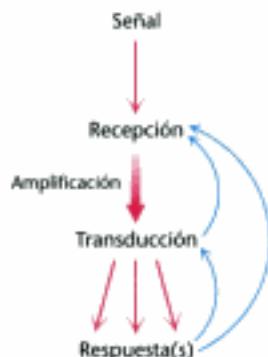


Figura 14.2 Principios de la transducción de señales. Inicialmente se recibe una señal del entorno que interacciona con un componente celular, normalmente un receptor de la superficie celular. La información que porta la señal recibida se transforma en otros compuestos químicos, es decir, se *transduce*. El proceso de transducción consta, habitualmente, de varias etapas. Con frecuencia la señal se amplifica antes de provocar una respuesta. La retroalimentación de las vías regula por completo el proceso de señalización.

La transducción de señales depende de circuitos moleculares

Las vías de transducción de señales presentan, en términos generales, un comportamiento similar que puede presentarse como un circuito molecular (Figura 14.2). Todos esos circuitos contienen ciertas etapas clave:

1. *Liberación de un primer mensajero.* Un estímulo del tipo de una herida o un alimento digerido provoca la liberación de la molécula señalizadora, también llamada *primer mensajero*.

2. *Recepción del primer mensajero.* La mayor parte de las moléculas señalizadoras no entran en las células. En vez de eso, las proteínas de la membrana celular actúan como *receptores* que unen las moléculas señalizadoras y transfieren al interior de la célula la información que éstas han recogido del medio. Los receptores atraviesan la membrana celular y, por tanto, tienen componentes extracelulares e intracelulares. Un lugar de unión en el lado extracelular reconoce específicamente la molécula señalizadora (llamada habitualmente *ligando*). Estos centros de unión son análogos al centro activo de los enzimas con la excepción de que no presentan actividad catalítica. La interacción entre el ligando y el receptor altera la estructura terciaria o cuaternaria del receptor, incluido el dominio intracelular.

3. *Difusión del mensaje dentro de la célula por el segundo mensajero.* Otras moléculas pequeñas llamadas *segundos mensajeros* se utilizan para la transmisión de la información desde los complejos receptor-ligando. Los segundos mensajeros son moléculas intracelulares cuya concentración se modifica en respuesta a señales ambientales. Estos cambios en concentración constituyen la siguiente etapa del circuito de información molecular. Algunos segundos mensajeros especialmente importantes son el AMP cíclico y el GMP cíclico, los iones calcio, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG; Figura 14.3).

La utilización de segundos mensajeros tiene varias consecuencias. Primero, la señal puede amplificarse de forma notable mediante la producción de segundos mensajeros. La unión directa de las moléculas señalizadoras activa sólo un número pequeño de moléculas de receptor, pero cada receptor activado puede generar muchos segundos mensajeros. Por tanto *una baja concentración de moléculas señalizadoras en el medio extracelular, incluso tan pequeña como una molécula, puede dar lugar a una gran señal y a la respuesta intracelular consiguiente*. Segundo, los segundos mensajeros pueden, a menudo, difundir libremente a otros compartimientos celulares y así influir en procesos localizados en toda la célula. Tercero, el uso de segundos mensajeros comunes a muchas vías de señalización celular origina tanto ventaja

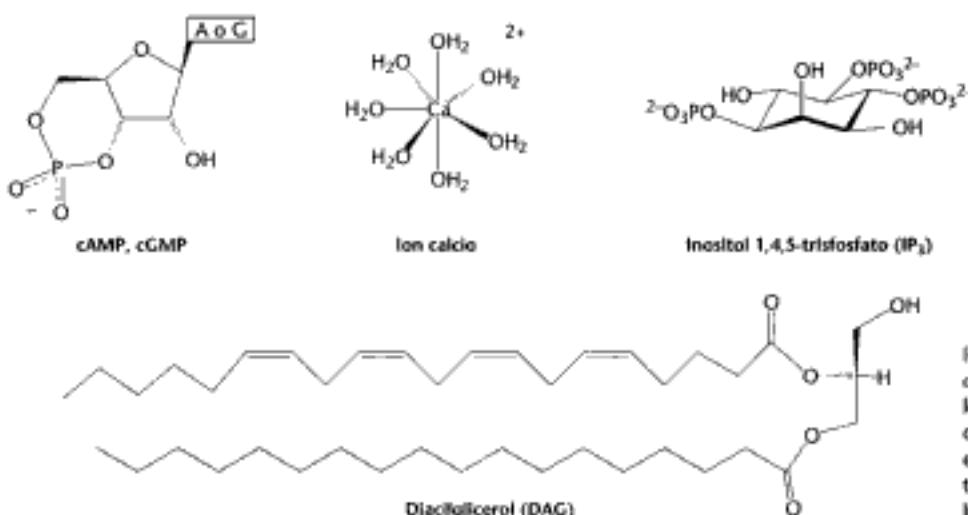


Figura 14.2 Segundos mensajeros frecuentes. Los segundos mensajeros son moléculas intracelulares que varían en su concentración como respuesta a las señales del entorno. Este cambio en su concentración transporta la información dentro de la célula.

jas como problemas potenciales. Los fenómenos de *conversación cruzada* (en inglés *cross talk*), entradas simultáneas procedentes de varias vías de señalización, pueden afectar a las concentraciones de segundos mensajeros comunes. Esta conversación cruzada permite una regulación más fina de la actividad celular que la derivada de la acción individual de varias vías independientes. Sin embargo, una conversación cruzada inadecuada puede originar una mala interpretación de las señales.

4. *Activación de efectores que alteran directamente la respuesta fisiológica.* El efecto último de la vía de señalización es activar (o inhibir) las bombas, enzimas y factores de transcripción de genes que controlan directamente las vías metabólicas, la activación de genes y procesos tales como la transmisión nerviosa.

5. *Finalización de la señal.* Después de que la célula ha completado su respuesta a la señal, el proceso de señalización celular debe terminar, o las células perderían su capacidad para responder a nuevas señales. Además, un proceso de transducción de señales que no finalice de forma adecuada puede tener consecuencias totalmente indeseables. Como vamos a ver, muchos cánceres están asociados con procesos de transducción de señales que no se han terminado adecuadamente, especialmente los que controlan el crecimiento celular.

En este capítulo se examinarán los componentes de las tres vías de transducción de señales de la Figura 14.1. Al hacerlo, se estudiarán varios tipos de dominios adaptadores de proteína presentes en proteínas transductoras de señales. Estos dominios reconocen, habitualmente, tipos específicos de moléculas y ayudan a transferir la información de una proteína a otra. Las moléculas descritas en el contexto de estas tres vías aparecen en muchas otras vías de transducción de señales; por tanto cabe recordar que estos ejemplos concretos son representativos para muchas de estas vías.

14.1 Las proteínas G heterotriméricas transmiten señales y se desactivan a sí mismas

La señalización por adrenalina se inicia al unirse el ligando a una proteína llamada el receptor β -adrenérgico (β -AR). El receptor β -adrenérgico es un miembro del extenso grupo de receptores de superficie celular, llamados *receptores de siete hélices transmembrana* (7TM). Algunos miembros de esta familia son responsables de la transmisión de la información iniciada por señales tan variadas como las hormonas, los neurotransmisores, los olores, los sabores e incluso los fotones (Tabla 14.1). Se conocen varios miles de tales receptores. Además, aproximadamente un 50% de los

Tabla 14.1 Funciones biológicas mediadas por receptores 7TM

- Acción hormonal
- Secreción hormonal
- Neurotransmisión
- Quimiotaxis
- Exocitosis
- Control de la presión arterial
- Embriogénesis
- Crecimiento celular y diferenciación
- Desarrollo
- Olfato
- Gusto
- Visión
- Infección vírica

Fuente: De J. S. Gutkind. *J. Biol. Chem.*, 273(1998): 1839-1842.

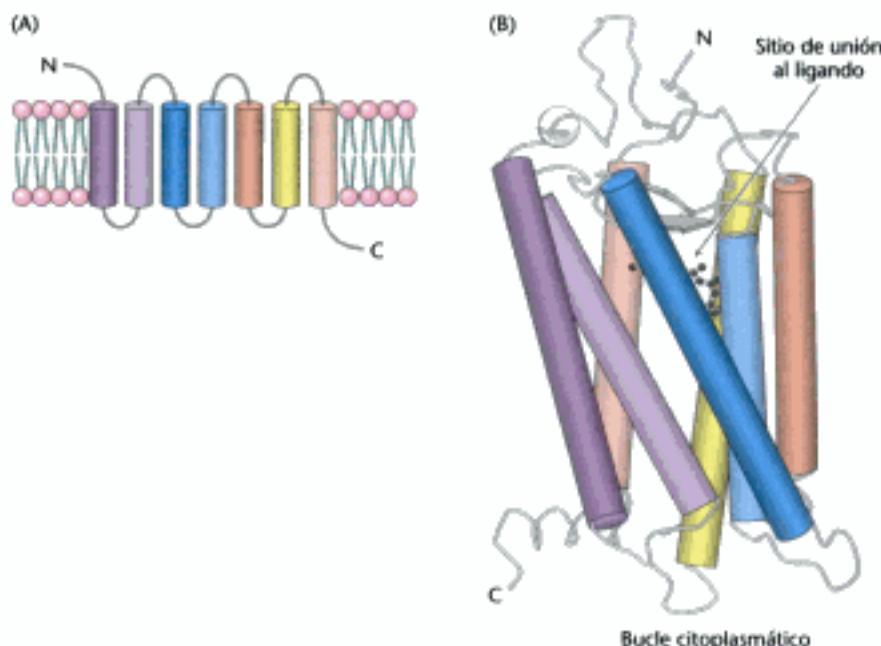
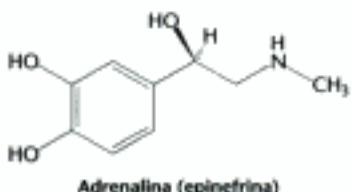


Figura 14.4 Estructura de un receptor 7TM. (A) Representación esquemática de un receptor 7TM mostrando como traspasa la membrana siete veces. (B) Estructura tridimensional de la rodopsina, un receptor 7TM que interviene en la transducción de la señal visual. Nótese el lugar de unión del ligando cerca de la superficie extracelular. Dado que fue el primer receptor 7TM para el que se determinó su estructura, sirve de modelo para comprender a otros receptores 7TM. [Tomado de 1F88.pdb.]

fármacos terapéuticos que usamos van dirigidos a receptores de este tipo. Como su nombre indica, estos receptores están formados por siete hélices que cruzan la bicapa de la membrana. En ocasiones, a estos receptores se les denomina *receptores serpenteantes* ya que su única cadena polipeptídica "serpentea" a través de la membrana siete veces (Figura 14.4A). El primer miembro de esta familia del que se determinó su estructura tridimensional fue la *rodopsina* (Figura 14.4B y Sección 32.3) la cual desempeña un papel esencial en la visión. Mientras varios receptores 7TM poseen una estructura muy similar a la rodopsina, otros tienen grandes dominios extracelulares.

La unión de la adrenalina a los β -AR provoca cambios conformacionales en los bucles citoplasmáticos y el extremo carboxilo, si bien los detalles de estos cambios conformacionales no se conocen todavía. Por tanto, la unión del ligando fuera de la célula provoca un cambio conformacional en el receptor 7TM que puede detectarse en el interior de la célula.



La unión del ligando a los receptores 7TM conduce a la activación de las proteínas G

¿Cuál es el paso siguiente en la vía de transducción después de la unión de la adrenalina al receptor β -adrenérgico? El cambio conformacional en el dominio citoplasmático del receptor activa una proteína, denominada *proteína G* porque se une a nucleótidos de guanina. La proteína G activada estimula la actividad de la adenilato ciclase, un enzima que aumenta la concentración de cAMP a partir de ATP. La proteína G y la adenilato ciclase permanecen unidas a la membrana, mientras el cAMP puede moverse a través de la célula transportando la señal inicial, debida a la unión de la adrenalina. La Figura 14.5 proporciona una visión general de estos pasos.

En su estado inactivo, la proteína G está unida al nucleótido de guanina GDP y la proteína G es un heterotrimero formado por las subunidades α , β y γ ; la subunidad α (*llamada G_a*) se une al nucleótido (Figura 14.6). La subunidad α es un miembro de la familia de nucleotidasas con bucle P (que rompen NTPs, es decir, NTPases) (Sección 9.4), y es el bucle P el que participa en la unión del nucleótido. Las subunidades α y γ habitualmente están ancladas a la membrana con ácidos grasos unidos covalentemente. *La función del receptor unido a la hormona es catalizar el intercambio de GTP en vez del GDP unido.* El complejo hormona-receptor interacciona con la proteína G heterotrimérica y abre el lugar de unión del nucleótido para

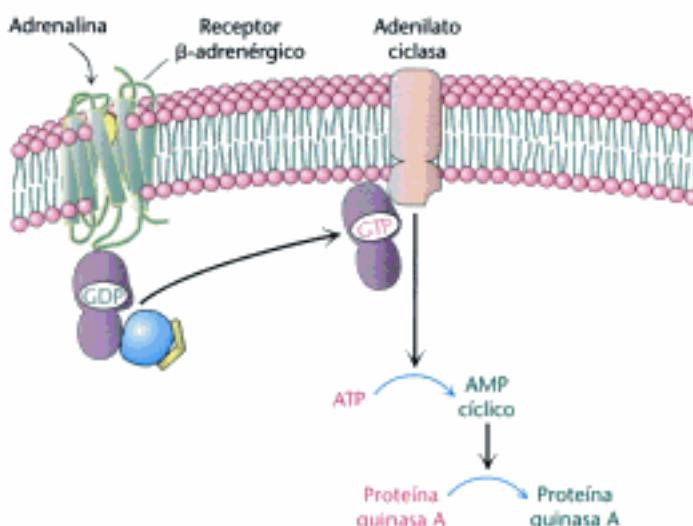


Figura 14.5 Activación de la proteína quinasa A mediante una vía de proteína G. La unión de una hormona a un receptor 7TM inicia una vía de transducción de señales que actúa a través de una proteína G y cAMP para activar a la proteína quinasa A.

que el GDP se libere y el GTP de la disolución se una. De forma simultánea la subunidad α se disocia del dímero $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$).

La disociación de las proteínas G heterotriméricas en las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$ transmite la información “el receptor ha unido su ligando”. *Un único complejo hormona–receptor puede estimular el intercambio de nucleótidos en muchos heterotriméricos de proteína G*. Por tanto, cientos de moléculas G_α se transforman de su forma GDP a su forma GTP por cada molécula de hormona que se une, causando una amplificación de la respuesta. Los receptores 7TM se denominan a menudo *receptores acoplados a proteína G* o GPCRs, ya que transmiten la señal a través de proteínas G.

Las proteínas G activadas transmiten las señales mediante su unión a otras proteínas

En la forma GTP, la superficie de la proteína G que se ha unido al dímero $\beta\gamma$ ha cambiado su conformación con respecto a la forma GDP, de manera que ya no tiene una afinidad alta por el dímero $\beta\gamma$. Sin embargo, esta superficie queda expuesta para la unión de otras proteínas. En la vía del β -AR, el nuevo compañero de unión es la *adenilato ciclase*, el enzima que transforma el ATP en cAMP. Este enzima es una proteína de membrana que contiene 12 hélices que cruzan la membrana; dos grandes dominios citoplasmáticos forman la parte catalítica del enzima. La interacción de G_α

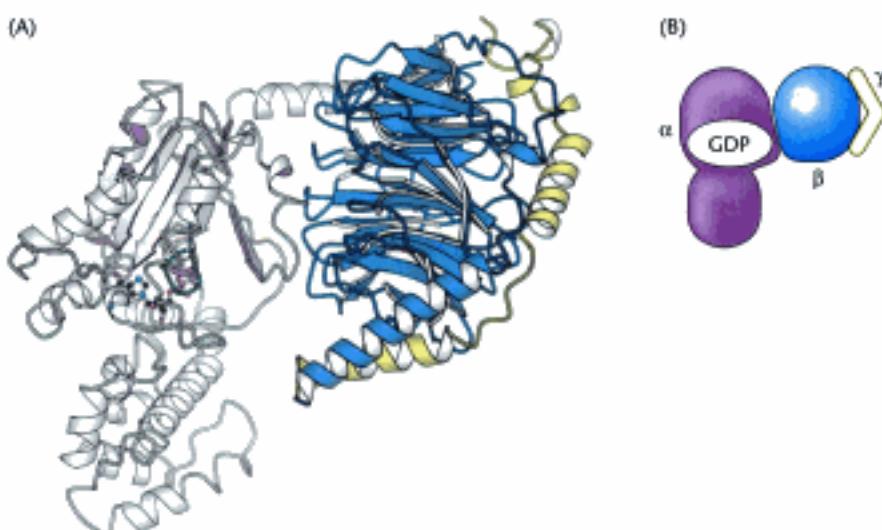


Figura 14.6 Proteína G heterotrimérica. (A) El diagrama de cintas muestra la relación entre las tres subunidades. En este complejo, la subunidad α (gris y morado) está unida al GTP. Nótese que el GDP está unido en un bolsillo próximo a la superficie de interacción de la subunidad α con el dímero $\beta\gamma$. (B) Representación esquemática de la proteína G heterotrimérica. [Dibujado a partir de 1GOT.pdb.]

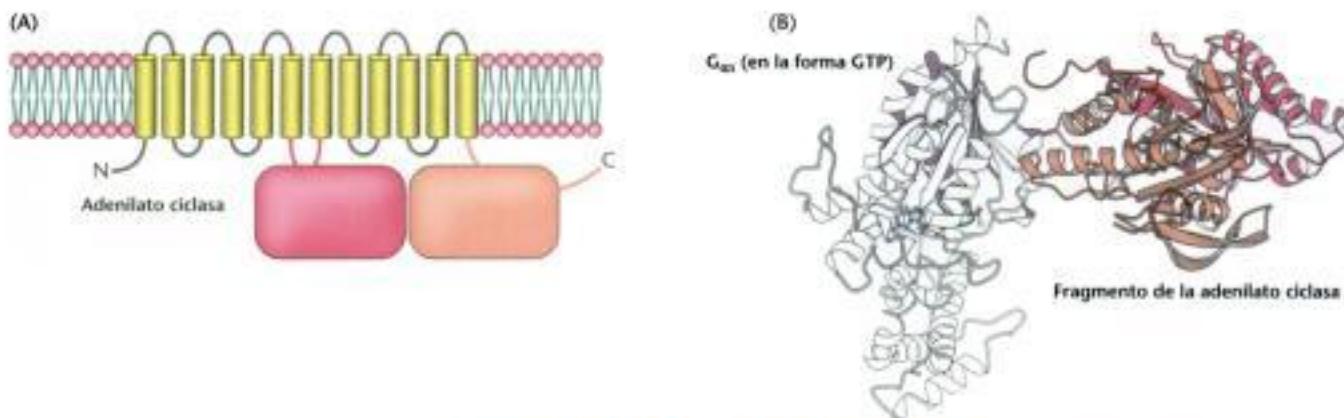


Figura 14.7 Activación de la adenilato ciclase. (A) La adenilato ciclase es una proteína intrínseca de membrana con dos grandes dominios citoplasmáticos que forman la estructura catalítica. (B) Estructura del complejo de la $G_{\alpha}\beta\gamma$ unida a GTP y la porción catalítica de la adenilato ciclase. Nótese que la superficie de G_{α} que ha estado unida al dímero $\beta\gamma$ se une ahora a la adenilato ciclase. [Tomado de 1A2S.pdb.]



Figura 14.8 La vía de transducción de señal por adrenalina. La unión de la adrenalina al receptor β -adrenérgico inicia la vía de transducción de la señal. El proceso en cada etapa aparece señalado (en negrita) a la izquierda de cada flecha. Las etapas que son responsables de la amplificación de la señal aparecen señaladas a la derecha en verde.

con la adenilato ciclase favorece una conformación del enzima, catalíticamente más activa, lo que estimula la producción de cAMP (Figura 14.7). Además, la subunidad de la proteína G que participa en la vía del β -AR se denomina G_{α_s} , donde la “s” significa estimulación (en inglés, *stimulation*). *El resultado final es que la unión de adrenalina al receptor en la superficie celular aumenta la velocidad de producción de cAMP en el interior de la célula.* La producción de cAMP por la adenilato ciclase proporciona un segundo nivel de amplificación porque cada adenilato ciclase activada puede producir muchas moléculas de cAMP a partir de ATP.

El AMP cíclico estimula la fosforilación de muchas moléculas diana mediante la activación de la proteína quinasa A

Vamos a seguir las etapas sucesivas del flujo de información de esta vía de transducción de señales. El aumento de la concentración de cAMP puede afectar a muchos procesos celulares. Por ejemplo, incrementa la degradación de las reservas energéticas, aumenta la secreción de ácidos en la mucosa gástrica, conduce a la dispersión de los gránulos de melanina, disminuye la agregación plaquetaria e induce la apertura de los conductos de cloro. ¿Cómo puede el cAMP influir en tantos procesos? ¿Existe un denominador común para estos efectos? Efectivamente existe. *La mayoría de los efectos del cAMP en las células eucariotas están producidos por una única proteína quinasa.* Este enzima clave se llama proteína quinasa A (PKA).

Como se ha descrito anteriormente (p. 287), la PKA está formada por dos cadenas reguladoras (R) y dos cadenas catalíticas (C). En ausencia de cAMP, el complejo R_2C_2 es catalíticamente inactivo. La unión de cAMP a las cadenas reguladoras libera las cadenas catalíticas, las cuales tienen actividad catalítica intrínseca. La PKA activada puede entonces fosforilar residuos específicos de serina y treonina de las proteínas diana y modificar su actividad. Por ejemplo, la PKA fosforila dos enzimas que son responsables de la ruptura del glucógeno, el polímero de reserva de la glucosa, y de la consiguiente inhibición de su síntesis (Sección 21.3). La PKA estimula la expresión de genes específicos mediante la fosforilación de un activador de transcripción denominado proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (*cAMP-response element binding protein*). Esta actividad de la PKA muestra como las vías de transducción de señales pueden alcanzar el núcleo y alterar la expresión génica.

La vía de transducción de señales iniciada por la adrenalina se resume en la Figura 14.8.

Las proteínas G se desactivan de forma espontánea mediante la hidrólisis del GTP

¿Cómo se inactiva la señal iniciada por la adrenalina? Las subunidades G_{α} tienen actividad GTPasa intrínseca, que hidroliza el GTP unido a GDP y P_i . Esta hidrólisis es, sin embargo, lenta, necesitando de segundos a minutos. Así se permite que la forma GTP de la subunidad G_{α} active a los siguientes componentes de la cascada de transducción antes de su desactivación por hidrólisis del GTP. Básicamente, el GTP unido actúa como un temporizador intrínseco que espontáneamente desactiva la subunidad G_{α} después de un corto espacio de tiempo. Tras la hidrólisis de GTP y la liberación de P_i , la forma de G_{α} unida a GDP se asocia nuevamente con el $G_{\beta\gamma}$ para generar la proteína heterotrimérica (Figura 14.9).

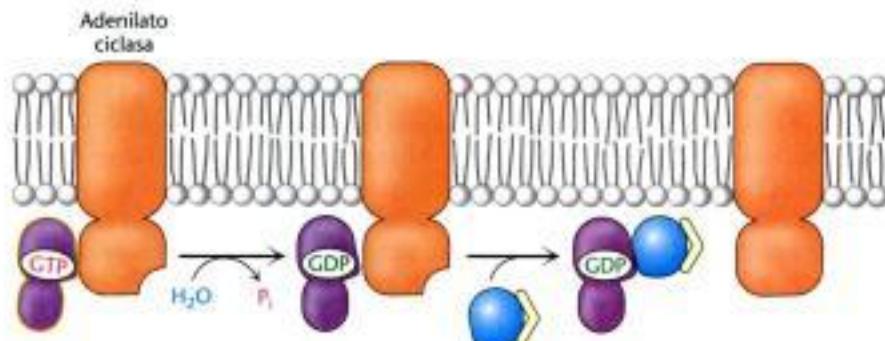


Figura 14.9 Desactivación de la G_{α} . Tras la hidrólisis del GTP unido por la actividad GTPasa intrínseca de la G_{α} , la G_{α} se reasocia con las subunidades $\beta\gamma$ para formar la proteína G heterotrimérica, dando por finalizada la activación de la adenilato ciclasa.

El complejo hormona–receptor activado también debe desactivarse para evitar la activación continua de las proteínas G. Esta desactivación tiene lugar mediante dos procesos (Figura 14.10). Primero, la hormona se disocia del receptor el cual regresa a su estado inicial desactivado. La probabilidad de que el receptor permanezca en su estado sin ligando depende de la concentración de la hormona. Segundo, el complejo hormona–receptor se desactiva mediante la fosforilación de residuos serina y treonina del extremo carboxilo terminal. En el ejemplo que estamos considerando, la quinasa del receptor β -adrenérgico (también llamada proteína G receptor quinasa 2, GRK2) fosforila la cola carboxilo terminal del complejo hormona–receptor pero no

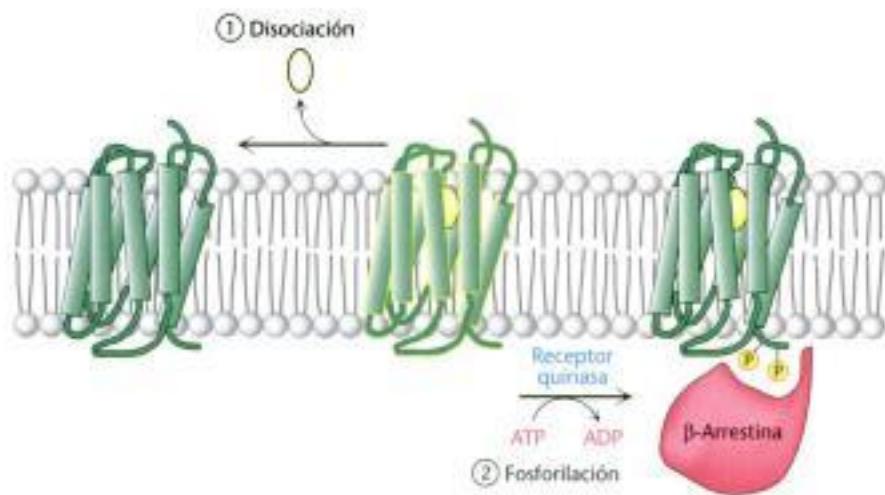


Figura 14.10 Terminación de la señal. La transducción de la señal por el receptor 7TM se detiene (1) por la disociación de la molécula señalizadora del receptor y (2) por la fosforilación del extremo C-terminal citoplasmático del receptor y por la subsiguiente unión con la β -arrestina.

la correspondiente al receptor no ligado. Por último la molécula β -arrestina se une al receptor fosforilado y disminuye su capacidad de activar a la proteína G.

Algunos receptores 7TM activan la cascada de los fosfoinosítidos

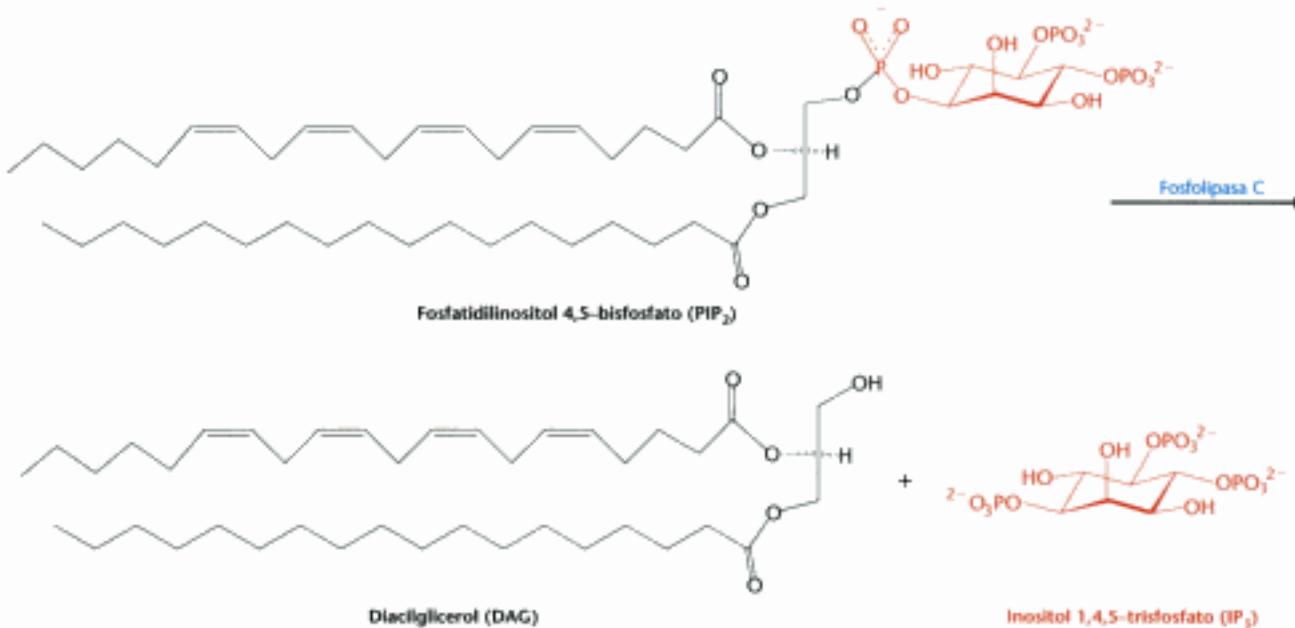
Vamos ahora a estudiar otra cascada de segundos mensajeros, que también emplean un receptor 7TM, que muchas hormonas utilizan para provocar respuestas muy variadas. La *cascada de los fosfoinosítidos*, como la cascada del cAMP, convierte las señales extracelulares en intracelulares. Los mensajeros intracelulares formados por la activación de esta vía se producen por la hidrólisis de *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato* (PIP_2), un fosfolípido presente en las membranas celulares. Un ejemplo de una vía de señalización basada en la cascada de los fosfoinosítidos es la activada por el receptor de angiotensina II, el cual se une a una hormona peptídica que participa en el control de la presión sanguínea.

Cada tipo de receptor 7TM funciona a través de una proteína G distinta. Mientras el receptor β -adrenérgico activa la proteína G, $G_{\alpha\beta}$, el receptor de angiotensina II activa una proteína G llamada G_{\alphaq} . En su forma GTP, G_{\alphaq} se une y activa la isoforma β del enzima *fosfolipasa C*. Este enzima cataliza la hidrólisis del PIP_2 para formar el segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG; Figura 14.11).

IP_3 es soluble y difunde desde la membrana. Este segundo mensajero origina la rápida liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares en el retículo endoplásmico, el cual acumula una reserva de calcio mediante la acción de transportadores tales como la Ca^{2+} ATPasa (p. 354). Cuando el IP_3 se une a conductos de calcio proteicos específicos de la membrana del retículo endoplásmico, estos receptores IP_3 se abren para permitir el flujo de iones calcio del retículo endoplásmico al citoplasma. El ion calcio, una molécula señalizadora en sí misma, puede unirse a proteínas, incluyendo una proteína señalizadora omnipresente llamada calmodulina y enzimas tales como la proteína quinasa C. De esta manera, niveles altos de Ca^{2+} activan procesos tales como la contracción del músculo liso, la hidrólisis de glucógeno y la liberación vesicular.

El diacilglicerol (DAG) permanece en la membrana plasmática. Allí, activa la *proteína quinasa C*, una proteína quinasa que fosforila residuos de serina y treonina en muchas proteínas diana. El especializado dominio de unión a DAG de esta quinasa

Figura 14.11 Reacción de la fosfolipasa C. La fosfolipasa C hidroliza el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en dos mensajeros secundarios: el diacilglicerol, que permanece en la membrana, y el inositol 1,4,5-trifosfato, que difunde desde la membrana al citoplasma.



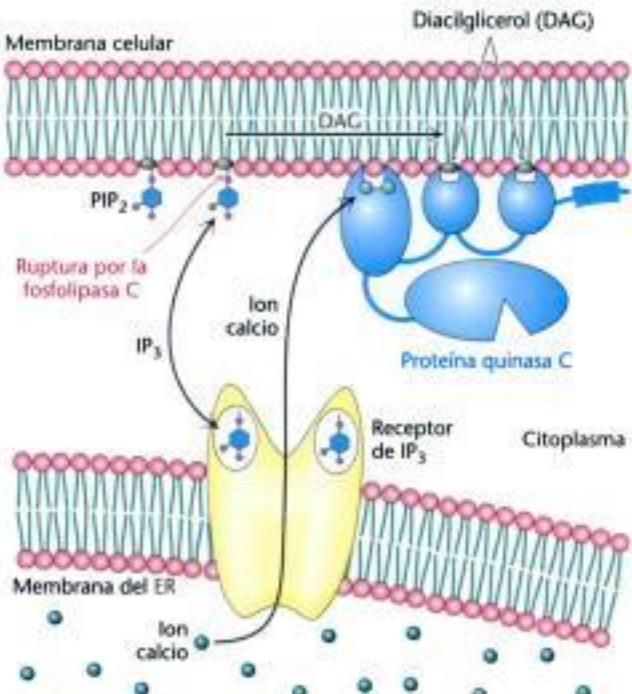


Figura 14.12 Cascada de los fosfoinositidos. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) induce la liberación de iones calcio (debido a la apertura del conducto de iones del receptor IP₃) y la activación de la proteína quinasa C (debido a la unión de la proteína quinasa C al DAG libre de la membrana). Los iones calcio se unen a la proteína quinasa C y facilitan su activación.

necesita calcio unido para unirse al DAG. Nótese que el diacilglicerol y el IP₃ trabajan conjuntamente: IP₃ aumenta la concentración, y el Ca^{2+} facilita la activación de la proteína quinasa C. La cascada de fosfoinositidos se resume en la Figura 14.12. Ambos IP₃ y el DAG actúan fugazmente porque se convierten en otras especies por fosforilación u otros procesos.

El ion calcio es un segundo mensajero universal

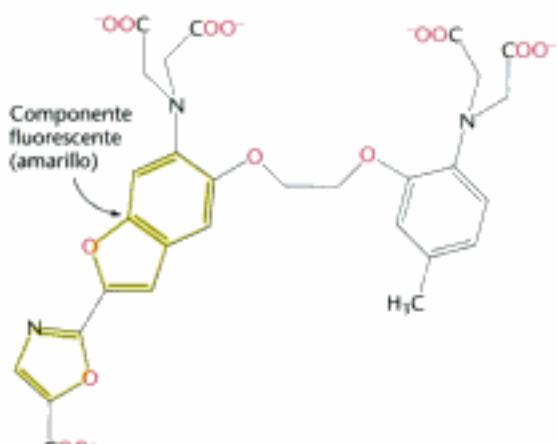
El ion calcio participa en muchos procesos de señalización junto con la cascada de los fosfoinositidos. Varias propiedades de este ion explican su muy difundido uso como mensajero intracelular. Primera, variaciones mínimas en la concentración de Ca^{2+} se detectan fácilmente. En el estado estacionario, los niveles intracelulares de Ca^{2+} tienen que mantenerse bajos para evitar la precipitación de compuestos carbonatados y fosforilados, los cuales forman sales de Ca^{2+} poco solubles. Los niveles de Ca^{2+} se mantienen bajos por los sistemas de transporte que expulsan el Ca^{2+} de la célula. Debido a esto, el nivel citoplasmático de Ca^{2+} es aproximadamente 100 nM, varios órdenes de magnitud más bajo que la concentración del medio extracelular. Dado el bajo nivel del estado estacionario, los aumentos transitorios en el contenido de Ca^{2+} producidos por eventos de señalización se pueden medir fácilmente.

Una segunda propiedad del Ca^{2+} que le convierte en un mensajero intracelular muy adecuado es que se puede unir con gran afinidad a proteínas e inducir cambios conformacionales (Figura 14.13). Los iones calcio se unen bien a átomos de oxígeno cargados negativamente (de las cadenas laterales de glutamato y aspartato) y a átomos de oxígeno sin carga (grupos carbonilo de la cadena principal y átomos de oxígeno de las cadenas laterales de glutamina y asparragina). *La capacidad del Ca^{2+} para coordinarse con múltiples ligandos –de seis a ocho átomos de oxígeno– le permite entrecruzar diferentes segmentos de una proteína e inducir importantes cambios conformativos.*

Nuestro conocimiento del papel del Ca^{2+} en los procesos celulares se ha incrementado notablemente al ser capaces de detectar cambios en la concentración de Ca^{2+} en el interior de las células y registrarlos mientras se producen. Esta capacidad depende del uso de colorantes especialmente diseñados tales como el Fura-2 que se une al Ca^{2+} y cambia sus propiedades fluorescentes al unirse a él.



Figura 14.13 Lugar de unión del calcio. En una forma habitual de unión, el calcio se coordina con 6 átomos de oxígeno de la proteína y un átomo de oxígeno del agua (arriba).

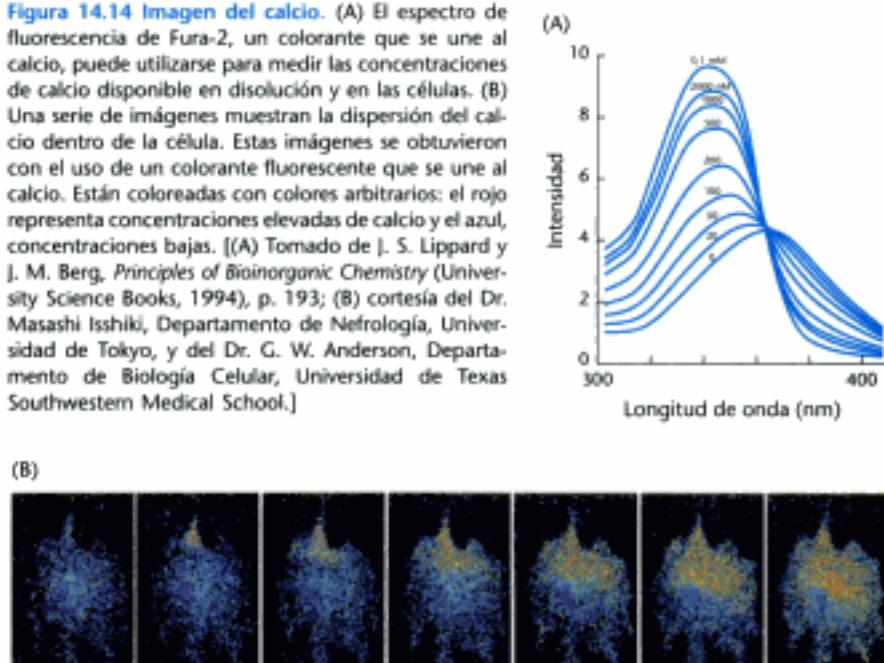


El Fura-2 se une al Ca^{2+} a través de átomos de oxígeno (en rojo en la figura) colocados de forma adecuada en su estructura. Cuando tal colorante se introduce en las células, los cambios en la concentración de Ca^{2+} disponible pueden registrarse con microscopios que detectan cambios de fluorescencia (Figura 14.14). También se han desarrollado sondas para medir otros segundos mensajeros tales como el cAMP. Estos *agentes para visualizar moléculas* están aumentando en gran medida nuestro conocimiento de los procesos de señalización celular.

Los iones calcio activan la proteína reguladora calmodulina

La *calmodulina* (CaM), una proteína de 17 kd con cuatro lugares de unión de Ca^{2+} , funciona como un sensor de Ca^{2+} en casi todas las células eucariotas. La *calmodulina se activa por la unión de Ca^{2+}* , que tiene lugar cuando la concentración de Ca^{2+} citoplasmático se eleva por encima de 500 nM. La calmodulina es un miembro de la familia de proteínas mano EF. La mano EF es un motivo de unión de Ca^{2+} que está formado por una hélice, un bucle y una segunda hélice. Este motivo es-

Figura 14.14 Imagen del calcio. (A) El espectro de fluorescencia de Fura-2, un colorante que se une al calcio, puede utilizarse para medir las concentraciones de calcio disponible en disolución y en las células. (B) Una serie de imágenes muestran la dispersión del calcio dentro de la célula. Estas imágenes se obtuvieron con el uso de un colorante fluorescente que se une al calcio. Están coloreadas con colores arbitrarios: el rojo representa concentraciones elevadas de calcio y el azul, concentraciones bajas. [(A) Tomado de J. S. Lippard y J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry* (University Science Books, 1994), p. 193; (B) cortesía del Dr. Masashi Ishii, Departamento de Nefrología, Universidad de Tokio, y del Dr. G. W. Anderson, Departamento de Biología Celular, Universidad de Texas Southwestern Medical School.]



tructural, descubierto por primera vez en la proteína parvalbumina, se denominó mano EF ya que las hélices E y F de la parvalbumina en su forma unida al calcio se colocan de un modo similar a los dedos índice y pulgar de la mano derecha (Figura 14.15). Las dos hélices y el bucle intermedio forman el motivo de unión del Ca^{2+} . Con cada ion Ca^{2+} , se coordinan siete átomos de oxígeno, seis son de la proteína y el séptimo pertenece a una molécula de agua unida.

La unión de Ca^{2+} a la calmodulina induce importantes cambios conformacionales en las manos EF. Estos cambios conformacionales exponen superficies hidrofóbicas que le permiten poder unirse a otras proteínas. Utilizando sus dos dominios de manos EF, la calmodulina rodea regiones específicas de la proteína diana, normalmente hélices α expuestas con grupos hidrofóbicos y grupos cargados colocados convenientemente (Figura 14.16). El complejo Ca^{2+} -calmodulina es capaz de activar, mediante la inducción de cambios conformacionales, una amplia variedad de enzimas, bombas y otras proteínas diana. Un grupo importante de proteínas diana son varias *proteína quinasas dependientes de calmodulina* (CaM quinasas) que fosforilan proteínas muy diferentes. Estos enzimas regulan el metabolismo energético, la permeabilidad iónica, la síntesis de neurotransmisores y la liberación de neurotransmisores. Este es un esquema recurrente en las vías de transducción de señales: la concentración de un segundo mensajero aumenta (en este caso el Ca^{2+}); esta señal llega a una proteína que se une al segundo mensajero (en este caso la calmodulina); y la proteína que une el segundo mensajero genera cambios en los enzimas (en este caso quinasas dependientes de calmodulina) que controlan a los efectores.

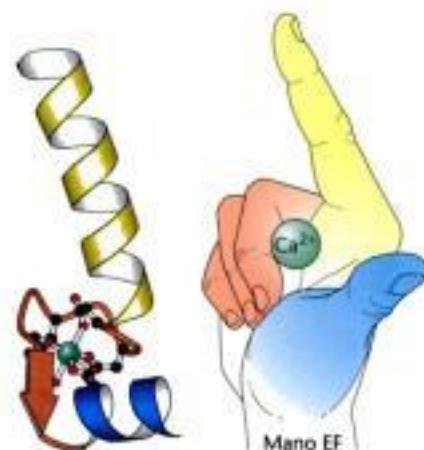


Figura 14.15 Mano EF. Una mano EF formada por una unidad hélice-bucle-hélice, en muchas proteínas detectoras de calcio, es el centro de unión con el calcio. En la figura la hélice E está en amarillo, la hélice F en azul y el calcio se representa por una esfera verde. Nótese que el ion calcio se une a un bucle que conecta dos hélices casi perpendiculares. [Tomado de 1ClI.pdb.]

14.2 Señalización por insulina: las cascadas de fosforilación son primordiales en muchos procesos de transducción de señales

Las vías de señalización que hemos estudiado hasta ahora tenían una etapa de activación de una proteína quinasa como un componente de la vía. Vamos a ver ahora una clase de vías de transducción de señales que *se inician por receptores que incluyen proteína quinasas como un componente de sus estructuras*. La activación de estas proteína quinasas moviliza procesos que terminan modificando a los efectores de estas vías.

Un ejemplo es la vía de transducción de señales iniciada por la *insulina*, la hormona liberada después de una comida copiosa. Considerando todos sus detalles, esta vía muy ramificada es bastante compleja; por tanto nos vamos a centrar en la vía prin-

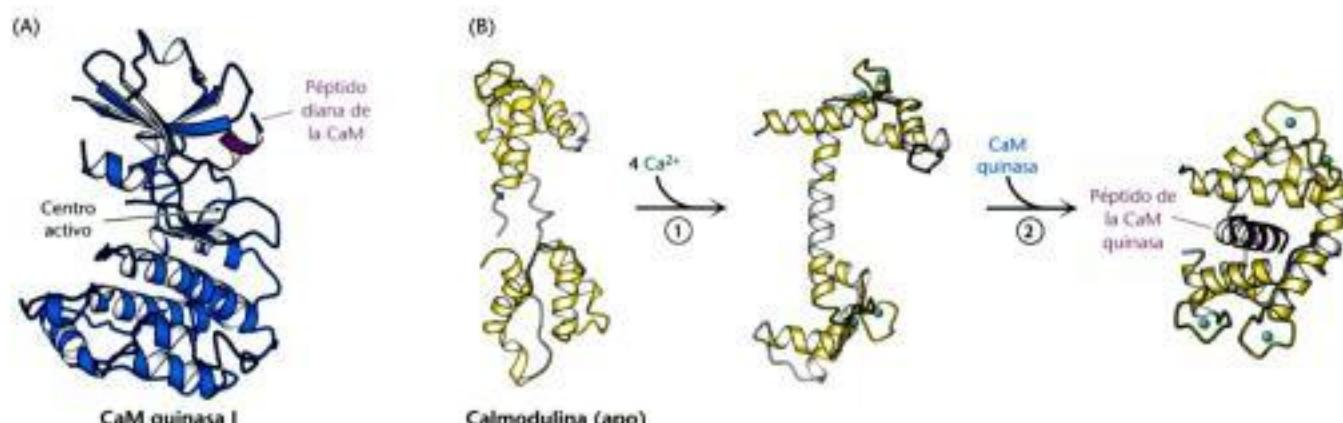


Figura 14.16 La calmodulina se une a α hélices. (A) Una α hélice (en púrpura) de la CaM quinasa I es la diana para la calmodulina. (B) Tras la unión con el calcio (1), las dos mitades de la calmodulina se cierran alrededor de la hélice diana (2), uniéndose con ella mediante interacciones hidrofóbicas e iónicas. En la CaM quinasa I esta interacción permite que el enzima adopte la conformación activa. [Tomado de 1A06, 1CLL, y 1CM1.pdb.]

cipal. Esta vía conduce a la movilización de transportadores de glucosa a la superficie celular. Como ya hemos mencionado, estos transportadores le permiten a la célula capturar la glucosa, muy abundante en el torrente sanguíneo después de la comida.

El receptor de insulina es un dímero que se cierra en torno a una molécula de insulina unida

La insulina es una hormona peptídica que consta de dos cadenas, unidas por tres enlaces disulfuro (p. 36 y Figura 14.17). Su receptor tiene una estructura bastante diferente a la del receptor de adrenalina β -AR (Figura 14.18). El *receptor de insulina* es un dímero de dos unidades idénticas. Cada unidad consta de una cadena α y una cadena β unidas entre sí por un enlace disulfuro. Cada subunidad α se coloca completamente en el exterior de la célula, mientras que cada subunidad β está colocada principalmente en el interior, atravesando la membrana con un único segmento transmembrana. Las dos subunidades α se juntan para formar un centro de unión para una única molécula de insulina, algo sorprendente porque dos superficies distintas en la molécula de insulina deben interaccionar con las dos cadenas idénticas del receptor de insulina. La aproximación de las unidades diméricas en presencia de una molécula de insulina activa la vía de señalización. *El agrupamiento de un receptor oligomérico o la oligomerización de un receptor monomérico en torno a un ligando unido es una estrategia utilizada por muchos receptores para iniciar una señal, sobre todo en los receptores que contienen una proteína quinasa.*

Cada subunidad β está formada fundamentalmente de un dominio proteína quinasa homólogo a la proteína quinasa A. Esta quinasa se diferencia de una proteína quinasa A por dos hechos importantes. Primero, la quinasa del receptor de insulina es una *tirosinaquinasa*; es decir que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del ATP al grupo hidroxilo de la tirosina, en vez de hacerlo a la serina o la treonina, como ocurre con la proteína quinasa A.

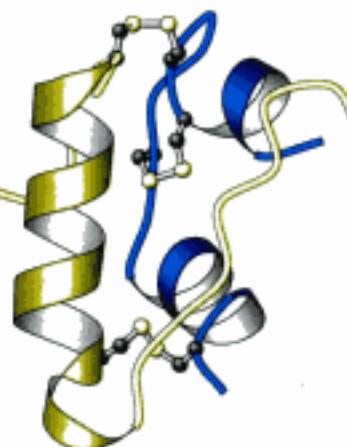


Figura 14.17 Estructura de la Insulina. Nótese que la insulina consiste en dos cadenas (en azul y amarillo) unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. La cadena α (en azul) también tiene un enlace disulfuro intercatenario. [Tomado de 1B2F.pdb.]

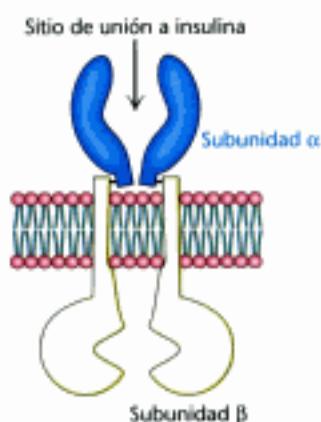
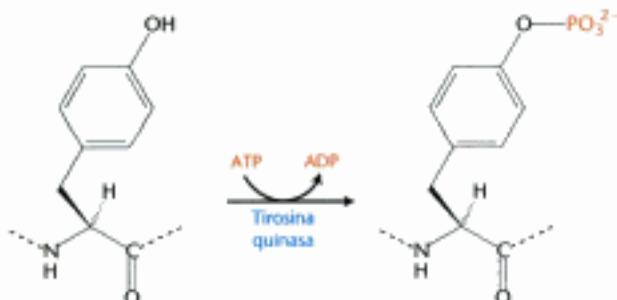


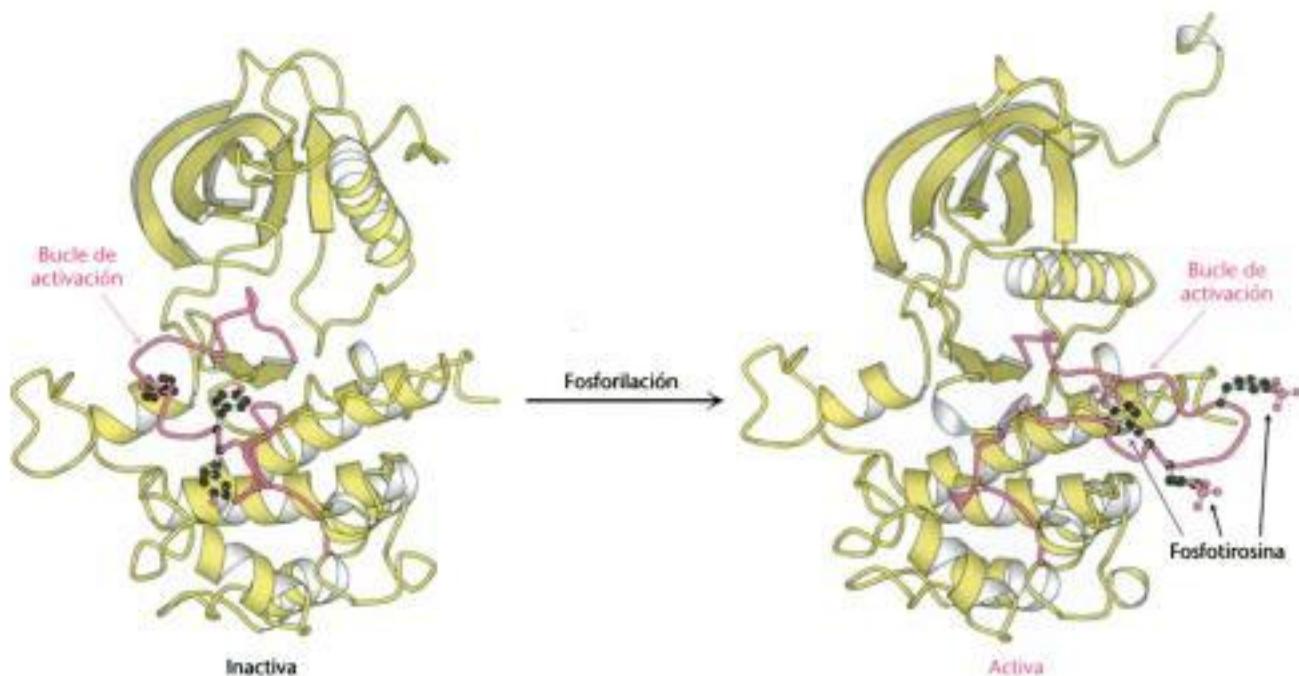
Figura 14.18 El receptor de Insulina. El receptor está formado por dos unidades, cada una de las cuales consta de una subunidad α y una β unidas por un puente disulfuro. La subunidad α está en el exterior de la célula y las dos subunidades β se unen para formar un sitio de unión a insulina. Cada subunidad β está en el interior de la célula y posee un dominio proteína quinasa.



Dado que esta tirosina quinasa es un componente del mismo receptor, al receptor de insulina se le denomina *receptor tirosina quinasa*. Segundo, la quinasa del receptor de insulina está en una conformación inactiva cuando el dominio no ha sido modificado covalentemente. La quinasa se inactiva por la colocación de un bucle sin estructura (llamado *bucle de activación*) que se sitúa en el centro de la estructura.

La unión de la insulina provoca la fosforilación cruzada y la activación del receptor de insulina

Cuando las dos subunidades α se agrupan para rodear una molécula de insulina, los dos dominios proteína quinasa en el interior de la célula también se juntan. Hay que destacar que, a medida que se aproximan, el flexible bucle de activación de una subunidad quinasa es capaz de encajar en el sitio activo de la otra subunidad quinasa en el dímero. Cuando las dos subunidades β se juntan, los dominios quinasa catalizan la adición de grupos fosforilo del ATP a los residuos de tirosina del bucle de activación. La fosforilación de los residuos de tirosina induce un cambio conformativo espectacular (Figura 14.19). La conformación del bucle de activación cambia drásticamente y la qui-



nasa adopta una conformación activa. Por tanto, la unión de la insulina en el exterior de la célula origina la activación de una quinasa asociada a la membrana en el interior celular.

La quinasa del receptor de insulina activada inicia una cascada de quinasas

La tirosina quinasa del receptor de insulina se activa por fosforilación. Dado que las dos subunidades del receptor se mantienen próximas una a la otra, también se fosforilan otros lugares del receptor. Estos lugares fosforilados actúan como puntos de anclaje para otros sustratos incluyendo una clase de moléculas denominadas *sustratos del receptor de insulina (IRS, "insulin-receptor substrates")*. Desde las proteínas IRS, la señal se transporta a través de una serie de moléculas ancladas a la membrana, a una proteína quinasa que finalmente deja la membrana (Figura 14.20).

Figura 14.19 Activación del receptor de insulina por fosforilación. En este modelo del dominio proteína quinasa de la subunidad β del receptor de insulina, el bucle de activación aparece en rojo. La forma no fosforilada de la izquierda no tiene actividad catalítica. Nótese que, cuando tres residuos de tirosina en el bucle de activación se fosforilan, el bucle de activación pivota a través de la estructura de la quinasa y ésta adopta una conformación más compacta. Esta conformación tiene actividad catalítica. [Tomado de 1IRK.pdb y 1IR3.pdb.]

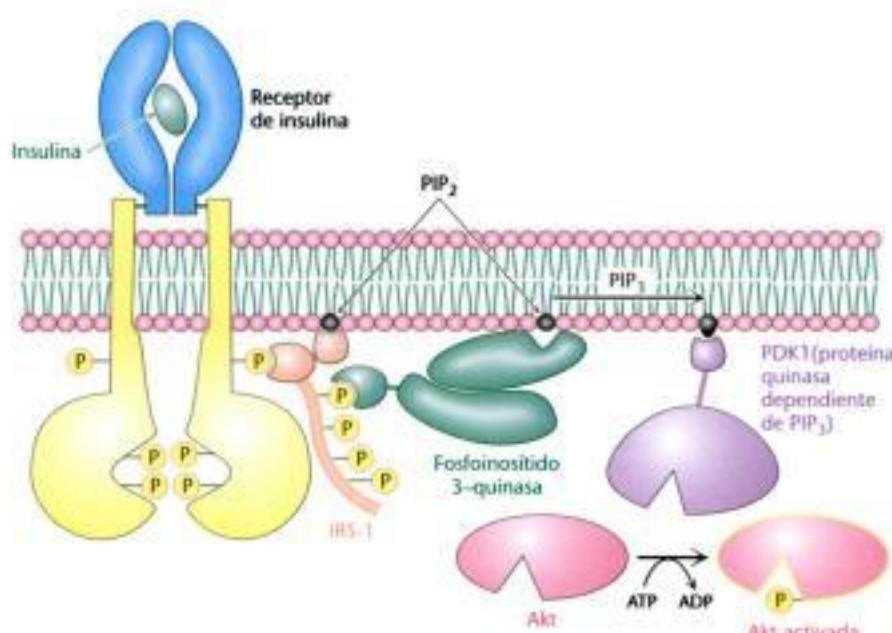


Figura 14.20 Señalización por Insulina. La unión de insulina produce la fosforilación cruzada y la activación del receptor de insulina. Los lugares de fosforilación en el receptor actúan como sitios de unión para sustratos del receptor de la insulina tales como IRS-1. La quinasa del lípido, fosfoinositido 3-quinasa se une a un lugar fosforilado en el IRS-1 a través de su dominio de regulación, que convierte el PIP₂ en PIP₃. La unión al PIP₃ activa la proteína quinasa dependiente de PIP₃, la cual fosforila y activa quinasas tales como Akt1. La Akt1 activada puede difundir a través de la célula para continuar con la vía de transducción de señales.

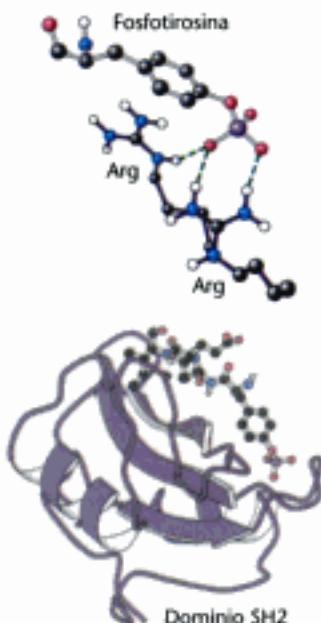
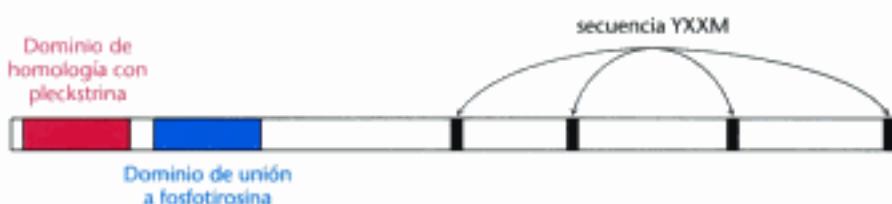


Figura 14.22 Estructura del dominio SH2. Se muestra el dominio unido a un péptido que contiene una fosftotirosina. Nótese en la parte superior cómo el residuo de fosftotirosina cargado negativamente interacciona con dos residuos de Arg que aparecen conservados, prácticamente, en todos los dominios SH2. [Tomado de 1SP5.pdb.]

Figura 14.21 Estructura modular de los sustratos del receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2. Este esquema representa la secuencia de aminoácidos común a IRS-1 e IRS-2. Cada proteína contiene un dominio de homología con pleckstrina (que une fosfoinosítidos) un dominio de unión de fosftotirosina, y cuatro secuencias próximas a Tyr-X-X-Met (YXXM). La última se fosforila por la acción de la tiroquina quinasa del receptor de insulina.

IRS-1 y IRS-2 son dos proteínas homólogas con una estructura modular (Figura 14.21). La parte amino terminal incluye un *dominio de homología con pleckstrina*, que une fosfoinosítidos, y un *dominio de unión de fosftotirosina*. Estos dominios actúan en conjunto para anclar las proteínas IRS al receptor de insulina y a la membrana asociada.

Cuatro secuencias que se aproximan a la forma Tyr-X-X-Met se encuentran en cada proteína IRS. Estas secuencias son los blancos preferidos de la tiroquina quinasa del receptor. La quinasa del receptor de insulina activada fosforila estos residuos de tiroamina. En su forma fosforilada, las moléculas de IRS actúan como *proteínas adaptadoras*: no activan el siguiente componente de la vía, una quinasa de lípidos; sino que se unen a la quinasa lipídica y la atraen a la membrana donde puede actuar sobre su sustrato, un lípido de la membrana.

Los residuos de fosftotirosina en las proteínas IRS son reconocidos por otras proteínas que contienen una clase de dominio denominado *dominio de homología 2 a Src (SH2)* (Figura 14.22). Estos dominios, presentes en muchas proteínas de transducción de señales, se unen a fragmentos de polipéptidos que contienen residuos de fosftotirosina. Cada dominio SH2 específico, posee una unión preferente a fosftotirosinas en el contexto de una secuencia determinada. ¿Qué proteínas que contienen dominios SH2 se unirán a secuencias en las proteínas IRS? Las más importantes están en una clase de quinasas lipídicas que añaden un grupo fosforilo a la posición 3 del inositol en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Figura 14.23). Estos enzimas son heterooligómeros que consisten de una subunidad catalítica de 110 kd y una subunidad reguladora de 85 kd. A través de dominios SH2 en la subunidad reguladora, estos enzimas se unen a las proteínas IRS y se dirigen hacia la membrana donde pueden fosforilar a PIP₂ para formar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). Este producto lipídico, a su vez, activa una proteína quinasa, PDK1, mediante un dominio homólogo a pleckstrina y específico para PIP₃ presente en esta quinasa. Esta proteína quinasa activada fosforila y activa Akt, otra proteína quinasa. Akt no está anclada en la membrana y se mueve a través de la célula para fosforilar dianas que incluyen componentes que controlan el tráfico del receptor de glucosa GLUT4



Figura 14.23 Acción de la quinasa de lípidos en la señalización por insulina. Los IRS-1 e IRS-2 fosforilados activan el enzima fosfatidilinositol 3-quinasa, un enzima que convierte PIP₂ en PIP₃.

a la superficie celular, así como enzimas que estimulan la síntesis de glucógeno (Sección 21.4).

La cascada iniciada por la unión de insulina al receptor de insulina se resume en la Figura 14.24. La señal se amplifica en varias etapas a lo largo de esta vía. Puesto que el receptor de insulina activado es a su vez una proteína quinasa, cada receptor activado puede fosforilar muchas moléculas de IRS. Los enzimas activados posteriormente amplifican la señal en, al menos, dos de los pasos siguientes. Por tanto, un pequeño aumento en la concentración de insulina circulante puede producir una potente respuesta intracelular. Tengamos en cuenta que, a pesar de lo complicado de esta vía, es bastante menos elaborada que el complejo entramado de vías iniciadas por la insulina.

La señal de la insulina termina por la acción de las fosfatasas

Hemos visto que las proteínas G activadas catalizan su propia inactivación mediante la liberación de grupos fosforilo del GTP. Por el contrario, las proteínas fosforiladas en serina, treonina o residuos de tirosina no se hidrolizan espontáneamente; son cinéticamente muy estables. Se necesitan enzimas específicos para hidrolizar estas proteínas fosforiladas y devolverlas al estado en el que estaban antes del inicio de la señalización. Igualmente, se necesitan fosfatases de lípidos para retirar los grupos fosforilo de los lípidos de inositol fosforilados como parte de una cascada de señalización. En la señalización por insulina, hay tres tipos de enzimas particularmente importantes: las fosfatases de tirosinas proteicas que eliminan grupos fosforilo de residuos de tirosina en el receptor de insulina, las fosfatases lipídicas que hidrolizan fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato a fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato, y las fosfatases de serinas proteicas que eliminan grupos fosforilo de proteína quinasa tales como Akt. Muchas de estas fosfatases se activan o reclutan como parte de la respuesta a la insulina. Por tanto, la unión de la primera señal determinará la terminación de la respuesta.

14.3 Señalización por EGF: los sistemas de transducción de señales están preparados para responder

Nuestras consideraciones sobre las cascadas de transducción de las señales iniciadas por adrenalina e insulina incluyen ejemplos de cómo componentes de las vías de transducción de señales están listos para la acción, preparados para activarse mediante pequeñas modificaciones. Por ejemplo, las subunidades α de las proteínas G sólo necesitan de la unión de GTP, intercambiado por GDP, para transmitir una señal. Esta reacción de intercambio es favorable desde el punto de vista termodinámico, pero es muy lenta en ausencia de un adecuado receptor 7TM activado. De igual manera, los dominios tirosina quinasa del receptor dimérico de insulina, están listos para la fosforilación y la activación, pero necesitan la presencia de una insulina unida por dos subunidades α para dirigir el bucle de activación de una tirosina quinasa al centro activo de otra tirosina quinasa compañera y así iniciar el proceso.

Examinaremos a continuación una vía de transducción de señales que muestra otro claro ejemplo de cómo muchas de estas vías están listas para responder. Esta vía se activa por una molécula señalizadora, el *factor de crecimiento epidérmico* (EGF). Al igual que para el receptor de insulina, el iniciador de esta vía es un receptor tirosina quinasa. Ambos dominios de este receptor, el extracelular y el intracelular están preparados para actuar, controlados sólo por una estructura específica que impide que los receptores se agrupen. Además nos encontraremos con varios componentes de señalización adicionales que participan en muchas otras vías.

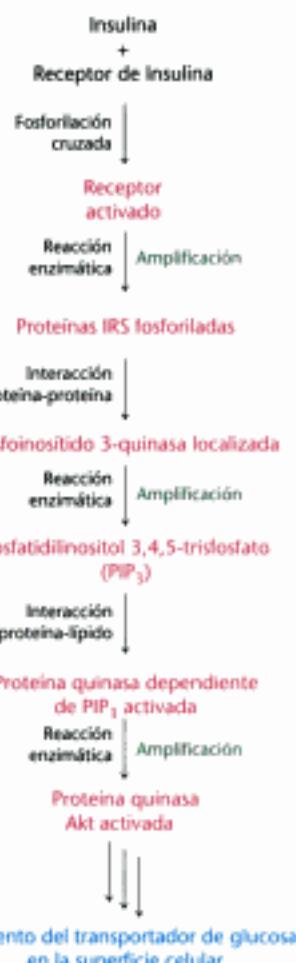
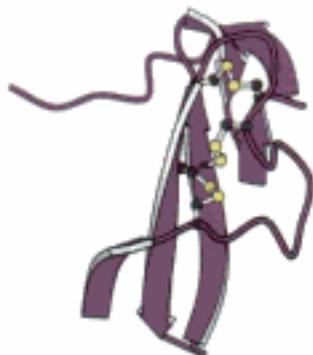


Figura 14.24 Vía de señalización por insulina. Etapas clave en la vía de transducción de la señal iniciada por la unión de la insulina a su receptor.



Factor de crecimiento epidérmico (EGF)



Figura 14.25 Estructura del factor de crecimiento epidérmico. Nótese que tres enlaces disulfuro intracatenarios estabilizan la compacta estructura tridimensional del factor de crecimiento. [Tomado de 1EFG.pdb.]

La unión del EGF induce la dimerización del receptor de EGF

El factor de crecimiento epidérmico es un polipéptido de 6 kd que estimula el crecimiento de células epidérmicas y epiteliales (Figura 14.25). El receptor de EGF, igual que el receptor de insulina, es una proteína quinasa de tirosinas que participa en reacciones de fosforilación cruzada (Figura 14.26). También, como el receptor de insulina, esta proteína es un dímero con dos unidades idénticas. Al contrario que en el receptor de insulina, estas unidades son monómeros hasta que el EGF se une a ellas. Cada monómero del receptor se une a una molécula de EGF en su dominio extracelular (Figura 14.27). Por tanto, este dímero une dos moléculas de ligando, mientras que el dímero del receptor de insulina une sólo una. Además, cada molécula de EGF se coloca lejos de la superficie de contacto del dímero. Ésta última incluye el llamado *brazo de dimerización* de cada monómero, una estructura que sobresale y se inserta en un bolsillo de unión en el otro monómero.

Si bien esta estructura revela con precisión la interacción que sustenta la formación de un dímero de receptor que favorece la fosforilación cruzada, plantea otra pregunta: ¿por qué el receptor no dimeriza ni transmite la señal en ausencia de EGF?

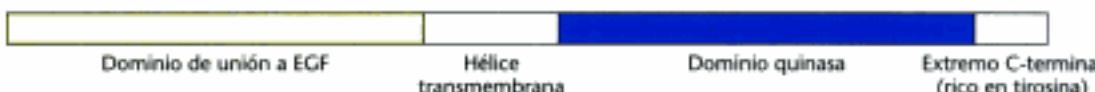


Figura 14.26 Estructura modular del receptor EGF. Esta visión esquemática de la secuencia de aminoácidos del receptor de EGF muestra el dominio de unión del EGF que está en el exterior de la célula, una única región que forma una hélice transmembrana, el dominio intracelular tirosina quinasa, y el dominio rico en tirosinas en el extremo carboxilo terminal.

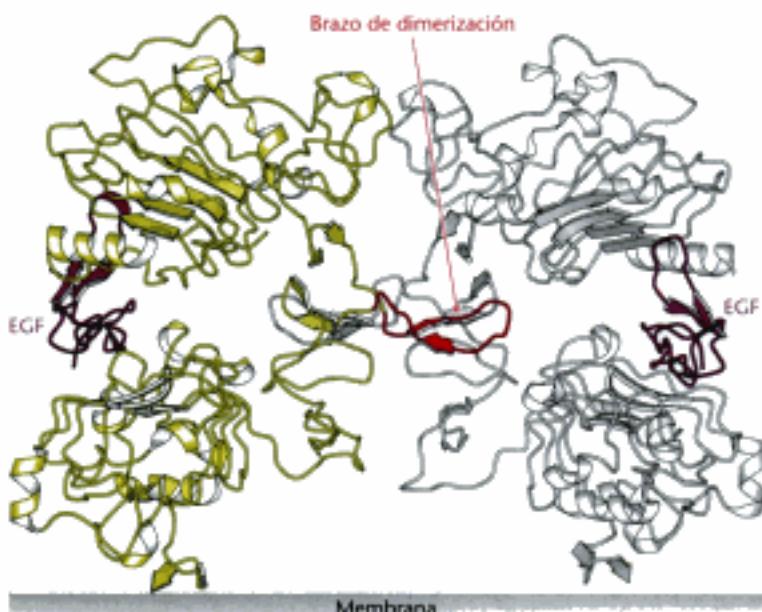


Figura 14.27 Dimerización del receptor del EGF. La estructura de la región extracelular del receptor de EGF se muestra unida a EGF. Nótese que la estructura es dímerica con una molécula de EGF unida a cada molécula de receptor y que la dimerización está mediada por un brazo de dimerización que sale de cada molécula de receptor.

Esta pregunta se ha resuelto examinando la estructura del receptor EGF en ausencia de ligando unido (Figura 14.28). Esta estructura es, ciertamente, monomérica y cada monómero adopta una conformación que es muy distinta de la observada en el dímero con ligando unido. En concreto, el brazo de dimerización se une a un dominio *del mismo monómero* que mantiene al receptor en una configuración cíclica. Resumiendo, el receptor adopta una conformación de resorte, mantenido en posición mediante el contacto entre el bucle de interacción y otra parte de la estructura, preparado para unirse al ligando y cambiar a una conformación activa, listo para la dimerización y la transmisión de la señal.

Esta observación sugiere que un receptor que existiera en una conformación extendida, incluso en ausencia de un ligando unido, sería constitutivamente activo. Sorprendentemente, tal receptor existe. Este receptor, Her2, tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en aproximadamente un 50% con la del receptor de EGF y tiene la misma estructura de dominios. Her2 no se une a ningún ligando conocido, pero estudios de cristalografía han demostrado que adopta una estructura extendida muy parecida a la observada para el receptor de EGF unido a este factor. En condiciones normales, Her2 forma heterodímeros con el receptor de EGF y otros miembros de la familia del receptor de EGF y participa en reacciones de fosforilación cruzada con estos receptores. Her2 se sobreexpresa en algunos cánceres, lo que contribuye al crecimiento del tumor, supuestamente por la formación de homodímeros que transducen señales, incluso en ausencia de ligando. Volveremos a hablar de Her2 cuando hablamos de aproximaciones al tratamiento del cáncer basados en el conocimiento de las vías de transducción de señales (Sección 14.5).

El extremo carboxilo terminal del receptor de EGF se fosforila

Al igual que el receptor de insulina, el receptor de EGF sufre en el dímero la fosforilación cruzada de una subunidad por la otra. Sin embargo, a diferencia del receptor de insulina, el lugar de esta fosforilación no es el bucle de activación de la quinasa, sino una región del extremo carboxilo terminal del dominio quinasa. En esta región se fosforilan hasta cinco residuos de tirosina. La dimerización del receptor de EGF desplaza la región C-terminal de un receptor hacia el centro activo de su quinasa compañera. La quinasa en sí está en una conformación activa sin fosforilar, demostrando una vez más como este sistema de señalización está preparado para responder.

La señalización mediante EGF conduce a la activación de Ras, una proteína G pequeña

¿Qué ocurre después de que el extremo carboxilo del receptor se fosforila? Las fosfotirosinas de los receptores actúan como lugares de anclaje para el dominio SH2 de otras proteínas. La cadena se inicia con la unión de una proteína adaptadora clave, llamada Grb-2 (Figura 14.29). Al fosforilarse el receptor, el dominio SH2 de Grb-2 se une a los residuos de fosfotirosina de la tirosina quinasa del receptor. Después, Grb-2 recluta una proteína llamada Sos mediante dos *dominios Src de homología 3 (SH3)* que unen segmentos del polipéptido ricos en prolina. Sos, a su vez, se une a Ras, un componente muy importante de la transducción de señales, y lo activa. Ras es un miembro de una clase de proteínas llamadas proteínas G pequeñas. Como las proteínas G descritas en la sección 14.1, las proteínas G pequeñas contienen GDP unido en su forma inactiva. Sos abre el bolsillo de unión de nucleótidos de Ras, permitiendo la salida del GDP y la entrada de GTP a su lugar. Dado el papel que desempeña, a Sos se la denomina *factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF)*. Por tanto, la unión de EGF al receptor de EGF produce la transformación de Ras a su forma unida a GTP, actuando Grb-2 y Sos como intermediarios (Figura 14.30).

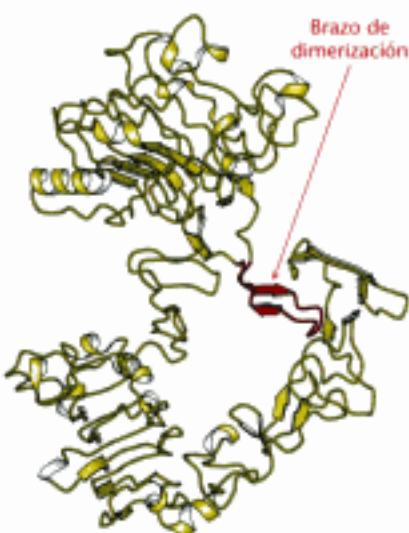


Figura 14.28 Estructura del receptor de EGF inactivado. El dominio extracelular del receptor de EGF se muestra sin EGF. Notese que el brazo de dimerización está unido a una zona del receptor que impide su interacción con el otro receptor.

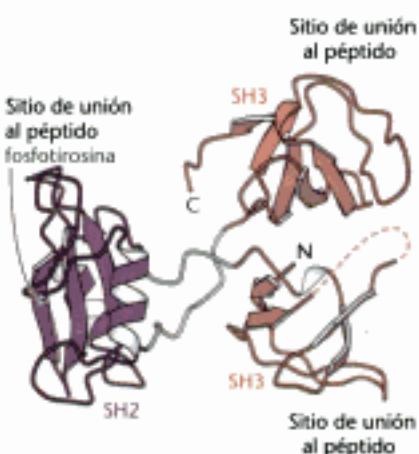
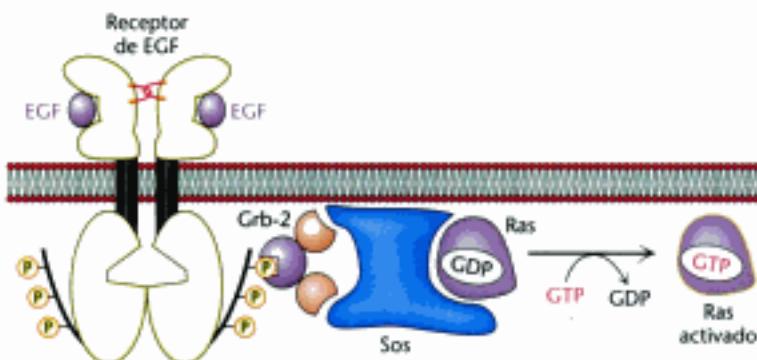


Figura 14.29 Estructura del Grb-2, una proteína adaptadora. Grb-2 consta de un dominio SH2 central rodeado por dos dominios SH3. En el receptor activo, el dominio SH2 une residuos de fosfotirosina y el dominio SH3 se une a regiones ricas en prolina de otras proteínas. [Tomado de 1GRI.pdb.]

Figura 14.30 Mecanismo de activación de Ras. La dimerización del receptor de EGF debido a la unión de EGF produce la fosforilación de las colas C-terminales del receptor, el posterior reclutamiento de Grb-2 y Sos, y el intercambio de GTP en vez de GDP en Ras. La vía de transducción de la señal provoca la conversión de Ras a su forma activa unida a GTP.



Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

+ Receptor EGF

Fosforilación cruzada

↓
Receptor fosforilado

Interacción proteína-proteína

↓ Complejo receptor del EGF-Sos

Intercambio de GTP en vez de GDP

Amplificación

↓ Ras activada

Interacción proteína-proteína

↓ Raf activada

Reacción enzimática

Amplificación

↓ MEK activada

Reacción enzimática

Amplificación

↓ ERK activada

Reacción enzimática

Amplificación

↓ Factores de transcripción fosforilados
Cambios en la expresión de genes

Figura 14.31 Vía de señalización por EGF. Las etapas clave en la vía iniciada por la unión del EGF al receptor del EGF. Una cascada de quininas conduce a la fosforilación del factor de transcripción y cambios concomitantes en la expresión de genes.

La proteína Ras activada inicia una cascada de proteína quininas

Ras cambia su conformación cuando se transforma de su forma unida a GDP a su forma unida a GTP. En la forma unida a GTP, Ras une otras proteínas, incluida una proteína quinasa llamada Raf. Cuando Raf se une a Ras, sufre un cambio conformacional que activa su dominio proteína quinasa. Como Ras, Raf permanece anclada a la membrana a través de un lípido isoprenoide al que se une covalentemente. La proteína Raf activada fosforila, entonces, otras proteínas incluidas unas proteína quininas llamadas MEKs. A su vez, MEKs activan quininas llamadas *quininas reguladas por señales extracelulares* (ERKs). Las ERKs fosforilan, a su vez, numerosos sustratos, incluidos factores de transcripción en el núcleo, así como otras proteína quininas. El flujo completo de información desde la llegada del EGF a la superficie celular a los cambios en la expresión de genes se resume en la Figura 14.31.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína de transducción de señales Ras pertenece a una superfamilia de proteínas de señalización denominadas proteínas G pequeñas o GTPasas pequeñas. Esta amplia superfamilia de proteínas –agrupadas en subfamilias llamadas Ras, Rho, Arf, Rab y Ran– desempeñan un papel importante en multitud de funciones celulares incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la movilidad celular, la citoquinesis y el transporte de materiales a través de la célula (Tabla 14.2). Al igual que sus parientes las proteínas G heterotriméricas, las proteínas G pequeñas alternan cíclicamente entre una forma activa unida a GTP y una forma inactiva unida a GDP. Se diferencian de las proteínas G heterotriméricas en que son más pequeñas (de 20 a 25 kd frente a los 30–35 kd) y monoméricas. Sin embargo, las dos familias están relacionadas mediante evolución divergente, y las proteínas G pequeñas tienen muchos mecanismos y motivos estructurales clave comunes con la subunidad G_a de las proteínas G heterotriméricas.

La señalización por EGF la finalizan fosfatases de proteínas y la actividad GTPasa intrínseca de Ras

Dado que muchos componentes de la vía de transducción de señales del EGF se activan por fosforilación, podemos esperar que las fosfatases ejerzan una función trascendental en la terminación de la señalización por EGF. Y así es: fosfatases cruciales

TABLA 14.2 Superfamilia Ras de GTPasas

Subfamilia	Función
Ras	Regula el crecimiento celular mediante proteína quininas de serina-treonina.
Rho	Reorganiza el citoesqueleto mediante proteína quininas de serina-treonina
Arf	Activa la ADP-ribosiltransferasa de la subunidad A de la toxina del cólera; regula las vías de tráfico vesicular; activa la fosfolipasa D.
Rab	Desempeña una actividad fundamental en los procesos de secreción y endocitosis.
Ran	Funciona en el transporte de RNA y proteína hacia dentro y hacia fuera del núcleo.

les eliminan grupos fosforilo de residuos de tirosina en el receptor de EGF y de residuos de serina, treonina y tirosina en las proteína quinasas que participan en la cascada de señalización. El mismo proceso de señalización desencadena los eventos que activan muchas de esas fosfatases. Por consiguiente, la señal de activación también inicia la señal de terminación.

Al igual que las proteínas G activadas por los receptores de 7TM, Ras posee actividad GTPasa intrínseca. Por tanto, la forma de Ras, activada por GTP, se convierte espontáneamente en la forma GDP inactiva. La velocidad de conversión se acelera en presencia de *proteínas activadoras de GTPasas* (GAPs), proteínas que interactúan con Ras en la forma GTP y facilitan la hidrólisis del GTP. Por tanto, el tiempo de vida de la proteína Ras activada es regulado en la célula por proteínas accesorias. La actividad GTPasa de Ras es crucial para desconectar señales relacionadas con el crecimiento celular y, por tanto, no es sorprendente que en muchos tipos de cáncer se encuentren mutaciones en Ras, tal y como veremos en la Sección 14.5.

14.4 Muchos elementos de las diferentes vías de transducción de señales son recurrentes con variaciones

Podemos empezar a encontrar sentido a la complejidad de las vías de transducción de señales considerando varios elementos recurrentes. Estos elementos han aparecido constantemente en las vías descritas en este capítulo y subyacen en muchas vías de señalización adicionales no consideradas aquí.

1. Las proteína quinasas son primordiales en muchas vías de transducción de señales. Las proteína quinasas son fundamentales en las tres vías de transducción de señales descritas en este capítulo. En la vía iniciada por la adrenalina, una proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), colocada al final de la vía, transduce la información que se representa con un aumento de concentración de cAMP, en modificaciones covalentes que alteran la actividad de enzimas metabólicos clave. En las vías iniciadas por la insulina y el EGF, los mismos receptores son proteína quinasas, y varias proteína quinasas adicionales participan más adelante en la vía. La amplificación de la señal debida a cascadas de proteína quinasas son aspectos comunes de cada una de estas vías y otras muchas. Además, a menudo las proteína quinasas fosforilan multitud de sustratos, incluyendo varios no mencionados aquí, y de esta manera son capaces de generar una amplia variedad de respuestas.

2. Los segundos mensajeros participan en muchas vías de transducción de señales. Hemos mencionado varios segundos mensajeros, incluyendo el cAMP, Ca^{2+} , IP_3 y el lípido DAG. Puesto que los segundos mensajeros se activan bien por enzimas, bien por la apertura de conductos iónicos, su concentración puede amplificarse enormemente en relación con la señal que los generó. Proteínas especializadas son sensibles a la concentración de estos segundos mensajeros y dan continuidad al flujo de información a lo largo de la vía de transducción de señales.

Los segundos mensajeros que hemos visto aparecen de forma repetida en muchas otras vías de transducción de señales. Por ejemplo, en la presentación del sistema sensorial en el Capítulo 32, veremos como la señalización a través del calcio y de nucleótidos cíclicos ejerce funciones clave en la visión y en el olfato.

3. Dominios especializados que median en interacciones específicas están presentes en muchas proteínas de señalización. El "cableado" de muchas vías de transducción de señales está basado en determinados dominios proteicos, presentes en proteínas de transducción de señales, que agrupan y aproximan componentes de las vías de transducción de señales. Hemos visto ya varios, incluyendo los dominios homólogos a la pleckstrina (que facilitan las interacciones de proteínas con el lípido PIP_2) y los dominios SH_2 (que facilitan las interacciones con polipéptidos que contienen residuos de tirosina fosforilados). La evolución de las vías de transducción de señales se ha

producido en gran medida mediante la incorporación de fragmentos de DNA que codifican estos dominios en los genes que codifican los componentes de estas vías.

La presencia de estos dominios resulta de gran ayuda para los científicos que tratan de desentrañar las vías de transducción de señales. Cuando se identifica una nueva proteína de una vía de transducción de señales, se puede analizar su secuencia, usando el método descrito en el capítulo 6, para detectar la presencia de estos dominios especializados. Si se encuentran uno o más dominios de función conocida, es posible, a menudo, desarrollar hipótesis claras sobre las potenciales proteínas con las que podrían interaccionar y los mecanismos de transducción de señales.

14.5 Los defectos en las vías de transducción de señales pueden provocar cáncer y otras enfermedades

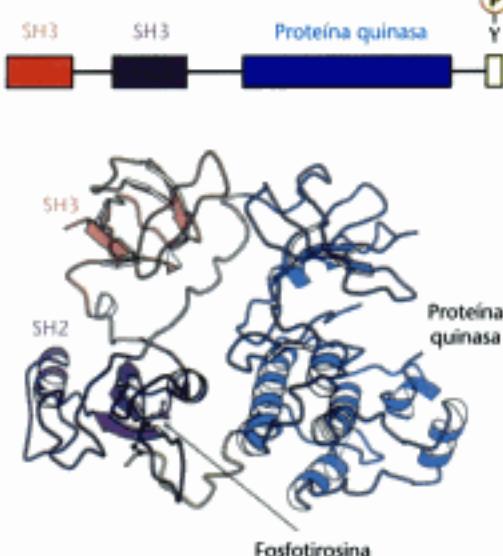
 A la vista de su complejidad, no es sorprendente que las vías de transducción de señales fallen, a veces, causando patologías y enfermedades. El cáncer, un conjunto de patologías caracterizadas por un incontrolado e inapropiado crecimiento celular, está estrechamente asociado con los defectos en proteínas transductoras de señales. Además, el estudio del cáncer y, de manera especial, el de cánceres provocados por ciertos virus, ha contribuido en gran medida a nuestro conocimiento de las proteínas y las vías de transducción de señales.

Por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous es un retrovirus que causa sarcoma (un cáncer de tejidos de origen mesodérmico, tales como el músculo o el tejido conjuntivo) en pollos. Además de los genes necesarios para la replicación vírica, este virus lleva un gen llamado *v-src*. El *v-src* es un *oncogén*; conduce a la transformación de tipos celulares susceptibles, es decir, la generación de características cancerosas en esos tipos celulares. El oncogén *v-src* codifica una proteína quinasa de tirosinas que tiene dominios SH2 y SH3 (Figura 14.32). La secuencia de aminoácidos de la proteína *v-Src* es semejante a una proteína que se encuentra normalmente en las células musculares de pollo denominada *c-Src* (de *Src* celular). El gen *c-src* no induce transformación celular y se denomina protooncogén y codifica una proteína transductora de señales que regula el crecimiento celular.

 ¿Por qué las actividades biológicas de las proteínas *v-Src* y *c-Src* son tan diferentes? En la *v-Src*, los 19 aminoácidos terminales del extremo carboxilo son sustituidos por una secuencia de 11 aminoácidos completamente diferente en la que se ha perdido un residuo de tirosina clave que se fosforila al inactivarse *c-Src*. Por consiguiente, *v-Src* está siempre activada. Desde el descubrimiento de *v-Src*, muchas otras proteínas quinásas han sido identificadas como oncogenes.

El gen que codifica Ras, un componente de la vía iniciada por el EGF, es uno de los genes más comúnmente mutado en los tumores en humanos. Las células de mamíferos poseen tres proteínas Ras de 21 kd (H-, K- y N-Ras), cada una de las cuales alterna cíclicamente entre una forma inactiva unida a GDP y activa unida a GTP. Las mutaciones más comunes en tumores conducen a la pérdida de la capacidad para hidrolizar GTP. Por tanto, la proteína Ras se bloquea en la forma activa y sigue estimulando el crecimiento celular, incluso en ausencia de una señal continua.

Otros genes pueden contribuir al desarrollo del cáncer sólo cuando ambas copias del gen presentes normalmente en una célula faltan o están dañados. Tales genes se denominan *genes supresores de tumores*. Por ejemplo, los genes de algunas de las fosfatases que participan en la terminación de la señalización por EGF son supresores de tumores. Cuando no hay fosfatases funcionales, la señalización por EGF continúa una vez iniciada, estimulando un crecimiento celular inapropiado.



 **Figura 14.32 Estructura de la Src.** (A) La Src celular posee un dominio SH3, un dominio SH2, un dominio proteína quinasa, y un extremo carboxilo terminal que incluye un residuo esencial de tirosina. (B) Estructura de la c-Src en la forma inactiva con el residuo clave de tirosina fosforilado. Nótese como los tres dominios trabajan juntos para mantener el enzima en una conformación inactiva: el residuo de fosfotirosina se une al dominio SH2 y el puente entre el dominio SH2 y el dominio proteína quinasa lo une el dominio SH3. [Tomado de ZPTK.pdb.]

Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para inhibir las vías de transducción de señales activadas en los tumores

En los tumores se observan frecuentemente receptores de quinasas mutados o sobreexpresados. Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidermico (EGFR) se sobreexpresa en algunos cánceres epiteliales humanos, incluyendo los cánceres de mama, ovario y colorrectal. Dado que pequeñas cantidades del receptor pueden dimerizar y activar las vías de señalización, incluso sin unirse a EGF, la sobreexpresión del receptor aumenta las posibilidades de que una señal de "crecimiento y división" se envíe inadecuadamente a la célula. La comprensión de la relación del cáncer con las vías de transducción de señales ha llevado a aproximaciones experimentales cuya diana es el EGFR. La estrategia consiste en producir anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular del receptor alterado. Uno de tales anticuerpos, cetuximab (Erbitux), reconoce eficientemente el EGFR en los cánceres colorrectales. El cetuximab inhibe al EGFR compitiendo con el EGF por el centro activo del receptor. Dado que el anticuerpo bloques estéricamente el cambio de conformación que expone el brazo de dimerización, el anticuerpo por sí mismo no puede inducir la dimerización. La consecuencia es que la vía controlada por el EGFR no se inicia.

El cetuximab no es el único anticuerpo que se ha desarrollado dirigido contra un receptor quinasa de tirosina. El trastuzumab (Herceptin) inhibe a otro miembro de la familia de EGFR, Her2, que se sobreexpresa en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama. Hay que recordar que esta proteína puede transmitir la señal, incluso en ausencia de ligando; de forma que es muy probable que la sobreexpresión estimule la proliferación celular. Las pacientes con cáncer de mama se someten, ahora, a análisis para detectar la sobreexpresión de Her2 y se tratan con Herceptin como corresponde. Así, estos tratamientos contra el cáncer se adaptan a las características genéticas del tumor.

Los inhibidores de proteína quinasas pueden ser fármacos anticancerosos eficaces

La amplia presencia de proteína quinasas hiperactivas en las células cancerosas sugiere que las moléculas que inhiben a estos enzimas pueden actuar como agentes antitumorales. Resultados recientes apoyan de forma espectacular este concepto. Por ejemplo, más del 90% de los pacientes con leucemia mielogénica crónica (CML, siglas en inglés) presentan un defecto cromosómico específico en las células cancerosas (Figura 14.33). La translocación de material genético entre los cromosomas 9 y 22 hace que el gen *c-abl*, el cual codifica una quinasa de tirosinas de la familia Src, se inserte en el gen *bcr* del cromosoma 22. El resultado es la producción de una proteína de fusión llamada Bcr-Abl que contiene fundamentalmente secuencias de la c-Abl quinasa. Sin embargo, el gen *bcr-abl* no se regula de forma apropiada; se expresa a niveles muy superiores a los del gen que codifica la quinasa c-Abl normal, activando una vía que estimula el crecimiento. Debido a ésta sobreexpresión, las células de leucemia expresan una diana única para la quimioterapia. Un inhibidor específico de la Bcr-Abl quinasa, el Gleevec (STI-571, imatinib mesilato), ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento de pacientes que sufren el CML. Esta aproximación a la quimioterapia del cáncer es fundamentalmente distinta de la mayor parte de las estrategias, que se dirigen contra todas las células de crecimiento rápido, incluyendo las normales. *Por tanto, nuestro conocimiento de las vías de transducción de señales está dando lugar al desarrollo de nuevos conceptos en los tratamientos de las enfermedades.*

El cólera y la tosferina se deben a una actividad alterada de la proteína G

Si bien los defectos en las vías de transducción de señales se han estudiado más exhaustivamente en relación con el cáncer, tales defectos son importantes en muchas otras enfermedades. El cólera y la tosferina son dos patologías de las vías de señalización dependientes de la proteína G. Consideraremos primero el mecanismo de acción de la toxina del cólera, secretada por la bacteria intestinal *Vibrio cholerae*.

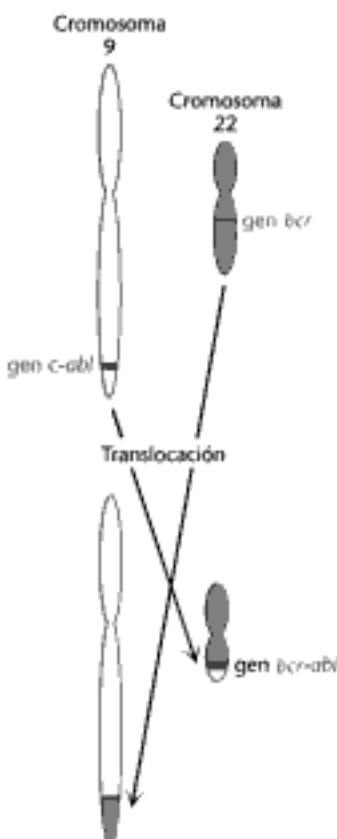


Figura 14.33 Formación del gen *bcr-abl* por translocación. En la leucemia mielogénica crónica, partes del cromosoma 9 y 22 son intercambiadas recíprocamente, provocando la fusión de los genes *bcr* y *abl*. La proteína quinasa codificada por el gen *bcr-abl* se expresa en células que tienen esta translocación a niveles más altos que en las células normales el gen *c-abl*.

El cólera es una enfermedad potencialmente mortal, que produce diarreas graves y se transmite a través de agua o comidas contaminadas. Provoca una pronunciada secreción de electrolitos y fluidos por vía intestinal. La toxina del cólera, colerágeno, es una proteína compuesta de dos unidades funcionales: una subunidad B que se une a los gangliósidos G_{M1} (p. 738) del epitelio intestinal y una subunidad catalítica A que penetra en las células. La subunidad A cataliza la modificación covalente de una proteína $G_{\alpha i}$; la subunidad α se modifica por la unión de una ADP-ribosa a un residuo de arginina. Esta modificación estabiliza la forma unida a GTP de $G_{\alpha i}$ bloqueando la molécula en la conformación activa. La proteína G activada, a su vez, activa la proteína quinasa A de forma continua. La PKA abre un conducto de cloro e inhibe la absorción de sodio por el intercambiador $Na^+ - H^+$, fosforilando el conducto y el intercambiador. El resultado neto de la fosforilación es una pérdida excesiva de $NaCl$ y de grandes cantidades de agua en el intestino. Los pacientes que sufren el cólera durante 4 o 6 días pueden perder dos veces su peso en fluidos corporales. El tratamiento consiste en la rehidratación con una disolución de glucosa y electrolitos.

Mientras que el cólera es el resultado de la actividad de una proteína G mantenida en su conformación activa, lo que hace que la vía de transducción de señales esté permanentemente activada, la tosferina, es el producto de una situación opuesta. La toxina pertúsica también añade un grupo ADP-ribosa a una proteína G_{α} , en este caso una proteína $G_{\alpha i}$ que inhibe a la adenilato ciclase, cierra los conductos de Ca^{2+} , y abre conductos K^+ . El efecto de esta modificación, sin embargo, es disminuir la afinidad de la proteína G por GTP, manteniéndola en la conformación inactiva. Los síntomas pulmonares no se han adjudicado a ningún sustrato concreto de la proteína $G_{\alpha i}$. La bacteria responsable de la tosferina, *Bordetella pertussis*, secreta la toxina pertúsica.

Resumen

En los seres humanos y otros organismos multicelulares, determinadas moléculas señalizadoras se liberaran desde las células de un órgano y se detectan mediante otras células en otros órganos del cuerpo. El mensaje "hay una molécula señalizadora" se convierte en cambios específicos en el metabolismo o en la expresión de genes por medio, a menudo, de complejos entrampados denominados "vías de transducción de señales". Estas vías amplifican la señal inicial y conducen a cambios en las propiedades de moléculas efectoras específicas.

14.1 Las proteínas G heterotriméricas transmiten la señal y se desactivan a sí mismas

La adrenalina se une a una proteína de superficie llamada receptor β -adrenérgico. Este receptor es un miembro de una familia de receptores de siete hélices, denominada así porque cada receptor tiene 7 α -hélices que atraviesan la membrana celular. Cuando la adrenalina se une al receptor β -adrenérgico en el espacio extracelular, el receptor sufre un cambio conformacional que se detecta en la célula por una proteína de señalización denominada proteína G heterotímérica. La subunidad α de la proteína G intercambia una molécula de GDP unida por GTP y a continuación libera el heterodímero formado por las subunidades β y γ . La subunidad α en la forma unida a GTP se une entonces a la adenilato ciclase y la activa, produciendo un aumento del segundo mensajero AMP cíclico. Este aumento en la concentración de AMP cíclico, a su vez, activa la proteína quinasa A. Otros receptores 7TM también transmiten la señal a través de proteínas G heterotriméricas, si bien en estas vías, a menudo participan enzimas distintas de la adenilato ciclase. Una vía importante, la vía de los fosfoinositidos, conduce a la activación de la fosfolipasa C, la cual hidroliza un lípido de membrana para originar dos segundos mensajeros, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato. Un aumento en la concentración de IP₃ produce la liberación del ion calcio, otro importante segundo mensajero, en la célula. La señalización por proteína G finaliza al hidrolizarse a GDP el GTP unido.

14.2 Señalización por insulina: las cascadas de fosforilación son primordiales en muchos procesos de transducción de señales

403

Términos Clave

Las proteína quinasas son componentes clave en muchas vías de transducción de señales, incluyendo algunas en las que esta actividad es un componente esencial del receptor. Un ejemplo de este tipo de receptores es la proteína de membrana, quinasa de tirosinas, que une insulina. La unión de la insulina hace que una subunidad en el receptor dímerico fosforile, específicamente, ciertos residuos de tirosina de la otra subunidad. Los cambios conformacionales resultantes aumentan considerablemente la actividad quinasa del receptor. La activación de la quinasa del receptor inicia una cascada de quinasas que incluye tanto quinasas de lípidos como quinasas de proteínas. Estas cascadas conducen, finalmente, a la movilización del transportador de glucosa a la superficie celular, aumentando la captación de glucosa por la célula. La terminación de la señalización por insulina necesita de la acción de fosfatasas.

14.3 Señalización por EGF: los sistemas de transducción de señales están preparados para responder

Las modificaciones necesarias para transformar muchas proteínas transductoras de señales de su forma activa a la inactiva son muy pequeñas. El factor de crecimiento epidérmico también transmite la señal a través de un receptor con actividad tirosina quinasa. La unión del EGF induce un cambio conformacional que permite la dimerización del receptor y la fosforilación cruzada. El receptor fosforilado se une a proteínas adaptadoras que median en la activación de Ras, una proteína G pequeña. La activación de Ras inicia una cascada de proteína quinasas que finalmente produce la fosforilación de factores de transcripción y cambios en la transcripción de genes. La finalización de la señalización por EGF necesita de fosfatasas y de la hidrólisis de GTP por Ras.

14.4 Muchos elementos de las diferentes vías de transducción de señales son recurrentes con variaciones

Las proteína quinasas son componentes de muchas vías de transducción de señales, tanto como componentes de receptores, como en otras funciones. Los segundos mensajeros, incluyendo nucleótidos cíclicos, calcio y derivados lípidicos, son comunes a muchas vías de transducción de señales. Los cambios en la concentración de los segundos mensajeros son muchas veces mayores que los cambios asociados con la primera señal debido a la amplificación del proceso. Los dominios pequeños que reconocen residuos de fosfotirosina o determinados lípidos están presentes en muchas proteínas de señalización y son esenciales para determinar la especificidad de la interacción.

14.5 Los defectos en las vías de transducción de señales pueden provocar cáncer y otras enfermedades

Los genes que codifican componentes de las vías de transducción de señales que controlan el crecimiento celular aparecen con frecuencia mutados en el cáncer. Algunos genes pueden estar mutados formando los llamados oncogenes que son activos independientemente de la señal apropiada. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los receptores de superficie que participan en la señalización se han desarrollado para usarlos en los tratamientos contra el cáncer. Nuestro conocimiento de las bases moleculares del cáncer nos está permitiendo el desarrollo de fármacos anticancerígenos dirigidos contra dianas específicas, tales como el inhibidor específico de quinasas Gleevec.

Términos Clave

mensajero primario (p. 382)
ligando (p. 382)
mensajero secundario (p. 382)
conversación cruzada (p. 382)

receptor β -adrenérgico (p. 383)
receptor de siete hélices transmembranales (7TM) (p. 383)
rodopsina (p. 384)

proteína G (p. 385)
receptor acoplado a proteína G (GPCR) (p. 385)
adenilato ciclase (p. 385)

- proteína quinasa A (p. 386)
 quinasa del receptor β -adrenérgico (p. 387)
 cascada del fosfoinositido (p. 388)
 fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) (p. 388)
 fosfolipasa C (p. 388)
 proteína quinasa C (PKC) (p. 388)
 calmodulina (CaM) (p. 390)
 mano EF (p. 390)
 proteína quinasa dependiente de calmodulina (CaM quinasa) (p. 391)
 insulina (p. 391)
 receptor de insulina (p. 392)
- tirosina quinasas (p. 392)
 receptor de tirosina quinasa (p. 392)
 sustrato del receptor de insulina (IRS) (p. 393)
 proteína adaptadora (p. 394)
 dominio de homología 2 con Src (SH2) (p. 394)
 factor de crecimiento epidérmico (EGF) (p. 395)
 receptor EGF (p. 396)
 brazo de dimerización (p. 396)
 dominio de homología 3 con Src (SH3) (p. 397)
- Ras (p. 397)
 proteína G pequeña (p. 397)
 factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) (p. 397)
 quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (p. 398)
 proteína activadora de GTPasa (GAP) (p. 399)
 oncogén (p. 400)
 protooncogén (p. 400)
 gen supresor de tumores (p. 400)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Scott, J. D. y Pawson, T., 2000. Cell communication: The inside story. *Sci. Am.* 282(6):7279.
 Pawson, T., 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580.
 Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K. y Hofmann, K. P., 2001. Activation of rhodopsin: New insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* 26: 318-324.
 Tsien, R. Y., 1992. Intracellular signal transduction in four dimensions: From molecular design to physiology. *Am. J. Physiol.* 263: C723-C728.
 Loewenstein, W. R., 1999. *Touchstone of Life: Molecular Information, Cell Communication, and the Foundations of Life*. Oxford University Press.

Proteínas G y receptores 7TM

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. y Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-745.
 Lefkowitz, R. J., 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell Biol.* 2: E133-E136.
 Bourne, H. R., Sanders, D. A. y McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127.
 Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B., 1994. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369: 621-628.
 Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B., 1993. The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature* 366: 654-663.
 Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B., 1994. GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin alpha-GDP-AlF₄⁻. *Nature* 372: 276-279.
 Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. y Sigler, P. B., 1996. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379: 369-374.
 Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T. y Bourne, H. R., 1995. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 503-506.
 Farfel, Z., Bourne, H. R. y Iiri, T., 1999. The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J. Med.* 340: 1012-1020.
 Bockaert, J. y Pin, J. P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: An evolutionary success. *EMBO J.* 18: 1723-1729.

Cascada del cAMP

- Hurley, J. H., 1999. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274: 7599-7602.

- Kim, C., Xuong, N. H. y Taylor, S. S., 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIα) subunits of PKA. *Science* 307: 690-696.
 Tesmer, J. J., Sunahara, R. K., Gilman, A. G. y Sprang, S. R., 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G_{αi} - GTPyS. *Science* 278: 1907-1916.
 Smith, C. M., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Akamine, P. y Taylor, S. S., 1999. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: Prototype for an extended network of communication. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 313-341.
 Taylor, S. S., Buechler, J. A. y Yonemoto, W., 1990. cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971-1005.

Cascada del fosfoinositido

- Berridge, M. J. y Irvine, R. F., 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205.
 Berridge, M. J., 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325.
 Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. y Williams, R. L., 1996. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ. *Nature* 380: 595-602.
 Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. y Sigler, P. B., 1995. Structure of the high affinity complex of inositol triphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83: 1037-1046.
 Baraldi, E., Carugo, K. D., Hyvonen, M., Surdo, P. L., Riley, A. M., Potter, B. V., O'Brien, R., Ladbury, J. E. y Saraste, M., 1999. Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Structure Fold Des.* 7: 449-460.

Calcio

- Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B. y Bax, A., 1992. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256: 632-638.
 Kubomura, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B. y Bax, A., 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 2: 768-776.
 Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R. Y., 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
 Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R. Y. y Schafer, W. R., 2000. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26: 583-594.
 Chin, D. y Means, A. R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10: 322-328.
 Dawson, A. P., 1997. Calcium signalling: How do IP₃ receptors work? *Curr. Biol.* 7: R544-R547.

Proteína quinasas, incluyendo el receptor de tirosina quinasas

- Riedel, H., Dull, T. J., Honegger, A. M., Schlessinger, J. y Ullrich, A., 1989. Cytoplasmic domains determine signal specificity, cellular routing characteristics and influence ligand binding of epidermal growth factor and insulin receptors. *EMBO J.* 8: 2943-2954.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S. y Zoller, M. J., 1993. A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* 18: 84-89.
- Sicheri, F., Meurens, I. y Kurian, J., 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385: 602-609.
- Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D. y Kurian, J., 1993. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72: 779-790.
- Schlessinger, J., 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 100: 211-225.
- Simon, M. A., 2000. Receptor tyrosine kinases: Specific outcomes from general signals. *Cell* 103: 13-15.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M. y Lin, S. F., 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548-5557.
- Hubbard, S. R., 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 343-358.
- Carter-Su, C. y Sunik, L. S., 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: Growth hormone receptor as a model system. *Recent Prog. Horm. Res.* 53: 61-82.

Vía de señalización de la insulina

- Khan, A. H. y Pessin, J. E., 2002. Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475-1483.
- Bevan, P., 2001. Insulin signalling. *J. Cell Sci.* 114: 1429-1430.
- De Meyts, P. y Whitaker, J., 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: Implications for drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 769-783.
- Dhe-Paganon, S., Ottlinger, E. A., Nolte, R. T., Eck, M. J. y Shoelson, S. E., 1999. Crystal structure of the pleckstrin homology/phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 8378-8383.
- Domin, J. y Waterfield, M. D., 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410: 91-95.
- Hubbard, S. R., 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16: 5572-5581.
- Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L. y Hendrickson, W. A., 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372: 746-754.

Vía de señalización del EGF

Vía de señalización del EGF

- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. y Yokoyama, S., 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGFR/ErbB receptors. *Mol. Cell* 12: 541-552.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr. y Leahy, D. J., 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421: 756-760.
- Chong, H., Viks, H. G. y Guan, K. L., 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 15: 463-469.
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X. y Eigenbrot, C., 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* 277: 46265-46272.

Ras

- Milburn, M. V., Tong, L., DeVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. y Kim, S. H., 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* 247: 939-945.
- Borlack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. y Kurian, J., 1998. The structural basis of the activation of Ras by SOS. *Nature* 394: 337-343.
- Maignan, S., Guilloteau, J. P., Fromage, N., Amoux, B., Bequart, J. y Debruyne, A., 1995. Crystal structure of the mammalian Gab2 adaptor. *Science* 268: 291-293.
- Takai, Y., Sasaki, T. y Matozaki, T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81: 153-208.

Cáncer

- Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Feed, J. M., Capdeville, R. y Talpaz, M., 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.* 344: 1038-1042.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K. W., 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9: 138-141.
- Ellis, C. A. y Clark, G., 2000. The importance of being K-Ras. *Cell Signal.* 12: 425-434.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- McCormick, F., 1999. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 9: M53-M56.

Problemas

1. **Mutaciones activas.** Algunas proteínas quinasas están inactivas a menos que estén fosforiladas en residuos clave de serina o treonina. En algunas ocasiones, el enzima activo puede producirse por la mutación que sustituye estos residuos de serina o treonina por residuos de glutamato. Proponer una explicación.

2. **En el bolsillo.** Los dominios SH2 se unen a los residuos de fosfotirosina situados en profundos bolsillos de sus superficies. ¿Es de esperar que los dominios SH2 se unan con alta afinidad a la fosfoserina o a la fosfotreonina? ¿Por qué sí o por qué no?

3. **Anticuerpos que se parecen a hormonas.** Los anticuerpos tienen dos centros idénticos de unión con los antígenos. Curiosamente, los anticuerpos contra las regiones extracelulares de los receptores de factores de crecimiento producen a menudo los mismos efectos que la exposición a dichos factores. Explicar este hecho.

4. **Intercambio fácil.** Se ha identificado una forma mutada de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica; esta forma rápidamente intercambia nucleótidos incluso en ausencia del receptor activado. ¿Cuál puede ser el efecto de esta forma mutada de la subunidad α en la vía de señalización?

5. **Velocidades de difusión.** Normalmente, las velocidades de difusión varían de forma inversamente proporcional a los pesos moleculares; así, las moléculas más pequeñas difunden antes que las mayores. Sin embargo, en las células, el ion calcio difunde con menor velocidad que el cAMP. Proponer una posible explicación.

6. **Inundación de glucosa.** Para la generación de ATP en el músculo se moviliza glucosa en respuesta a la adrenalina, la cual activa a la $G_{\alpha s}$. La fosfodiesterasa de AMP cíclico es un enzima que convierte

el cAMP en AMP. ¿Cómo afectarán a la movilización de glucosa en el músculo los inhibidores de la cAMP fosfodiesterasa?

7. *Muchos defectos.* Se ha realizado un esfuerzo importante para determinar los genes en los que variaciones en la secuencia contribuyen al desarrollo de la diabetes de tipo 2. Se ha implicado a unos 800 genes. Proponer una explicación a este hecho.

8. *Señalización por factores de crecimiento.* La hormona de crecimiento humana se une a una proteína de membrana de la superficie celular que no es un receptor de tirosina quinasa. El dominio intracelular del receptor puede unir otras proteínas en el interior de la célula. Además, los datos indican que el receptor es monomérico en ausencia de hormona pero dimeriza al unirse la hormona. Proponer un posible mecanismo para la señalización por la hormona del crecimiento.

9. *Híbrido.* Suponer que, mediante manipulación genética, se obtiene un receptor quimérico formado por el dominio extracelular del receptor de insulina y los dominios transmembrana e intracelular del receptor de EGF. Se exponen células que expresan este receptor a insulina y se examina el nivel de fosforilación del receptor quimérico. ¿Qué se espera observar y por qué? ¿Qué resultado cabría esperar si estas células se expusieran al EGF?

10. *Amplificación total.* Suponer que cada receptor β -adrenérgico unido a adrenalina convierte 100 moléculas de G_{α} , a su forma unida a GTP y que cada molécula de adenilato ciclase activada produce 1000 moléculas de cAMP por segundo. Aceptando una respuesta total, ¿cuántas moléculas de cAMP se formarán en 1 segundo después de la formación de un único complejo de adrenalina unida al receptor β -adrenérgico?

Problema de integración del capítulo

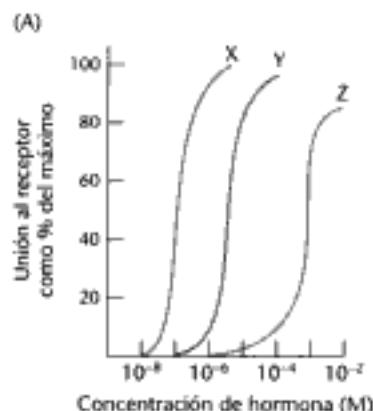
11. *Vía del factor de crecimiento nervioso.* El factor de crecimiento nervioso (NGF) se une a un receptor tirosina quinasa. Cuando las células que expresan este receptor se tratan con NGF aumenta el contenido en diacilglicerol de la membrana plasmática. Proponer una vía sencilla de señalización e identificar las isoformas de cualesquier de los enzimas que participan. ¿Es de esperar que las concentraciones de los restantes segundos mensajeros comunes se incrementen como consecuencia del tratamiento con NGF?

Problema de mecanismos

12. *Antepasados lejanos.* La estructura de la adenilato ciclase es similar a las estructuras de algunos tipos de DNA polimerasas, sugiriendo que estos enzimas derivan de un antepasado común. Comparar las reacciones catalizadas por estos dos enzimas. ¿En qué se parecen?

Problemas de interpretación de datos

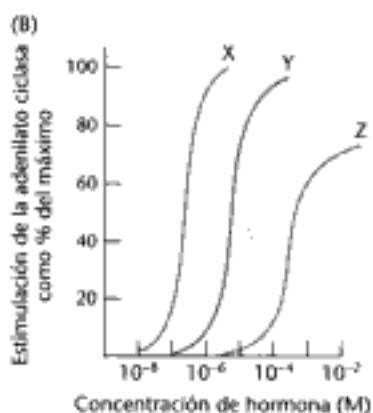
13. *Establecer la especificidad.* Se quiere determinar la especificidad de la unión con la hormona de un receptor de membrana recientemente identificado. En experimentos independientes se mezclan con el receptor tres hormonas X, Y, Z y se determina el porcentaje de la capacidad de unión del receptor en función de la concentración de la hormona; los resultados se muestran en la figura A.



(a) ¿Qué concentraciones de cada hormona producen un 50% de unión máxima?

(b) ¿Qué hormona muestra la más alta afinidad de enlace con el receptor?

Ahora se quiere determinar como el complejo hormona-receptor estimula a la cascada de la adenilato ciclase. Para ello, se mide la actividad de la adenilato ciclase en función de la concentración de la hormona, tal como se muestra en la figura B.

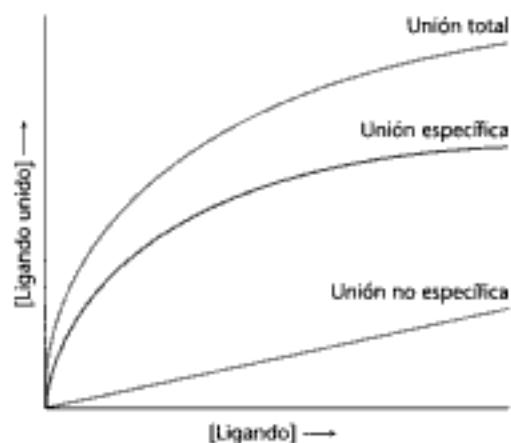


(c) Cuál es la relación entre la afinidad de enlace del complejo hormona-receptor y la capacidad de la hormona para potenciar la actividad adenilato ciclase? ¿Qué se podría concluir acerca del mecanismo de acción del complejo hormona-receptor?

(d) Sugerir experimentos que podrían determinar si una proteína G_{α} es un componente de la vía de transducción de señales.

14. *Cuestiones sobre uniones.* Un científico quiere determinar el número de receptores específicos para el ligando X, del cual dispone tanto en su forma radiactiva como de la no radiactiva. En un experimento, añade cantidades crecientes del compuesto X radiactivo y determina su unión a las células. El resultado se muestra como unión total en el gráfico adjunto. A continuación, realiza el mismo experimento excepto que añade varios cientos de veces más de compuesto X no radiactivo. El resultado se muestra como unión no específica. La diferencia entre ambas curvas es la unión específica.

(a) ¿Por qué la unión total no muestra con precisión el número de receptores existentes en la superficie celular?



- (b) ¿Cuál es el propósito del experimento realizado en presencia de un exceso de ligando no radiactivo?
 (c) ¿Cuál es el significado de que la gráfica relativa a la unión específica muestre una meseta?

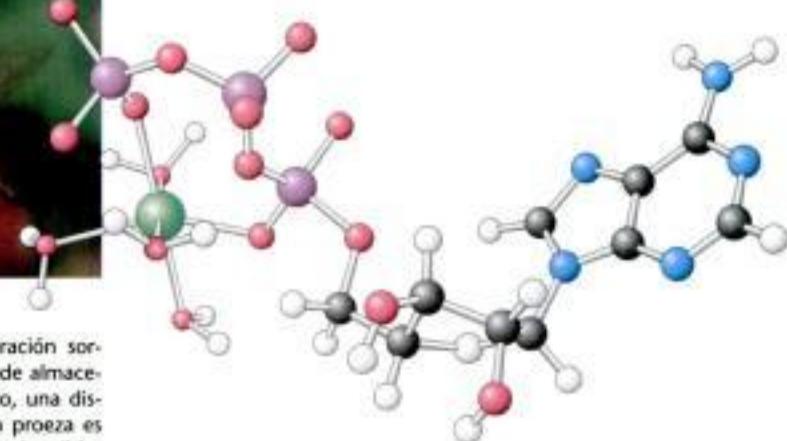
15. *Recuento de receptores.* Realizando experimentos similares a los descritos en los problemas 13 y 14, se puede determinar el número de receptores presentes en la membrana celular. Supongamos que la actividad específica del ligando es de 10^{12} cpm por milimol y que la máxima actividad específica de la unión es de 10^4 cpm por milligramo de proteína de membrana. Si para obtener un milligramo de proteína de membrana se requieren 10^{10} células y consideramos que sólo una molécula de ligando se une a cada receptor, calcular el número de moléculas de receptor presentes en cada célula.

Copyrighted material

Metabolismo: conceptos básicos y visión de conjunto



Los colibríes son capaces de realizar vuelos de duración sorprendente. Por ejemplo, el colibrí de cuello rojo puede almacenar energía suficiente para cruzar el Golfo de México, una distancia de unos 800 km, volando sin descansar. Esta proeza es posible gracias a la capacidad de transformar los combustibles en divisas de energía celular, ATP, representado en el modelo de la derecha. [(Izquierda) K. D. McGraw/Rainbow.]



Los conceptos de conformación y dinámica desarrollados en la Parte I, especialmente aquellos aspectos que tratan de la especificidad y poder catalítico de los enzimas, la regulación de su actividad catalítica y el transporte de iones y moléculas a través de membranas, nos permiten ocuparnos ahora de dos cuestiones importantes en bioquímica:

1. *¿Cómo obtienen las células la energía y el poder reductor a partir de su entorno?*
2. *¿Cómo sintetizan las células los componentes fundamentales de sus macromoléculas y posteriormente cómo se sintetizan las propias macromoléculas?*

Estos procesos se llevan a cabo mediante un conjunto muy ordenado de reacciones químicas, que son conocidas colectivamente como *metabolismo*.

Incluso en un organismo tan sencillo como *Escherichia coli* existen más de un millar de reacciones químicas. A primera vista esta variedad de reacciones puede parecer abrumadora. Sin embargo, una mirada más atenta revela que el metabolismo posee *una estructura coherente que contiene muchos aspectos comunes*. Estos aspectos incluyen la utilización de una divisa de energía y la aparición repetitiva de un número limitado de intermediarios activados. De hecho, un grupo de solamente unas 100 moléculas desempeña un papel central en todas las formas de vida. Y lo que es más, aunque el número de reacciones del metabolismo sea grande, el número de cla-

Contenido

- 15.1 El metabolismo está constituido por muchas reacciones acopladas e interconectadas
- 15.2 El ATP es la divisa universal de energía libre en los sistemas biológicos
- 15.3 La oxidación de las moléculas carbonadas es una fuente importante de energía celular
- 15.4 Las vías metabólicas presentan muchos aspectos recurrentes



Figura 15.1 Metabolismo de la glucosa. La glucosa se metaboliza hasta piruvato en 10 reacciones consecutivas. En condiciones de anaerobiosis, el piruvato se metaboliza hasta lactato y, en condiciones aeróbicas, hasta acetil-CoA. Los carbonos derivados de la glucosa se oxidan secuencialmente hasta CO_2 .

ses de reacciones es pequeño y los mecanismos de regulación de estas reacciones normalmente son bastante sencillos. Las vías metabólicas se regulan de manera parecida. El propósito de este capítulo es realizar una introducción sobre los principios y aspectos generales del metabolismo para sentar las bases de su posterior estudio más detallado.

15.1 El metabolismo está constituido por muchas reacciones acopladas e interconectadas

Los seres vivos necesitan un suministro continuo de energía libre para tres fines principales: (1) la realización de trabajo mecánico en la contracción muscular y otros movimientos celulares, (2) el transporte activo de iones y moléculas, y (3) la síntesis de macromoléculas y otras biomoléculas a partir de precursores sencillos. La energía libre utilizada en estos procesos, que mantienen a un organismo lejos del estado de equilibrio, se extrae del entorno. Los organismos fotosintetizadores, o *fototrofos*, utilizan la energía de la luz solar mientras que los *quimiotrofos*, animales incluidos, obtienen su energía química mediante la oxidación de las reservas alimenticias generadas por los fototrofos.

El metabolismo consta de reacciones que liberan energía y reacciones que la requieren

Básicamente el *metabolismo* consiste en una serie de reacciones químicas interconectadas que comienzan con una molécula en particular y la transforman en otra u otras moléculas según un esquema bien definido (Figura 15.1). En la célula, existen muchas vías metabólicas bien definidas (Figura 15.2), de las cuales estudiaremos en detalle algunas más adelante. Estas vías son interdependientes y su actividad está co-

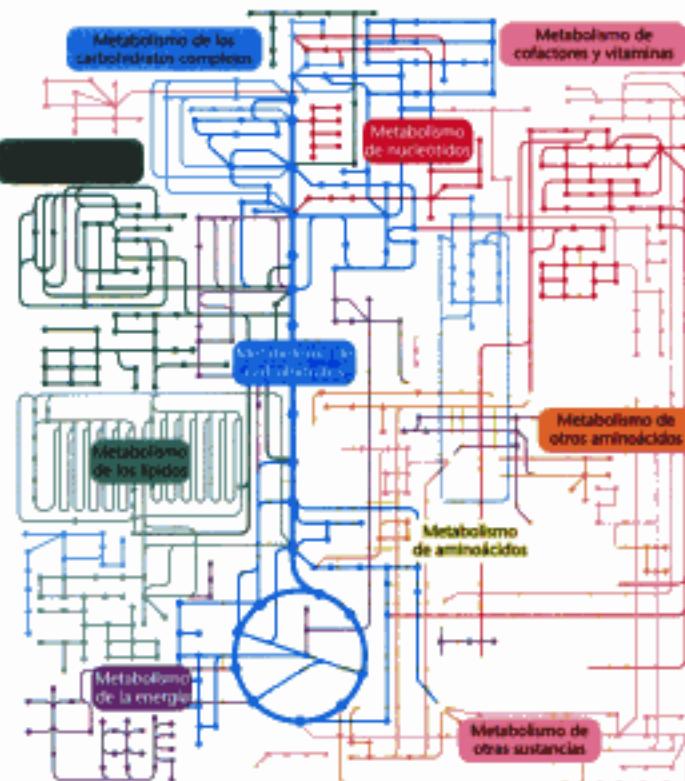
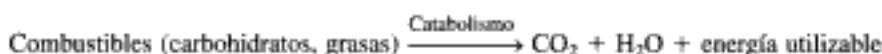


Figura 15.2 Vías metabólicas. [Tomado de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (www.genome.ad.jp/kegg/).]

ordinada mediante unas delicadas formas de comunicación, entre las cuales predominan los enzimas alostéricos (Sección 10.1). En el Capítulo 14 vimos las bases de esta comunicación.

Las vías metabólicas se pueden clasificar en dos grandes grupos: (1) aquellas que convierten la energía en formas biológicamente útiles y (2) aquellas que precisan de un aporte energético para su funcionamiento. Aunque a menudo esta clasificación es imprecisa, es útil para el estudio del metabolismo. Las reacciones que transforman combustibles en energía celular se denominan *reacciones catabólicas* o, con más frecuencia, *catabolismo*.



Aquellas reacciones que precisan energía, tales como las síntesis de glucosa, grasas, o DNA, se denominan *reacciones anabólicas* o *anabolismo*. Las formas utilizables de energía producidas en el catabolismo se utilizan en el anabolismo para generar estructuras complejas a partir de otras sencillas, o para lograr estados ricos en energía partiendo de otros pobres en energía.



En función de las condiciones energéticas de la célula, algunas vías pueden ser tanto anabólicas como catabólicas. A estas vías se les denomina *vías anfibólicas*.

Un principio general del metabolismo es que las vías biosintéticas y las degradativas son casi siempre distintas. Esta separación es necesaria por razones energéticas, como se verá en los capítulos siguientes. Eso también facilita el control del metabolismo.

Una reacción termodinámicamente favorable puede dirigir otra desfavorable

¿Cómo se agrupan las reacciones individuales para formar una vía específica? Una vía debe cumplir al menos dos criterios: (1) las reacciones individuales deben ser *específicas* y (2) el conjunto de las reacciones que forman la vía debe ser *termodinámicamente favorable*. En una reacción específica, a partir de los reactantes, sólo se genera un producto o un conjunto de productos concretos. Tal como se vio en el Capítulo 8, una de las funciones de los enzimas es aportar su especificidad. La termodinámica del metabolismo se puede expresar en forma de energía libre, ya estudiada en las páginas 11, 208 y 211. Una reacción puede tener lugar espontáneamente sólo si ΔG , el cambio de energía libre, es negativo. Recordemos que ΔG para la formación de los productos C y D, a partir de los sustratos A y B, viene dada por

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Así pues, la ΔG de una reacción depende de la *naturaleza* de los reactantes (expresada por el término $\Delta G^{\circ\prime}$, la variación de energía libre estándar) y de sus *concentraciones* (expresadas por el segundo término).

Un hecho termodinámicamente importante es que *el cambio de energía libre total para una serie de reacciones acopladas químicamente es igual a la suma de los cambios de energía libre de las etapas individuales*. Consideremos las reacciones siguientes:

$A \rightleftharpoons B + C$	$\Delta G^{\circ\prime} = +21 \text{ kJ mol}^{-1} (+5 \text{ kcal mol}^{-1})$
$B \rightleftharpoons D$	$\Delta G^{\circ\prime} = -34 \text{ kJ mol}^{-1} (-8 \text{ kcal mol}^{-1})$
$A \rightleftharpoons C + D$	$\Delta G^{\circ\prime} = -13 \text{ kJ mol}^{-1} (-3 \text{ kcal mol}^{-1})$

En condiciones estándar, A no puede convertirse espontáneamente en B y C puesto que ΔG es positiva. Sin embargo, la conversión de B en D, en condiciones estándar, es posible termodinámicamente. Como los cambios de energía libre son aditivos, la conversión de A hasta C y D tiene un ΔG° de -13 kJ mol^{-1} (-3 kcal mol^{-1}), lo que significa que puede producirse espontáneamente en condiciones estándar. Así pues, una reacción termodinámicamente favorable puede dirigir una termodinámicamente desfavorable acoplada a ella. En este ejemplo, las reacciones están acopladas mediante el intermediario químico común B. De este modo, las vías metabólicas están formadas por una serie de reacciones acopladas, catalizadas por enzimas, organizadas de tal modo que la energía libre total de la vía es negativa.

15.2 El ATP es la divisa universal de energía libre en los sistemas biológicos

Tal como la utilización de una moneda única facilita los intercambios comerciales, de un modo similar el comercio de la célula, el metabolismo, se facilita con la utilización de una divisa común de energía, la *adenosina trifosfato* (ATP). Parte de la energía libre obtenida en la oxidación de los alimentos y de la luz se transforma en esta muy accesible molécula, que actúa como dador de energía libre en la mayoría de los procesos que requieren energía, tales como el movimiento, el transporte activo, o la biosíntesis. De hecho, la mayor parte del catabolismo consiste en reacciones que extraen energía de los combustibles, tales como carbohidratos y grasas, para convertirla en ATP.

La hidrólisis del ATP es exergónica

El ATP es un nucleótido que consta de una adenina, una ribosa y un grupo trifosfato (Figura 15.3). La forma activa del ATP es normalmente un complejo de ATP con Mg^{2+} o Mn^{2+} (p. 268). Al considerar el papel del ATP como el de un transportador de energía, debemos fijarnos en su grupo trifosfato. *El ATP es una molécula rica en energía porque su componente trifosfato contiene dos enlaces anhídrido fosfórico.* Cuando el ATP se hidroliza hasta adenosina difosfato (ADP) y ortofosfato (P_i) o cuando se hidroliza hasta adenosina monofosfato (AMP) y pirofosfato (PP_i) se desprende una gran cantidad de energía libre.

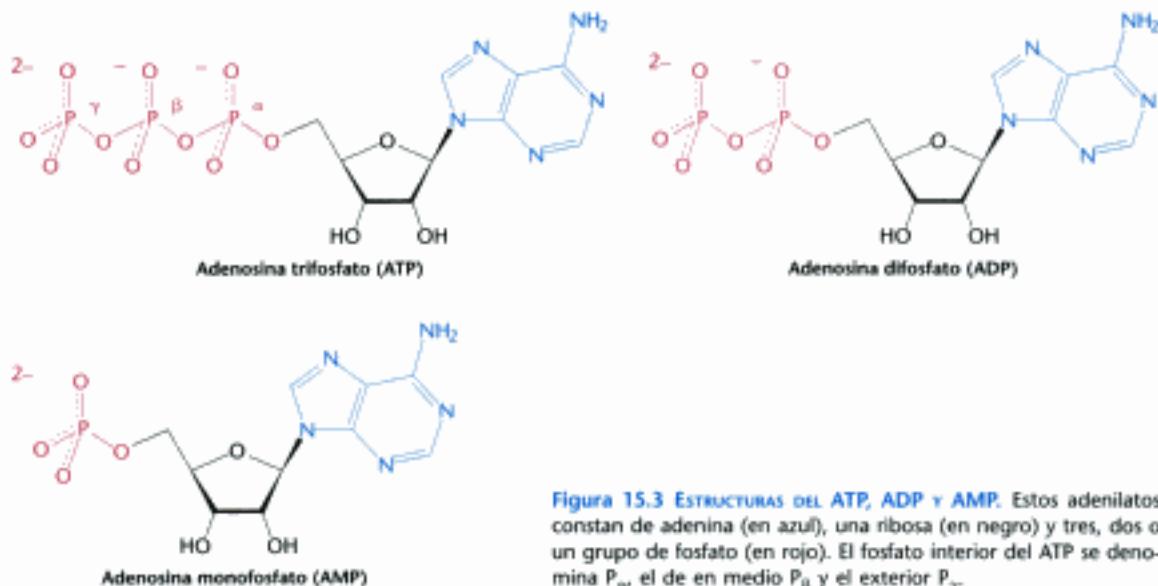


Figura 15.3 ESTRUCTURAS DEL ATP, ADP Y AMP. Estos adenilatos constan de adenina (en azul), una ribosa (en negro) y tres, dos o un grupo de fosfato (en rojo). El fosfato interior del ATP se denomina P_{α} , el de en medio P_{β} y el exterior P_{γ} .



El $\Delta G^{\circ r}$ para estas reacciones depende de la fuerza iónica del medio y de las concentraciones de Mg^{2+} y otros iones metálicos. En las condiciones celulares típicas, el valor real de ΔG de estas hidrólisis es aproximadamente -50 kJ mol^{-1} ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$).

La energía libre desprendida en la hidrólisis del ATP se utiliza para impulsar reacciones que requieren un aporte de energía libre, como son las de la contracción muscular. A su vez, se forma ATP a partir de ADP y P_i en los seres quimiotrofos cuando se oxidan las moléculas combustibles o en fototrofos cuando la atrapan de la luz. *Este ciclo ATP-ADP es la forma fundamental de intercambio de energía en los seres vivos.*

Algunas reacciones biosintéticas se hallan dirigidas por la hidrólisis de nucleótidos trifosfato que son análogos al ATP, es decir, la guanosina trifosfato (GTP), la uridina trifosfato (UTP) y la citidina trifosfato (CTP). Las formas difosfatadas de estos nucleótidos se designan GDP, UDP y CDP, respectivamente, y las formas monofosfato por GMP, UMP y CMP. Hay enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosforilo terminal de un nucleótido a otro. Las *nucleósido monofosfato quinasa* realizan la fosforilación de los nucleótidos monofosfato, tal como se estudió en la Sección 9.4. Un enzima muy específico, la *nucleósido difosfato quinasa* realiza la fosforilación de los nucleótidos difosfato.



Se debe resaltar que, aunque todos los nucleótidos trifosfato son equivalentes desde el punto de vista energético, el ATP es, sin lugar a dudas, el principal transportador energético de la célula. Además, los dos transportadores de electrones más importantes NAD^+ y FAD, son derivados del ATP. *El ATP desempeña un papel primordial en el metabolismo energético.*

La hidrólisis del ATP dirige el metabolismo desplazando el equilibrio de las reacciones acopladas

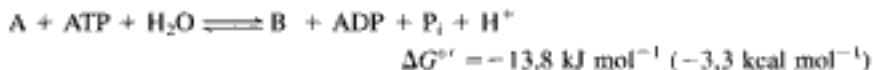
Una reacción termodinámicamente desfavorable puede resultar posible al acoplarse a la hidrólisis de ATP. Supongamos una reacción de estas características sin aporte de energía libre, una situación muy frecuente en las reacciones biosintéticas. Supongamos, también, que la energía libre para convertir el compuesto A en B es de $+16,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+4,0 \text{ kcal mol}^{-1}$):



La constante de equilibrio K'_{eq} para esta reacción a 25 °C, se relaciona con la $\Delta G^{\circ r}$ (en julios por mol) mediante:

$$K'_{eq} = [\text{B}]_{eq}/[\text{A}]_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ r}/5,69} = 1,15 \times 10^{-3}$$

Así pues, la conversión neta de A en B no puede ocurrir si la razón de las concentraciones molares entre B y A es igual o mayor de $1,15 \times 10^{-3}$. Sin embargo, en estas condiciones, A se puede transformar en B si la reacción se acopla a la hidrólisis de ATP. Bajo condiciones estándar, la ΔG° de la hidrólisis es aproximadamente $-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$). La nueva reacción completa sería:



La energía libre resultante $-13,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-3,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) es la suma de los valores de ΔG° para la conversión de A en B ($+16,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+4,0 \text{ kcal mol}^{-1}$)) y el valor de ΔG° para la hidrólisis del ATP ($-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$)). A pH 7, la constante de equilibrio de esta reacción acoplada es

$$K_{eq}^r = \frac{[\text{B}]_{eq}}{[\text{A}]_{eq}} \times \frac{[\text{ADP}]_{eq}[\text{P}_i]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}} = 10^{13,8-30,69} = 2,67 \times 10^2$$

En el equilibrio la razón entre [B] y [A] viene dada por

$$\frac{[\text{B}]_{eq}}{[\text{A}]_{eq}} = K_{eq}^r \frac{[\text{ATP}]_{eq}}{[\text{ADP}]_{eq}[\text{P}_i]_{eq}}$$

lo que significa que la hidrólisis de ATP hace posible que A se transforme en B hasta que la razón $[\text{B}]/[\text{A}]$ alcance un valor de $2,67 \times 10^2$. Esta relación en el equilibrio es significativamente distinta del valor de $1,15 \times 10^{-3}$ que presentaba la reacción $\text{A} \rightarrow \text{B}$ en ausencia de hidrólisis de ATP. En otras palabras, el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a la conversión de A en B en condiciones estándar ha variado las relaciones de equilibrio entre B y A en un factor del orden de 10^5 . Si utilizáramos la ΔG de hidrólisis de ATP en condiciones celulares -50 kJ mol^{-1} ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$) en nuestros cálculos en vez de ΔG° , el cambio de la relación de equilibrio aún sería más espectacular, del orden de 10^8 .

El ATP actúa desde el punto de vista termodinámico como un *agente acoplador de energía*. Las células mantienen un nivel de ATP elevado mediante la utilización de fuentes de energía libre como son la oxidación de sustratos o la luz para sintetizar esta molécula. En la célula, la hidrólisis de una molécula de ATP en una reacción acoplada modifica de forma significativa, del orden de 10^8 , la razón de equilibrio entre productos y reactantes. Más frecuentemente, la hidrólisis de n moléculas de ATP modifica la razón de equilibrio de una reacción acoplada (o de una secuencia de reacciones) en un factor de 10^{8n} . Así, por ejemplo, la hidrólisis de tres moléculas de ATP, en una reacción acoplada altera la razón de equilibrio en el orden de 10^{24} . Así pues, *una secuencia de reacciones termodinámicamente desfavorable se puede transformar en favorable mediante el acoplamiento con la hidrólisis de un número suficiente de moléculas de ATP*. Se debe resaltar que A y B, utilizados en el ejemplo anterior de reacciones acopladas, se deben interpretar en sentido amplio y no únicamente como si fueran compuestos químicos diferentes. Por ejemplo, A y B pueden representar las conformaciones activa e inactiva de una proteína; en este caso, la fosforilación con ATP puede ser el mecanismo para lograr una conformación activa. Mediante estas variaciones conformativas, los motores moleculares tales como la miosina, quinesina y dinefina transforman la energía química en energía mecánica (Capítulo 34). En efecto, esta transformación es la base de la contracción muscular.

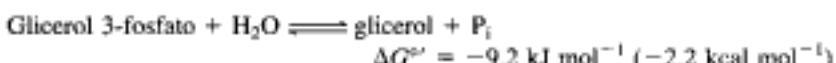
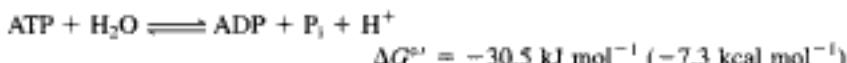
En otro supuesto, A y B pueden hacer referencia a las concentraciones de un ion o molécula en el exterior e interior de la célula, como en el caso del transporte activo de nutrientes. El transporte activo de Na^+ y K^+ a través de las membranas está dirigido por la fosforilación por ATP de la bomba de sodio-potasio y su subsiguiente desfosforilación (p. 357).

El elevado potencial de grupos fosforilo del ATP se debe a diferencias estructuradas entre el ATP y sus productos de hidrólisis

415

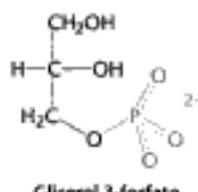
15.2 ATP: la divisa de energía libre

¿Qué confiere al ATP su especial eficacia como dador de grupos fosforilo? Vamos a comparar la energía libre estándar de la hidrólisis del ATP con la de otro enlace éster fosfato, como por ejemplo el glicerol 3-fosfato:



La magnitud de ΔG° para la hidrólisis del glicerol 3-fosfato es mucho menor que la del ATP, esto significa que el ATP tiene una tendencia más fuerte a transferir su grupo fosforilo terminal al agua que el glicerol 3-fosfato. En otras palabras, el ATP tiene un mayor potencial de transferencia de fosforilos (*potencial de transferencia de grupos fosforilo*) que el glicerol 3-fosfato. El elevado potencial de transferencia del ATP puede explicarse por características de estructura. Debido a que el ΔG° depende de la *diferencia* entre la energía libre de los productos y la de los reactantes debemos estudiar la estructura del ATP y la de sus productos de hidrólisis, ADP y P_i, para contestar la cuestión. A este respecto son importantes tres factores: la *estabilización por resonancia*, la *repulsión electrostática* y la *estabilización por hidratación*.

1. *Estabilización por resonancia* El ADP y, especialmente, el P_i tienen mayor estabilización por resonancia que el ATP. El ortofosfato presenta varias formas resonantes con energía similar (Figura 15.4), en tanto que el grupo γ -fosforilo del ATP presenta un número menor. Estructuras tales como la mostrada en la Figura 15.5 son desfavorables, ya que un átomo de oxígeno cargado positivamente se encuentra adyacente a un átomo de fósforo con carga positiva, una yuxtaposición electrostáticamente desfavorable.



Glicerol 3-fosfato

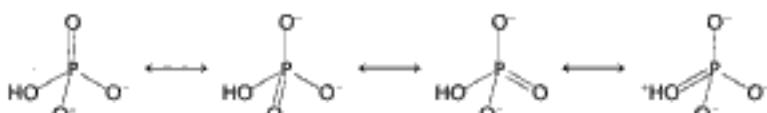


Figura 15.4 Estructuras de resonancia del ortofosfato.



Figura 15.5 Estructura de resonancia improbable. Esta estructura contribuye poco con la porción terminal del ATP, ya que se encuentran adyacentes dos cargas positivas.

2. *Repulsión electrostática*. A pH 7, la unidad trifosfato del ATP presenta cuatro cargas negativas. Estas cargas se repelen mutuamente al estar muy próximas. Al hidrolizarse el ATP la repulsión entre ellas se reduce.

3. *Estabilización debida a la hidratación*. Por último, el agua se puede unir más eficazmente al ADP y P_i que a la porción fosfoanhídrido del ATP, con lo cual el ADP y P_i se estabilizan por hidratación.

A menudo se hace referencia al ATP como compuesto de fosfato de alta energía y sus enlaces fosfoanhídridos se describen como enlaces de alta energía. En efecto, con frecuencia este enlace se representa por una "onda" (~P). Sin embargo, no existe nada especial en los enlaces por sí mismos. Son enlaces de alta energía en el sentido de que liberan gran cantidad de energía cuando se hidrolizan, conforme al razonamiento expuesto anteriormente, desde el apartado 1 hasta el 3.

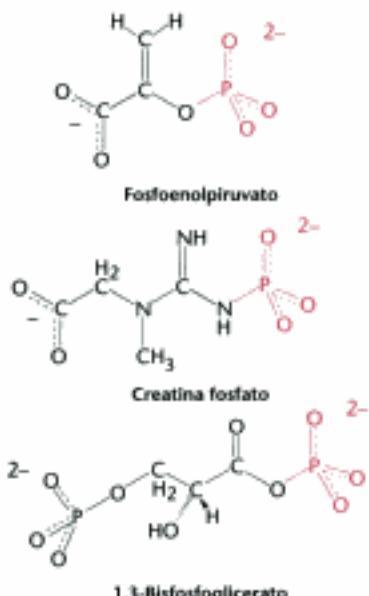


Figura 15.6 Compuestos con alto potencial de transferencia de fosforilos. Estos compuestos tienen un potencial de transferencia de fosforilos mayor que el ATP y se pueden utilizar para fosforilar el ADP y así formar ATP.

El potencial de transferencia de fosforilos es una forma importante en la transformación de la energía celular

Para comparar el potencial de transferencia de fosforilos de los compuestos fosforilados se utilizan las energías libres estándar de hidrólisis. Al realizar estas comparaciones se observa que el ATP no es el único compuesto con un alto potencial de transferencia de fosforilos. De hecho, algunos compuestos de los seres vivos poseen un potencial de transferencia mayor que el ATP. Algunos de estos compuestos son el fosfoenolpiruvato (PEP), 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) y la creatina fosfato (Figura 15.6). Así pues, el PEP puede transferir un grupo fosforilo al ADP para formar ATP. En efecto, esta es una de las formas de producir ATP durante la degradación de los azúcares (p. 436 y p. 444). Resulta significativo que el ATP tenga un potencial de transferencia de fosforilos que es intermedio entre el de las moléculas fosforiladas biológicamente importantes (Tabla 15.1). *Esta posición intermedia capacita al ATP para funcionar eficientemente como transportador de grupos fosforilo.*

La cantidad de ATP disponible en el músculo asegura su capacidad de contracción durante menos de un segundo. La creatina fosfato en el músculo de los vertebrados es un reservorio de grupos fosforilo de alta energía que pueden transferirse fácilmente al ATP. En efecto, cada vez que realizamos un ejercicio intenso utilizamos la creatina fosfato para regenerar el ATP a partir del ADP. El enzima *creatina quinasa* cataliza esta reacción.



A pH 7, la energía libre estándar de la hidrólisis de la creatina fosfato es $-43,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-10,3 \text{ kcal mol}^{-1}$), en comparación con los $-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) del ATP. Por consiguiente la variación de energía libre estándar correspondiente a la formación de ATP, a partir de creatina fosfato, es de $-12,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (-3 kcal mol^{-1}), lo que corresponde a una constante de equilibrio de 162.

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[\text{ATP}][\text{creatina}]}{[\text{ADP}][\text{creatina fosfato}]} = 10^{-\Delta G^\circ/(2,303RT)} = 10^{12,6/5,69} = 162$$

En el músculo en reposo, las concentraciones típicas de estos metabolitos son: $[\text{ATP}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{ADP}] = 0,013 \text{ mM}$, $[\text{creatina fosfato}] = 25 \text{ mM}$, y $[\text{creatina}] = 13 \text{ mM}$. La abundancia de creatina fosfato y su alto potencial de transferencia de fosforilos con respecto al ATP la convierten en un amortiguador muy eficaz de grupos fosforilo. En realidad, la creatina fosfato es la principal fuente de grupos fosforilo para regenerar el ATP que utiliza un corredor de 100 metros lisos durante los primeros 4 segundos de la carrera. El hecho de que la creatina fosfato puede reponer la reserva de ATP es la base de la utilización de creatina como suplemento dietético para los atletas en los deportes que requieren cortas explosiones de actividad intensa. Despues de vaciado el depósito de creatina fosfato, el ATP debe regenerarse mediante el metabolismo (Figura 15.7).

TABLA 15.1 Energías libres estándar de hidrólisis de algunos compuestos fosforilados

Compuesto	kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}
Fosfoenolpiruvato	-61,9	-14,8
1,3-Bisfosfoglicerato	-49,4	-11,8
Creatina fosfato	-43,1	-10,3
ATP (a ADP)	-30,5	-7,3
Glucosa 1-fosfato	-20,9	-5,0
Pirofosfato	-19,3	-4,6
Glucosa 6-fosfato	-13,8	-3,3
Glicerol 3-fosfato	-9,2	-2,2

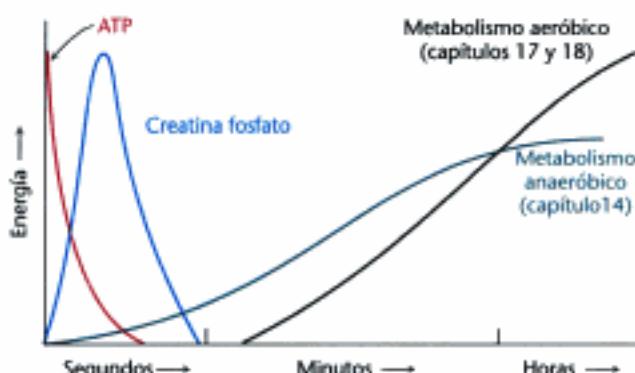


Figura 15.7 Fuentes de ATP durante el ejercicio. Durante los segundos iniciales, la fuente de energía para el ejercicio son los compuestos de alto potencial de transferencia existentes (ATP y creatina fosfato). Tras ello, el ATP debe ser regenerado mediante las vías metabólicas.

15.3 La oxidación de las moléculas carbonadas es una fuente importante de energía celular

En los sistemas biológicos, el ATP se utiliza como el principal *dador inmediato de energía libre*, no como una forma de almacenamiento a largo plazo de la energía libre. En una célula típica, cada molécula de ATP se consume dentro del minuto siguiente a su formación. Aunque la cantidad total de ATP en el organismo está limitada a unos 100 g, el *recambio de esta pequeña cantidad de ATP es muy elevado*. Por ejemplo, un ser humano en reposo consume unos 40 kg de ATP en 24 horas. Durante un ejercicio intenso, la tasa de utilización puede alcanzar los 0,5 kg/minuto. Durante una carrera de 2 horas, se utilizan unos 60 kg de ATP. Evidentemente, es vital disponer de mecanismos para regenerarlo. El movimiento, el transporte activo, la amplificación de señales y la biosíntesis solamente pueden producirse si el ATP se regenera continuamente a partir de ADP (Figura 15.8). Una de las principales funciones del catabolismo es la regeneración del ATP. El carbono de las moléculas combustibles, tales como la glucosa y las grasas, se oxida hasta CO₂, y la energía liberada se utiliza para regenerar el ATP a partir de ADP y P_i.

En los organismos aerobios, el acceptor final de electrones en la oxidación del carbono es el O₂ y el producto de la oxidación es el CO₂. En consecuencia, cuando más reducido se encuentre el carbono de partida tanto más exergónica será su oxidación. La Figura 15.9 muestra las ΔG°' para la oxidación de compuestos con un átomo de carbono.

Aunque las moléculas combustibles son más complejas (Figura 15.10) que las moléculas monocarbonadas representadas en la Figura 15.9, cuando se oxida un combustible, la oxidación tiene lugar carbono a carbono. La energía de oxidación del carbono se utiliza en ocasiones para generar un compuesto con alto potencial de transferencia de fosforilos y en otros casos para crear un gradiente de iones. En cualquiera de los casos, el objetivo final es la formación de ATP.

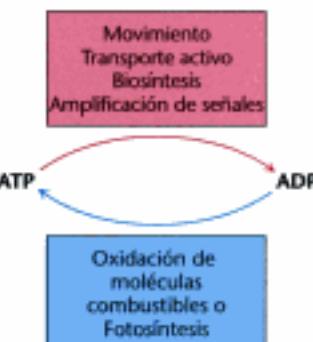


Figura 15.8 Ciclo ATP-ADP. Este ciclo es el modo fundamental de intercambio de energía en los seres vivos.

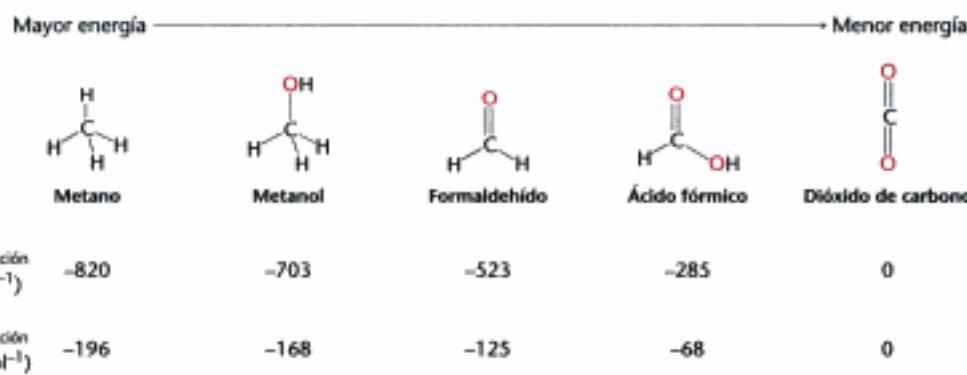
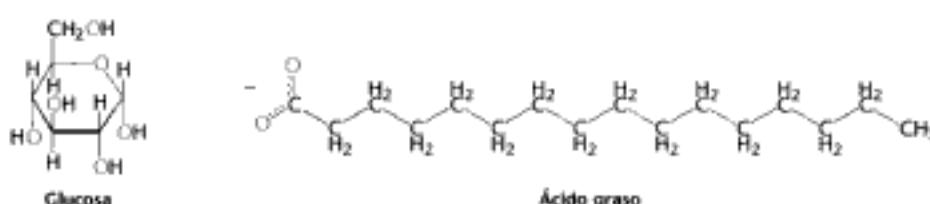


Figura 15.9 Energía libre de oxidación de compuestos monocarbonados.

Figura 15.10 Combustibles principales. Las grasas son mejores fuentes de energía que los carbohidratos, como la glucosa, ya que el carbono de las grasas está más reducido.

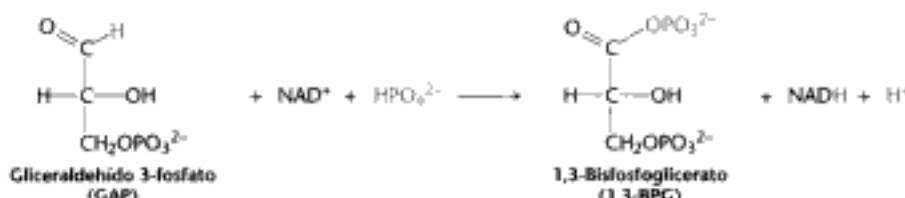


Los compuestos de alto potencial de transferencia de fosforilos pueden acoplar la oxidación del carbono con la síntesis de ATP

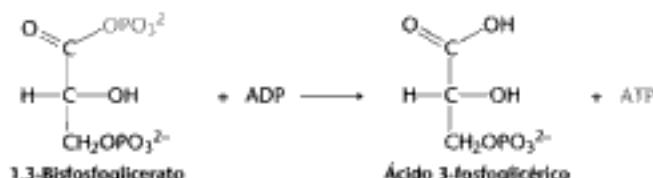
¿Qué parte de la energía liberada en la oxidación de un compuesto carbonado se convierte en ATP? Como ejemplo, consideremos el gliceraldehído 3-fosfato (mostrado al margen), que es un metabolito formado en la oxidación de la glucosa. El carbono C-1 (en rojo) forma parte de un aldehído y no se encuentra en su estado más oxidado. La oxidación de un aldehido hasta ácido liberará energía.



Sin embargo, la oxidación no tiene lugar de forma directa: la oxidación del carbono genera un acilfosfato: 1,3-bisfosfoglicerato. El NAD⁺ captura a los electrones liberados, lo que estudiaremos en breve.



Por motivos similares a los estudiados para el ATP, el 1,3-bisfosfoglicerato tiene un alto potencial de transferencia de fosforilos. Así pues, la hidrólisis de 1,3-BPG se puede acopiar a la síntesis de ATP.



La energía de oxidación es capturada inicialmente en este compuesto fosforilado de alta energía y posteriormente utilizada para formar ATP. La energía de oxidación de un átomo de carbono se transforma en potencial de transferencia de fosforilos, primero como 1,3-bisfosfoglicerato y finalmente como ATP. El mecanismo detallado de estas reacciones lo estudiaremos en detalle en la página 440.

Los gradientes de iones a través de membranas proporcionan una forma importante de energía celular que puede acoplarse con la síntesis de ATP

Tal como se ha descrito en el Capítulo 13, el potencial electroquímico es un medio eficaz de almacenamiento de energía libre. De hecho, el potencial electroquímico de

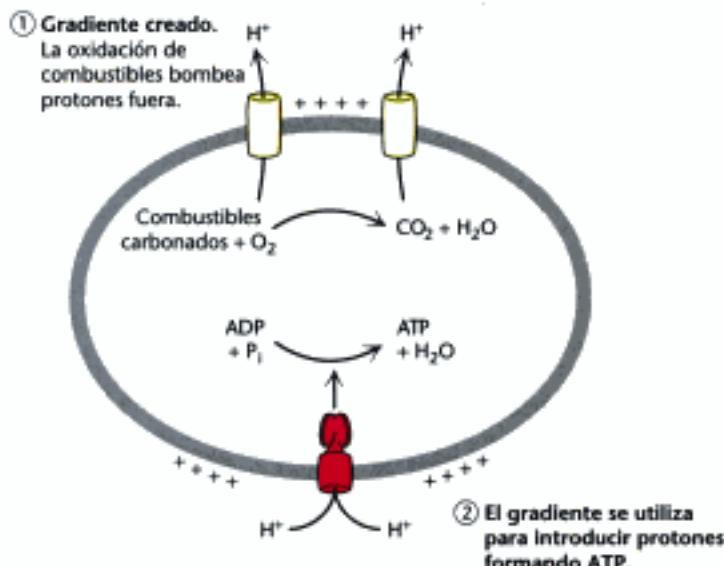


Figura 15.11 Gradientes de protones. La oxidación de los combustibles puede facilitar la formación de gradientes de protones por acción de bombas de protones específicas. A su vez, los gradientes de protones pueden dirigir la síntesis de ATP cuando los protones fluyen a través de un enzima sintetizador de ATP.

los *gradientes de iones a través de membrana*, producidos en la oxidación de las moléculas combustibles o en la fotosíntesis, potencia, en último, término, la mayor parte de la síntesis de ATP en las células. En general, los gradientes de iones son formas versátiles de acoplar reacciones termodinámicamente desfavorables con otras favorables. Así pues, en los animales, los *gradientes de protones* generados en la oxidación de los combustibles carbonados proporcionan más del 90% del ATP formado (Figura 15.11). Este proceso se denomina fosforilación oxidativa (Capítulo 18). La hidrólisis del ATP se puede utilizar para la formación de gradientes de iones de diversos tipos y funciones. El potencial electroquímico del gradiente de Na⁺ puede ser utilizado para bombear Ca²⁺ el exterior celular o para transportar nutrientes tales como los azúcares y aminoácidos al interior de la célula.

La energía de los alimentos se extrae en tres etapas

Comencemos por una visión de conjunto del proceso de la generación de energía en los organismos superiores, antes de considerar estas reacciones en detalle en los capítulos siguientes. Hans Krebs describió tres etapas en la generación de energía a partir de la oxidación de los alimentos (Figura 15.12).

En la primera etapa, las grandes moléculas de los alimentos se fragmentan hasta unidades más pequeñas. Este proceso es la digestión. Las proteínas se hidrolizan en sus 20 clases de aminoácidos constituyentes, los polisacáridos se hidrolizan hasta azúcares sencillos, como la glucosa, y las grasas se hidrolizan hasta glicerol y ácidos grasos. Esta etapa es estrictamente de preparación: no se genera energía útil.

En la segunda etapa, estas numerosas moléculas pequeñas se degradan hasta unas pocas unidades simples que desempeñan un papel central en el metabolismo. De hecho, la mayoría de ellas (azúcares, ácidos grasos, glicerol y varios aminoácidos) se convierten en el fragmento acetilo del acetil-CoA (p. 422). En esta etapa se genera algo de ATP, pero la cantidad es pequeña comparada con la que se obtiene en la tercera etapa.

En la tercera etapa, se produce ATP a partir de la oxidación completa del fragmento acetilo del acetil-CoA. La tercera etapa consta del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa, que son las vías finales comunes en la degradación de las moléculas combustibles. El acetil-CoA aporta fragmentos acetilo al ciclo del ácido cítrico [también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs], en donde se oxidan com-

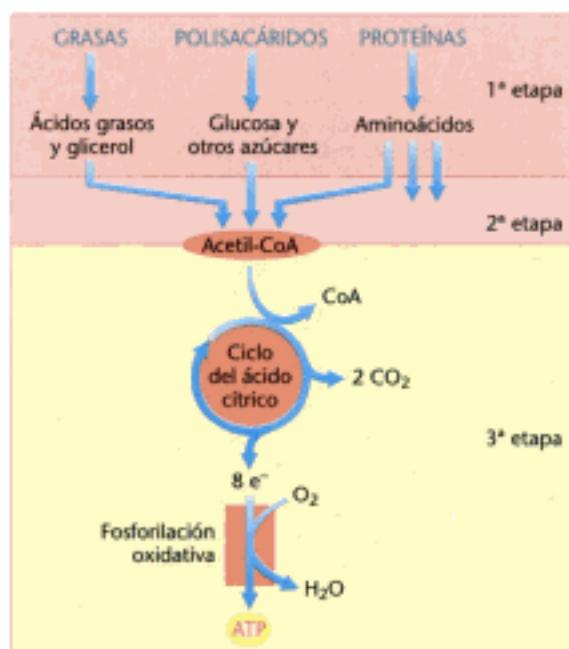


Figura 15.12 Etapas del catabolismo. La obtención de energía a partir de los combustibles se puede dividir en tres etapas.

pletamente hasta CO_2 . Por cada grupo acetilo que se oxida se transfieren cuatro pares de electrones (tres al NAD^+ y uno al FAD). De este modo, a medida que los electrones fluyen desde las formas reducidas de estos transportadores hasta el O_2 se genera un gradiente de protones, y este gradiente se utiliza para generar ATP.

15.4 Las vías metabólicas presentan muchos motivos recurrentes

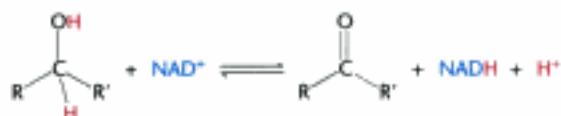
A primera vista, el metabolismo parece complejo y difícil, dado el elevado número de reactantes y reacciones que tienen lugar. Sin embargo, existen aspectos unificadores que hacen más asequible la comprensión de esta complejidad. Estos aspectos unificadores incluyen metabolitos, reacciones y esquemas de regulación comunes que parten de una herencia evolutiva común.

Los transportadores activados son un ejemplo del diseño modular y de la economía del metabolismo

Ya hemos visto como la transferencia de grupos fosforilo se puede utilizar para conducir reacciones endergónicas, alterar la conformación energética de una proteína, o ser una señal para alterar la actividad de una proteína. En todas estas reacciones, el dador de grupos fosforilo es el ATP. Dicho de otro modo, *el ATP es un transportador activado de grupos fosforilo ya que la transferencia de fosforilos desde el ATP es un proceso exergónico*. La utilización de transportadores activados es un aspecto recurrente en la bioquímica y aquí estudiaremos algunos de estos transportadores. Muchos de los transportadores activados actúan como coenzimas.

1. Transportadores activados de electrones en la oxidación de los combustibles. En los organismos aerobios, el acceptor último de electrones es la molécula de O_2 . Sin embargo, los electrones no se transfieren directamente al O_2 , sino que las moléculas combustibles transfieren electrones a transportadores especiales, tales como *nucleótidos de piridina o flavinas*. Las formas reducidas de estos transportadores transfieren entonces sus electrones de alto potencial al O_2 .

El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) es el acceptor principal de electrones en la oxidación de las moléculas combustibles (Figura 15.13). La parte reactiva del NAD^+ es su anillo de nicotinamida, un derivado de la piridina sintetizado a partir de la vitamina niacina. *Durante la oxidación de un sustrato, el anillo de nicotinamida del NAD^+ acepta un ion hidrógeno y dos electrones, lo que es equivalente a un ion hidruro (H^-)*. En la forma oxidada, el átomo de nitrógeno presenta carga positiva, tal como se indica por la notación NAD^+ . El NAD^+ es el acceptor de electrones en muchas reacciones del tipo



En esta deshidrogenación, un átomo de hidrógeno del sustrato se transfiere directamente al NAD^+ , mientras que el otro aparece en el disolvente, en forma de protón. Los dos electrones perdidos por el sustrato se transfieren al anillo de nicotinamida.

El otro transportador electrónico importante en la oxidación de los combustibles moleculares es el coenzima *flavina adenina dinucleótido* (Figura 15.14). Las notaciones abreviadas para las formas oxidada y reducida de este transportador son, respectivamente, FAD y FADH_2 . El FAD es el acceptor de electrones en reacciones del tipo

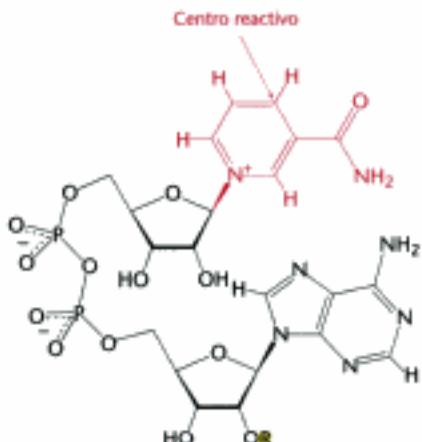


Figura 15.13 Estructuras de las formas oxidadas de los transportadores de electrones derivados de la nicotinamida. La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) son importantes transportadores de electrones de alta energía. En NAD^+ , $\text{R} = \text{H}$; en NADP^+ , $\text{R} = \text{PO}_3^{2-}$.

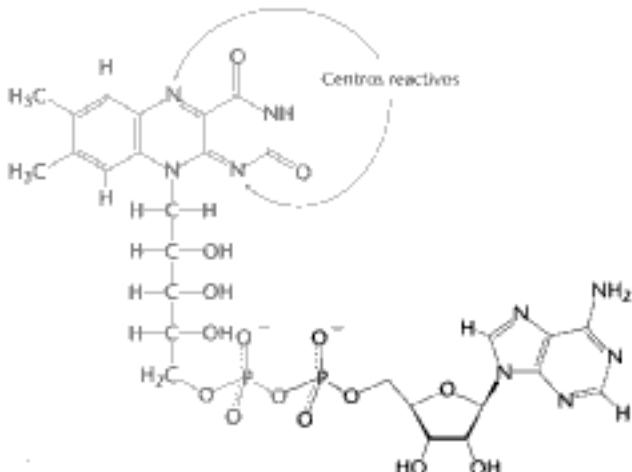


Figura 15.14 Estructura de la forma oxidada del flavina adenina dinucleótido (FAD). Este transportador de electrones está formado por una molécula de flavina mononucleótido (FMN) (en azul) y una molécula de AMP (en negro).

La parte reactiva del FAD es el anillo de isoaloxazina, un derivado de la vitamina riboflavina (Figura 15.15). El FAD, al igual que el NAD^+ , puede aceptar dos electrones. Al hacerlo, el FAD, a diferencia del NAD^+ , acepta dos protones. Estos transportadores de electrones de alto potencial, al igual que el flavina mononucleótido (FMN), un transportador de electrones relacionado con el FAD, serán estudiados posteriormente en el Capítulo 18.

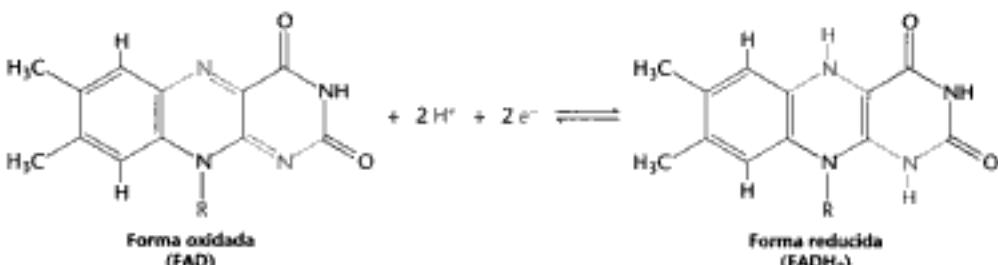
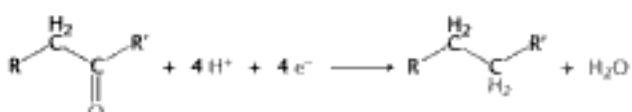


Figura 15.15 Estructuras de las partes reactivas del FAD y FADH₂. Los electrones y protones son transportados por el anillo de isoaloxazina constitutivo del FAD y FADH₂.

2. Transportadores activados de electrones para la biosíntesis reductora. En la mayoría de los procesos biosintéticos se necesitan electrones de alto potencial ya que los precursores están más oxidados que los productos. Por lo tanto, además de ATP se precisa poder reductor. Por ejemplo, en la biosíntesis de ácidos grasos, el grupo ceto de cada fragmento de dos carbonos añadido debe reducirse a un grupo metileno en varias etapas. Esta secuencia de reacciones precisa un aporte de cuatro electrones.



En la mayor parte de las biosíntesis reductoras, el dador de electrones es el NADPH, la forma reducida del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+ ; ver la Figura 15.13). El NADPH difiere del NADH en que el grupo 2'-hidroxilo de la adenosina está esterificado con un fosfato. El NADPH transporta electrones de la misma forma que el NADH. Sin embargo, *el NADPH se utiliza casi exclusivamente para las biosíntesis reductoras, mientras que el NADH se utiliza principalmente para la generación de ATP*. El grupo fosfato adicional del NADPH es una señal de identificación que permite a los enzimas diferenciar los electrones de alto potencial que serán utilizados en el anabolismo de los que se utilizarán en el catabolismo.

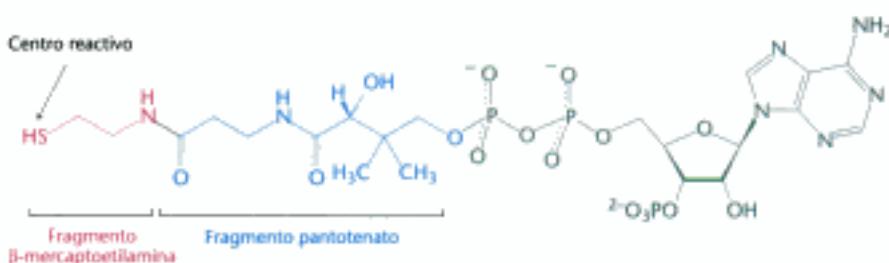
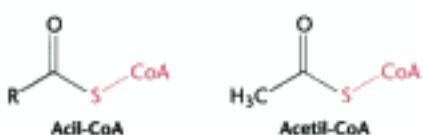


Figura 15.16 Estructura del coenzima A (CoA).



3. Transportador activado de fragmentos de dos carbonos. El coenzima A, otra molécula central del metabolismo, es un transportador de grupos acilo (Figura 15.16). Los grupos acilo son elementos importantes tanto en el catabolismo, por ejemplo, en la oxidación de los ácidos grasos, como en el anabolismo, por ejemplo, en la síntesis de los lípidos de membrana. El centro reactivo es el grupo sulfhidrilo terminal del CoA. Los grupos acilo se unen al CoA mediante un enlace tioéster. El derivado resultante se denomina *acil-CoA*. Un grupo acilo que se une a menudo al CoA es el acetilo; este derivado se llama *acetil-CoA*. El ΔG° para la hidrólisis del acetil-CoA tiene un valor negativo elevado:



$$\Delta G^\circ = -31.4 \text{ kJ mol}^{-1} (-7.5 \text{ kcal mol}^{-1})$$

La hidrólisis de un enlace tioéster es termodinámicamente más favorable que la de un éster de oxígeno, porque los electrones del enlace C=O no pueden formar estructuras resonantes estables con el enlace C–S que es estable, en tanto que éste sí las puede formar con el enlace C–O. En consecuencia, *el acetil-CoA tiene un alto potencial de acetilación (potencial de transferencia de grupos acetilo) ya que la transferencia de grupos acetilo es exergónica*. El acetil-CoA es un portador de un grupo acetilo activado, de la misma forma que el ATP posee un grupo fosforilo activado.

La utilización de transportadores activados ilustra dos aspectos clave del metabolismo. Primero, en ausencia de catalizador, el NADH, el NADPH y el FADH₂ reaccionan lentamente con el O₂. Del mismo modo, el ATP y el acetil-CoA se hidrolizan lentamente (periodos de muchas horas e incluso días) en ausencia de catalizador. Estas moléculas son cinéticamente bastante estables a la espera de una gran fuerza termodinámica que provoque su reacción con el O₂ (para los transportadores de electrones) o con el agua (en el caso del ATP y acetil-CoA). *La estabilidad cinética de estas moléculas en ausencia del catalizador específico es esencial para su función biológica, ya que permite a los enzimas controlar el flujo de energía libre y de poder reductor.*

Segundo, la mayoría de los intercambios metabólicos de grupos activados se realiza con un número limitado de transportadores (Tabla 15.2). La existencia de un númer

TABLA 15.2 Algunos transportadores activados del metabolismo

Molécula transportadora en la forma activa	Grupo transportado	Vitamina precursora
ATP	Fosforilo	
NADH y NADPH	Electrones	Nicotinato (niacina)
FADH ₂	Electrones	Riboflavina (vitamina B ₂)
FMNH ₂	Electrones	Riboflavina (vitamina B ₂)
Coenzima A	Acilos	Pantotenato
Lipoamida	Acilos	
Tiamina pirofosfato	Aldehídos	Tiamina (vitamina B ₁)
Biotina	CO ₂	Biotina
Tetrahidrofolato	Fragmentos de un carbono	Folato
S-Adenosilmetionina	Metilos	
Uridina difosfato glucosa	Glucosa	
Citidina difosfato diacilglicerol	Fosfatidato	
Nucleósido trifosfato	Nucleótidos	

Nota: Muchos de los transportadores activados son coenzimas derivados de las vitaminas hidrosolubles.

TABLA 15.3 Las vitaminas B

Vitamina	Coenzima	Tipo de reacción típica	Consecuencias de su deficiencia
Tiamina (B_1)	Tiamina	Transferencia de aldehído	Beríberi (pérdida de peso, problemas cardíacos y anomalías neurológicas)
Riboflavina (B_2)	Flavina adenina dinucleótido (FAD)	Oxidación-reducción	Quelosis y estomatitis angular (lesiones en la boca), dermatitis
Piridoxina (B_6)	Piridoxal fosfato	Transferencia de grupo hacia o desde aminoácidos	Depresión, confusión, convulsiones
Ácido nicotínico (niacina)	Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+)	Oxidación-reducción	Pelagra (dermatitis, depresión, diarrea)
Ácido pantoténico	Coenzima A	Transferencia de acilos	Hipertensión
Biotina	Aductos biotina-lisina (biocitina)	Carboxilación y transferencia de grupos carboxilo dependiente	Erupciones alrededor de las cejas, dolor muscular, fatiga (rara)
Ácido fólico	Tetrahidrofolato	Transferencia de fragmentos monocarbonados; síntesis de tiamina	Anemia, defectos en el tubo neural durante el desarrollo
B_{12}	5'-Desoxiadenosil-cobalamina	Transferencia de metilos, reordenamientos intramoleculares	Anemia, anemia perniciosa, acidosis metilmalónica

mero reducido de transportadores activados en todos los organismos es uno de los aspectos unificadores de la bioquímica. Este hecho evidencia el diseño modular del metabolismo. Un reducido conjunto de moléculas realiza una amplia variedad de funciones. El metabolismo puede ser fácilmente comprendido gracias a su brillante diseño basado en la economía.

Muchos de los transportadores activados son derivados de vitaminas

Casi todos los transportadores activados que actúan como coenzimas son derivados de *vitaminas*. Las vitaminas son moléculas orgánicas necesarias en pequeñas cantidades en la dieta de algunos animales superiores. La tabla 15.3 registra las vitaminas que actúan como coenzimas (Figura 15.17). Esta serie de vitaminas se conoce como grupo de las vitaminas B, o complejo B. Nótese que, en todos los casos, la vitamina debe modificarse antes de realizar su función. Ya hemos abordado los papeles de la niacina, riboflavina y pantoténato. Aún veremos estas tres y otras vitaminas B muchas veces en el estudio de la bioquímica.

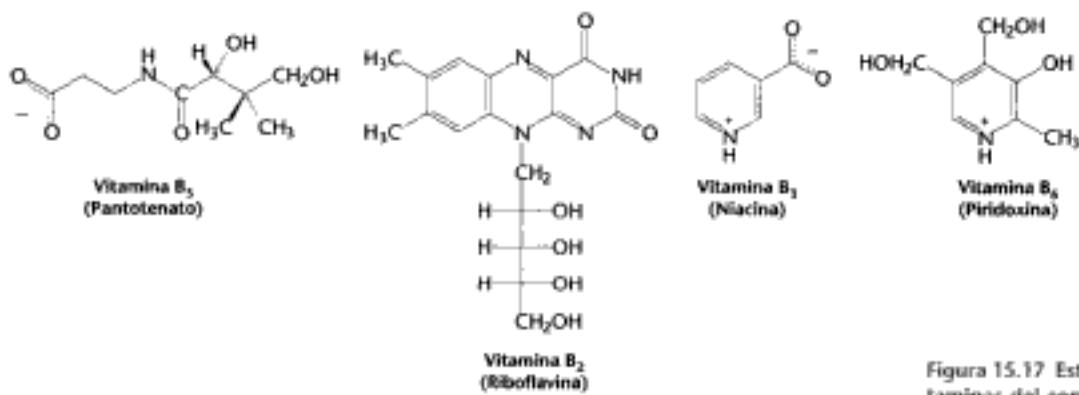


Figura 15.17 Estructuras de algunas de las vitaminas del complejo B.

Las vitaminas ejercen las mismas funciones en casi todas las seres vivos, pero los animales superiores, a lo largo de la evolución, han perdido la capacidad de sintetizarlas. Así, por ejemplo, mientras *E. coli* puede crecer con glucosa y sales orgánicas, el ser humano requiere al menos 12 vitaminas en su dieta. Las vías biosintéticas de las vitaminas pueden ser complejas, por consiguiente, es biológicamente

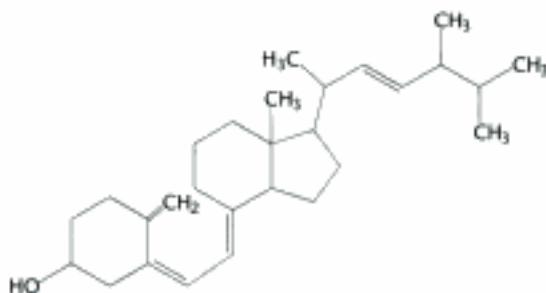
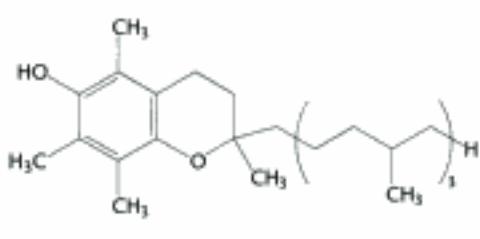
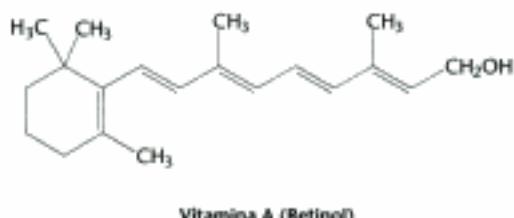
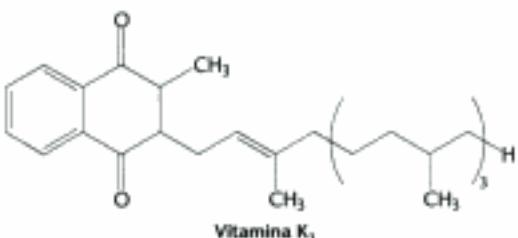


Figura 15.18 Estructura de algunas vitaminas que no actúan como coenzimas.

más efectivo ingerir las vitaminas que sintetizar los enzimas requeridos para construirlas a partir de moléculas más simples. Esta eficiencia arrastra la dependencia de otros organismos para obtener las sustancias químicas esenciales para la vida. De hecho, la deficiencia de vitaminas puede originar enfermedades en todos los organismos que las requieren (ver tablas 15.3 y 15.4).

No todas las vitaminas actúan como coenzimas. Las vitaminas designadas por las letras A, C, D, E y K (Figura 15.18 y Tabla 15.4) tienen un abanico variado de funciones. La vitamina A (retinol) es el precursor del retinal, el grupo sensible a la luz de la rodopsina y de otros pigmentos visuales (Sección 32.3) y el ácido retinoico es una molécula importante en la señalización. Una deficiencia de esta vitamina conduce a la ceguera nocturna. Además, los animales jóvenes necesitan vitamina A para crecer. La vitamina C, o ascorbato, actúa como antioxidante. Una deficiencia de vitamina C puede acarrear el escorbuto, una enfermedad debida al colágeno malformado y caracterizada por lesiones dermatológicas y fragilidad de los vasos sanguíneos (p. 778). Un metabolito de la vitamina D es una hormona que regula el metabolismo del calcio y el fósforo. Una deficiencia de vitamina D desequilibra la formación de hueso en los animales jóvenes. La deficiencia en vitamina E (α -toco-

TABLA 15.4 Vitaminas no coenzimas

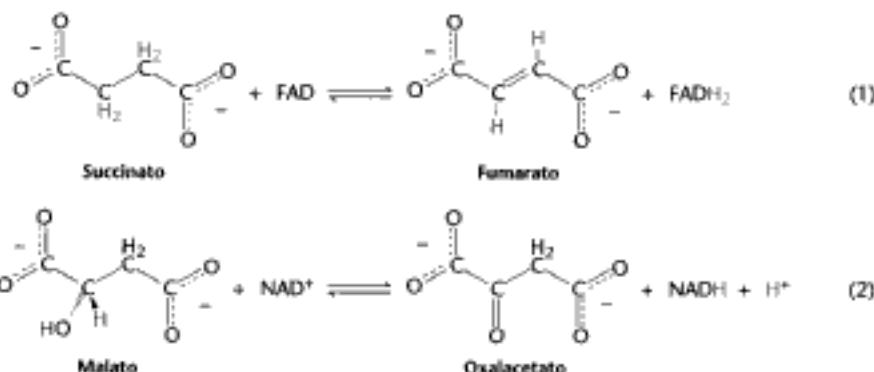
Vitamina	Función	Deficiencia
A	Papeles en la visión, crecimiento, reproducción	Ceguera nocturna, lesiones en la córnea, aparato respiratorio y tubo digestivo.
C (ácido ascórbico)	Antioxidante	Escorbuto (encías hinchadas y sangrantes, hemorragias subcutáneas).
D	Regulación del metabolismo del calcio y fosfato	Raquitismo (en niños) deformidades esqueléticas, crecimiento alterado, Osteomalacia (en adultos). Huesos curvados y flexibles.
E	Antioxidante	Inhibición de la producción de esperma, lesiones musculares y nerviosas (raras).
K	Coagulación sanguínea	Hemorragias subcutáneas.

ferol) produce infertilidad en ratas. Esta vitamina reacciona con las especies reactivas del oxígeno, tales como los radicales hidroxilo, y las inactiva antes de que puedan oxidar los lípidos insaturados de las membranas, dañando las estructuras de las células. La vitamina K es necesaria para la coagulación normal de la sangre (p. 295).

Las reacciones clave se repiten a lo largo del metabolismo

Al igual que existe una economía en el diseño de la utilización de los transportadores activados, también existe una economía en el diseño de las reacciones bioquímicas. Los miles de reacciones metabólicas, que a primera vista desconciertan por su variedad, se pueden clasificar en sólo seis tipos (Tabla 15.5). De cada tipo aparecen repetitivamente reacciones específicas, lo cual reduce el número de reacciones que debe conocer el estudiante.

1. Las *reacciones de oxidación-reducción* son componentes fundamentales de muchas vías. Con frecuencia, se obtiene energía utilizable de las reacciones de oxidación de los compuestos carbonados. Consideremos las dos reacciones siguientes:

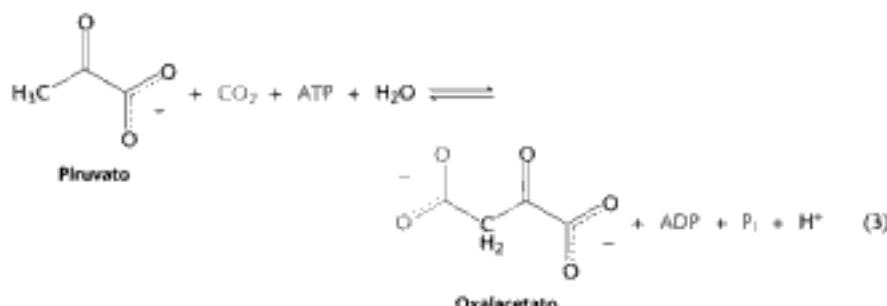


Estas dos reacciones de oxidación-reducción forman parte del ciclo del ácido cítrico (Capítulo 17), donde se oxida completamente el fragmento activado de dos carbonos del acetil-CoA hasta dos moléculas de CO₂. En la reacción 1, el FADH₂ transporta los electrones, en tanto que, en la reacción 2, los electrones son transportados por el NADH.

2. Las reacciones para la formación de enlaces utilizan con frecuencia la energía libre obtenida con la hidrólisis del ATP. La reacción 3 sirve de ejemplo para la formación de un enlace carbono-carbono dependiente de ATP; este tipo de reacción se utiliza para obtener moléculas grandes a partir de otras menores. El oxalacetato se forma a partir de piruvato y CO₂.

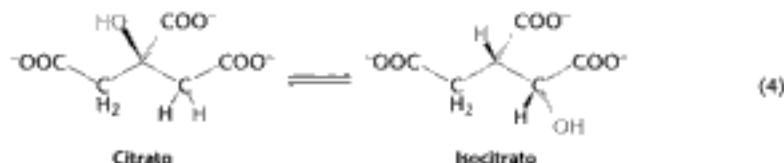
TABLA 15.5 Tipos de reacciones químicas del metabolismo

Tipo de reacción	Descripción
Oxidación-reducción	Transferencia de electrones
Formación de enlaces que precisan hidrólisis de ATP	Formación de enlaces covalentes (p. ej., enlaces carbono-carbono)
Isomerización	Reorganización de los átomos para formar isómeros
Transferencia de grupos	Transferencia de grupos funcionales de una molécula a otra
Hidrólisis	Ruptura de enlaces por adición de agua
Adición o eliminación de grupos funcionales	Adición de grupos funcionales a dobles enlaces o eliminación de los grupos para formar dobles enlaces



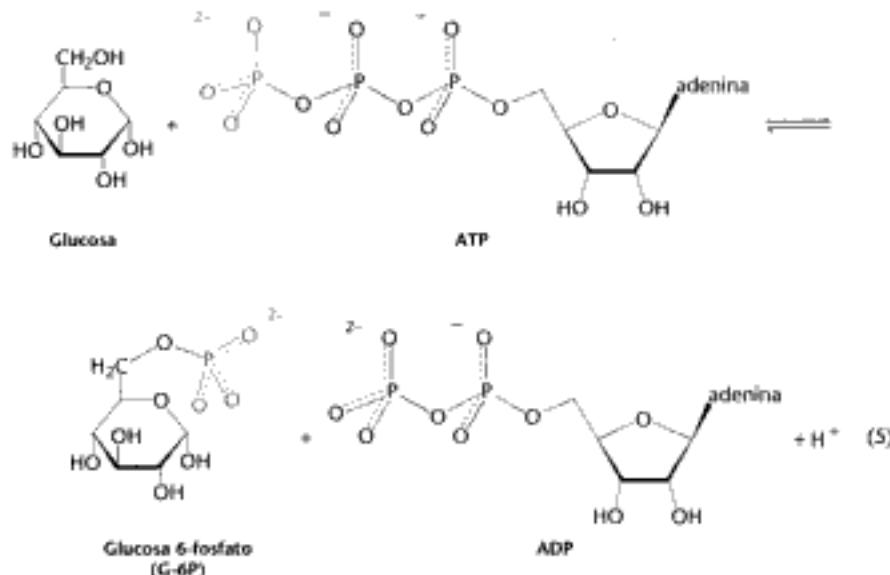
El oxalacetato se puede utilizar en el ciclo del ácido cítrico o ser convertido en aminoácidos, tales como el aspartato.

3. Las *reacciones de isomerización* reorganizan algunos átomos dentro de la molécula. Estas isomerizaciones preparan a la molécula para reacciones posteriores, tales como las de oxidación-reducción descritas en el apartado 1.



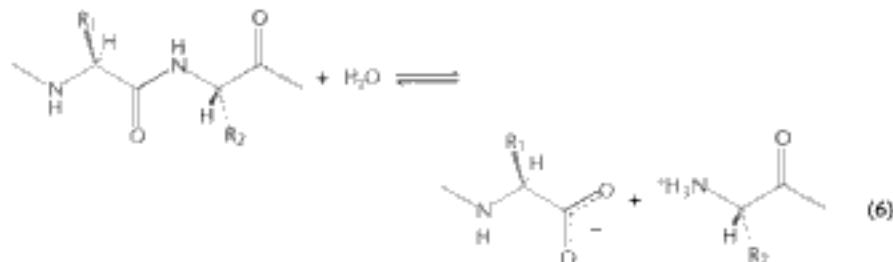
La reacción 4 es, también, integrante del ciclo del ácido cítrico. Esta isomerización prepara la molécula para una oxidación y descarboxilación posteriores mediante el desplazamiento del grupo hidroxilo del citrato desde un carbono terciario hacia otro secundario.

4. Las *reacciones de transferencia de grupos* desempeñan papeles diversos. La reacción 5 muestra una reacción de este tipo. Se transfiere un grupo fosforilo desde el transportador activado de grupos fosforilo, ATP, a la glucosa. Esta es la etapa inicial de la glicolisis, una vía clave para extraer energía de la glucosa (Capítulo 16). Esta reacción retiene la glucosa dentro de la célula de modo que pueda ser catabolizada posteriormente.

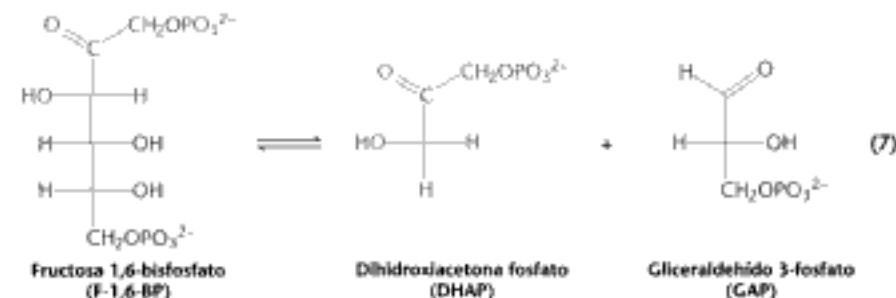


Anteriormente vimos como las reacciones de transferencia de grupos se utilizan para sintetizar ATP (p. 418). También vimos ejemplos de su uso en las vías de señalización (Capítulo 14).

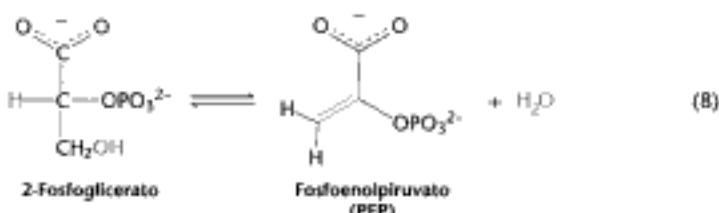
5. *Las reacciones de hidrólisis* rompen enlaces añadiendo agua. La hidrólisis es una forma habitual para fragmentar moléculas grandes, tanto para facilitar su posterior metabolismo como para reutilizar algunos de sus componentes con fines biosintéticos. La digestión de las proteínas se realiza mediante hidrólisis (Capítulos 9 y 10). La reacción 6 es un ejemplo de la hidrólisis de un péptido para dar dos péptidos más pequeños.



6. El último tipo comprende las *reacciones de adición de grupos funcionales a un doble enlace o las de eliminación de grupos para formar dobles enlaces*. Los enzimas que catalizan estas reacciones se clasifican como tiasas. La reacción 7 muestra un ejemplo importante, la conversión de una molécula de seis carbonos, la fructosa 1,6-bisfosfato, en dos fragmentos de tres carbonos: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato.



Esta reacción es un paso clave en la glicolisis (Capítulo 16). Las deshidrataciones para formar dobles enlaces, tales como la formación del fosfoenolpiruvato (ver Tabla 15.1) a partir del 2-fosfoglicerato (reacción 8), son reacciones importantes de este tipo.



La reacción de deshidratación prepara la reacción siguiente de la vía, una reacción de transferencia de grupos que utiliza el alto potencial de transferencia de grupos fosforilo del producto PEP para formar ATP a partir de ADP.

Estos seis tipos de reacciones fundamentales son la base del metabolismo. Se debe recordar que cualquiera de los seis tipos de reacciones puede tener lugar en ambos sentidos, dependiendo de la energía libre estándar de la reacción y de la concentración en la célula de los reactantes y productos. En la Figura 15.17 se muestra un ejemplo de cómo estas simples reacciones son repetitivas. La misma secuencia de reacciones se utiliza en el ciclo del ácido cítrico, en la degradación de los ácidos grasos, en la degradación del aminoácido lisina, y (en sentido inverso) en la biosíntesis de los ácidos grasos. Para estudiar las diversas vías metabólicas, un buen método es buscar los aspectos comunes. Existe una lógica química que, cuando se muestra, hace más manejable la complejidad de la química de los seres vivos y manifiesta su brillante diseño.

Los procesos metabólicos se regulan de tres formas principales

Resulta evidente que la compleja red de reacciones que constituye el metabolismo intermedio debe estar rigurosamente regulada. Además, el control metabólico debe ser flexible, para ajustar la actividad metabólica al entorno celular en cambio constante. El metabolismo se regula mediante el control de (1) *la cantidad de cada enzima*, (2) *su actividad catalítica*, y (3) *la accesibilidad de los sustratos*.

Control de la cantidad de enzimas. La cantidad de un enzima concreto depende tanto de su velocidad de síntesis como de la velocidad con que se degrada. En la mayoría de los enzimas su nivel se controla, en primera instancia, mediante cambios en la *velocidad de transcripción* de los genes que los codifican (Capítulos 29 y 31). En *E. coli*, la presencia de lactosa, por ejemplo, provoca un aumento en más de 50 veces de la velocidad de síntesis de β -galactosidasa, un enzima necesario para la degradación de este disacárido.

Control de la actividad catalítica. La actividad catalítica de los enzimas se controla de varias formas. Es especialmente importante el *control alostérico reversible*. Por ejemplo, la primera reacción en muchas vías metabólicas está inhibida alostéricamente por el último producto de la vía. La inhibición del enzima aspartato transcarbamila por la citidina trifosfato (Sección 10.1) es un ejemplo muy conocido de *retroinhibición*. Este tipo de control es prácticamente instantáneo. Otro mecanismo frecuente es la *modificación covalente reversible*. Por ejemplo, la glucógeno fosforilasa, el enzima que cataliza la degradación del glucógeno, una forma de almacenamiento de azúcares, se activa por la fosforilación de un determinado residuo de serina cuando la glucosa comienza a escasear (p. 559).

Las *hormonas coordinan las relaciones metabólicas* entre diferentes tejidos; con frecuencia regulan modificaciones reversibles de enzimas clave. Por ejemplo, la adrenalina desencadena una cascada de transducción de señales en el músculo que origina la fosforilación y activación de enzimas clave, lo que conduce a una rápida degradación del glucógeno a glucosa, la cual se utiliza para producir ATP para la contracción muscular (p. 601). Tal como vimos en el Capítulo 14, muchas hormonas pueden actuar mediante mensajeros intracelulares, como el AMP cíclico y el ion calcio, que coordinan la actividad de muchas proteínas diana.

En el metabolismo, muchas reacciones están controladas por el *estado energético* de la célula. Un indicador del estado energético es la *carga energética*, la cual es proporcional a la fracción molar del ATP más la mitad de la fracción molar de ADP, ya que el ATP contiene dos enlaces anhídrido, mientras que el ADP sólo contiene uno. Por tanto, la carga energética se define como

$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

La carga energética puede tener un valor que oscila entre 0 (todo AMP) y 1 (todo ATP). Daniel Atkinson ha demostrado que las *vías generadoras de ATP (vías catabólicas)* son inhibidas por una carga energética alta, mientras que las que utilizan ATP (*vías anabólicas*) son estimuladas por la misma. En las representaciones de las velocidades de reacción de tales vías frente a la carga energética, las curvas son más pronunciadas en las proximidades de una carga energética de 0,9, en donde se entrecruzan normalmente (Figura 15.19). Es evidente que el control de estas vías está diseñado para el mantenimiento de la carga energética entre límites muy estrechos. En otras palabras, la carga energética, al igual que el pH de una célula, está amortiguada. La carga energética de la mayoría de las células está comprendida en el intervalo de 0,80 a 0,95. Otro indicador alternativo del estado energético es el potencial de fosforilación, que se define como

$$\text{Potencial de fosforilación} = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}] [\text{P}_i]}$$

El potencial de fosforilación, a diferencia de la carga energética, depende de la concentración de P_i y está relacionado directamente con la energía libre disponible en forma de ATP.

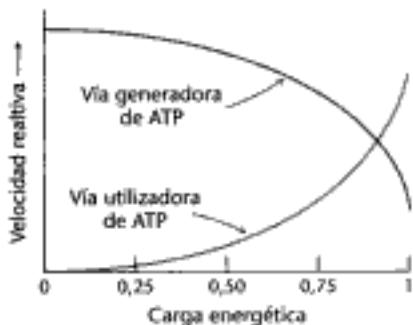


Figura 15.19 La carga energética regula el metabolismo. Altas concentraciones de ATP inhiben las velocidades relativas de una vía típicamente generadora (catabólica) y estimulan las vías típicamente utilizadoras (anabólicas).

Control de la accesibilidad de los sustratos. En los eucariotas, la regulación metabólica y la flexibilidad mejoran por la compartimentación. Por ejemplo, la oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en la mitocondria mientras que su síntesis tiene lugar en el citoplasma. *La compartimentación separa las reacciones opuestas.*

El control del flujo de los sustratos es otro medio para la regulación del metabolismo. La degradación de la glucosa en muchas células sólo tiene lugar si está presente la insulina porque promueve la entrada de la glucosa en la célula. La transferencia de sustratos de un compartimiento celular a otro (por ejemplo, del citoplasma a la mitocondria) puede servir como punto de control.

Hay aspectos del metabolismo que pueden haber evolucionado a partir del mundo del RNA

¿Cómo evolucionaron las complejas vías que constituyen el metabolismo? La corriente de pensamiento actual afirma que el RNA fue una de las primeras biomoléculas y que, en un mundo primitivo de RNA, las moléculas de RNA desempeñaban el papel de catalizadores y almacenores de información.

¿Por qué transportadores activados, como el ATP, NADH, FADH₂ o coenzima A, contienen unidades de adenosina difosfato (Figura 15.20)? Una posible explicación puede ser que estas moléculas evolucionaron a partir de un catalizador RNA primitivo. Otras unidades no-RNA, como el anillo de isoaloxazina, pudieron incorporarse como transportadores eficientes de electrones activados y fragmentos químicos, una función no realizada por el RNA. Podemos imaginar el anillo de adenina del FADH₂ uniéndose a un grupo uracilo en un nicho de RNA enzimático (ribozima) mediante emparejamiento de bases, mientras que el anillo de isoaloxazina sobresale y sirve de transportador de electrones. Cuando las proteínas, más versátiles, desplazaron al RNA como catalizadores principales, los coenzimas ribonucleotídicos permanecieron inalterables porque ya estaban muy bien adaptados a sus funciones metabólicas. El fragmento nicotinamida del NADH, por ejemplo, puede transferir fácilmente electrones, tanto si el componente adenina interacciona con una base de RNA enzimático, como si interacciona con aminoácidos de la proteína enzimática. Con el desarrollo de las proteínas enzimáticas, estos cofactores importantes evolucionaron hacia moléculas libres sin perder el fragmento adenosina difosfato de su antepasado en el mundo de RNA. El hecho de que las moléculas y las pautas del metabolismo sean comunes a todos los seres vivos testifica a favor de su origen común y de la retención de módulos de funcionamiento a lo largo de miles de millones de años de evolución. Nuestra comprensión del metabolismo, al igual que la de otros procesos biológicos, se enriquece con la búsqueda del modo en que pudieron haber llegado a constituirse estos mecanismos de reacción tan bellamente integrados.

Resumen

Todas las células transforman energía. Extraen la energía de su entorno y la utilizan para convertir moléculas sencillas en componentes celulares.

15.1 El metabolismo está constituido por muchas reacciones acopladas e interconectadas

El proceso de transducción de energía tiene lugar en el metabolismo, una red altamente integrada de reacciones químicas. El metabolismo se puede dividir en catabolismo (reacciones utilizadas para extraer la energía de los combustibles) y anabolismo (reacciones que utilizan esta energía para la biosíntesis). Para entender la bioenergética, el concepto más importante es el de energía libre. Una reacción puede ocurrir de forma espontánea sólo si la variación de energía libre (ΔG) es negativa. Una reacción termodinámicamente favorable puede dirigir otra termodinámicamente desfavorable; siendo la reacción favorable en muchos casos la hidrólisis de ATP.

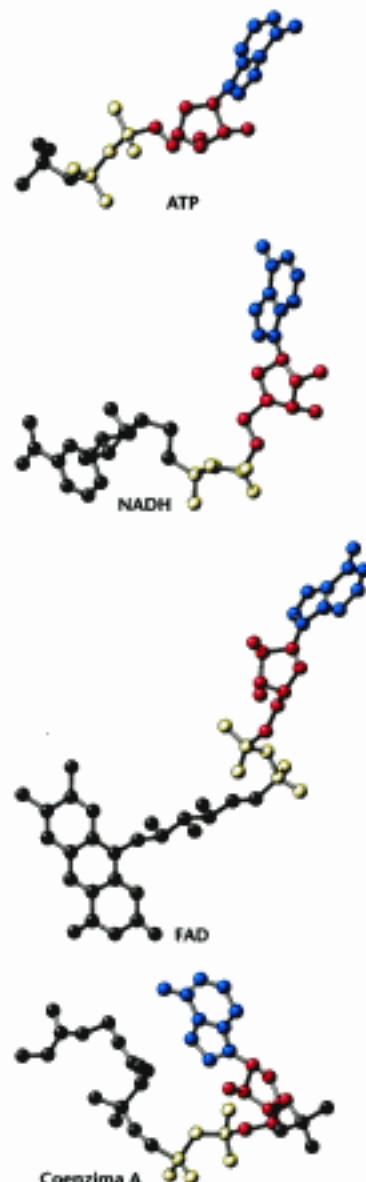


Figura 15.20 La adenosina difosfato (ADP) es una pieza muy antigua del metabolismo. Este componente tan importante aparece en moléculas clave como ATP, NADH, FAD y coenzima A. La adenina se muestra en azul, la ribosa en rojo, y la unidad difosfato en amarillo.

15.2 El ATP es la divisa universal de energía libre en los sistemas biológicos

La energía derivada del metabolismo se transforma en adenosina trifosfato. La hidrólisis del ATP es exergónica y la energía liberada puede utilizarse para potenciar procesos celulares, incluyendo movimiento, transporte activo y biosíntesis. Bajo las condiciones celulares, la hidrólisis del ATP desplaza el equilibrio de una reacción acoplada por un factor de 10^8 . El ATP, la divisa universal de energía de los seres vivos, es una molécula rica en energía porque contiene dos enlaces fosfoanhídrido.

15.3 La oxidación de las moléculas carbonadas es una fuente importante de energía celular

La formación de ATP está ligada a la oxidación de los combustibles carbonados, bien sea directamente o a través de la generación de gradientes de iones. Los organismos fotosintetizadores pueden utilizar la energía luminosa para formar estos gradientes. El ATP se consume en la contracción muscular y en otros movimientos celulares, en el transporte activo, en los procesos de transducción de señales y en la biosíntesis. En los organismos aerobios existen tres etapas para la extracción de la energía a partir de los alimentos. En la primera etapa, las moléculas grandes son fragmentadas en otras más pequeñas, tales como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos. En la segunda, estas moléculas pequeñas se degradan hasta unos pocos fragmentos sencillos que tienen un papel importante en el metabolismo. Uno de ellos es el fragmento acetilo del acetil-CoA, un transportador de grupos acetilo activados. La tercera etapa del metabolismo, es el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa, donde se genera ATP a medida que los electrones fluyen hacia el O_2 , el acceptor final de electrones, y los combustibles son completamente oxidados hasta CO_2 .

15.4 Las vías metabólicas presentan muchos aspectos recurrentes

El metabolismo se caracteriza por presentar aspectos comunes. En la mayoría de las vías metabólicas se utiliza un número reducido de transportadores activados, como ATP, NADH y acetil-CoA. El NADPH, que transporta dos electrones de alto potencial, proporciona el poder reductor necesario para la biosíntesis de los componentes celulares a partir de precursores más oxidados. Muchos transportadores activados derivan de vitaminas, unas moléculas orgánicas pequeñas requeridas en la dieta de muchos organismos superiores. Además, los tipos de reacciones clave se utilizan repetidamente en las vías metabólicas.

El metabolismo se regula de diversas formas. Las concentraciones de algunos enzimas críticos se controlan regulando su velocidad de síntesis y degradación. Además, la actividad catalítica de muchos enzimas se regula mediante interacciones alóstéricas (como en el caso de la retroinhibición) y también por modificaciones covalentes. También se controla el desplazamiento de muchos sustratos en el interior celular y entre los compartimentos subcelulares. La diferenciación entre las vías biosintéticas y degradativas contribuye a la regulación metabólica. La carga energética, que depende de las concentraciones relativas de ATP, ADP y AMP, desempeña un papel importante en la regulación. Una carga energética elevada inhibe las vías de síntesis de ATP (catabolismo), en tanto que estimula las vías que consumen ATP (anabolismo).

Términos clave

metabolismo o metabolismo intermediario (p. 409)
fototrofo (p. 410)
quimiotorfo (p. 410)
catabolismo (p. 411)
anabolismo (p. 411)
vía anfibólica (p. 411)
adenosina trifosfato (ATP) (p. 412)

potencial de transferencia de fosforilos (p. 415)
fosforilación oxidativa (p. 419)
transportador activado (p. 420)
vitamina (p. 423)
reacción de oxidación-reducción (p. 425)
reacción de formación de enlaces (p. 425)
reacción de isomerización (p. 426)

reacción de transferencia de grupos (p. 426)
reacción de hidrólisis (p. 427)
reacción de adición a dobles enlaces o de formación de dobles enlaces (p. 427)
lisisa (p. 427)
carga energética (p. 428)
potencial de fosforilación (p. 428)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, Y. M. y Hanson, R. W., 1992. Metabolic control of gene expression: In vivo studies with transgenic mice. *Trends Biochem. Sci.* 17:40-44.
 Westheimer, F. H. 1987. Why nature chose phosphates. *Science* 235:1173-1178.

Libros

- Harold, F. M., 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W. H. Freeman and Company.
 Krebs, H. A. y Komberg, H. L., 1957. *Energy Transformations in Living Matter*. Springer Verlag.
 Linder, M. C. (Ed.), 1991. *Nutritional Biochemistry and Metabolism* (2d ed.). Elsevier.
 Gottschalk, G., 1986. *Bacterial Metabolism* (2d ed.). Springer Verlag.
 Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J., 1997. *Bioenergetics 2* (2d ed.). Academic Press.
 Martin, B. R., 1987. *Metabolic Regulation: A Molecular Approach*. Blackwell Scientific.
 Prynn, K. N., 1996. *Metabolic Regulation: A Human Perspective*. Portland Press.
 Fell, D., 1997. *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press.
 Harris, D. A., 1995. *Bioenergetics at a Glance*. Blackwell Scientific.
 Von Baeyer, H. C. 1999. *Warmth Disperses and Time Passes: A History of Heat*. Modern Library.
 Edsall, J. T. y Guttmann, H. 1983. *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*. Wiley.
 Klotz, I. M. 1967. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. Academic Press.
 Hill, T. L. 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press.
 Atkinson, D. E. 1977. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. Academic Press.

Termodinámica

- Alberty, R. A., 1993. Levels of thermodynamic treatment of biochemical reaction systems. *Bioophys. J.* 65:1243-1254.
 Alberty, R. A. y Goldberg, R. N., 1992. Standard thermodynamic formation properties for the adenosine 5'-triphosphate series. *Biochemistry* 31:10610-10615.
 Alberty, R. A., 1968. Effect of pH and metal ion concentration on the equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate. *J. Biol. Chem.* 243:1337-1343.

Goldberg, R. N., 1984. *Compiled Thermodynamic Data Sources for Aqueous and Biochemical Systems: An Annotated Bibliography (1930-1983)*. National Bureau of Standards Special Publication 685, U.S. Government Printing Office.

Frey, P. A. y Arabshahi, A., 1995. Standard free energy change for the hydrolysis of the α , β -phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* 34:11307-11310.

Bioenergética y metabolismo

- Schilling, C. H., Letscher, D. y Palsson, B. O., 2000. Theory for the systematic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.* 203:229-248.
 DeCoursey, T. E. y Cherny, V. V., 2000. Common themes and problems of bioenergetics and voltage-gated proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:104-119.
 Giersch, C., 2000. Mathematical modelling of metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:249-253.
 Rees, D. C. y Howard, J. B., 1999. Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* 293:343-350.

Regulación del metabolismo

- Kemp, G. J., 2000. Studying metabolic regulation in human muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 28:100-103.
 Towle, H. C., Kaytor, E. N. y Shah, H. M., 1996. Metabolic regulation of hepatic gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 24:364-368.
 Hofmeyr, J. H., 1995. Metabolic regulation: A control analytic perspective. *J. Bioengng. Biomed.* 27:479-490.
 Erecińska, M. y Wilson, D. F., 1978. Homeostatic regulation of cellular energy metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 3:219-223.

Aspectos históricos

- Kalckar, H. M., 1991. 50 years of biological research: From oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 60:1-37.
 Kalckar, H. M. (Ed.), 1969. *Biological Phosphorylations*. Prentice Hall.
 Fruton, J. S., 1972. *Molecules and Life*. Wiley-Interscience.
 Lipmann, F., 1971. *Wanderings of a Biochemist*. Wiley-Interscience.

Problemas

1. *Flujo de energía*. ¿Cuál es el sentido de cada una de las reacciones siguientes cuando todas las sustancias reaccionantes están presentes inicialmente en cantidades equimolares? Utilizar los datos de la Tabla 15.1

- ATP + creatina \rightleftharpoons creatina fosfato + ADP
- ATP + glicerol \rightleftharpoons glicerol 3-fosfato + ADP
- ATP + piruvato \rightleftharpoons fosfoenolpiruvato + ADP
- ATP + glucosa \rightleftharpoons glucosa 6-fosfato + ADP

2. *Suposición correcta*. ¿Qué información suministran los datos del ΔG° que se dan en la Tabla 15.1 acerca de las velocidades relativas de hidrólisis del pirofosfato y del acetilfosfato?

3. *Un dador potente*. Considerar la reacción



- (a) Calcular ΔG° y K_{eq} a 25 °C de esta reacción utilizando los datos de la Tabla 15.1

- (b) ¿Cuál es la relación de equilibrio entre el piruvato y el fosfoenolpiruvato, si la relación de ATP a ADP es 10?

4. *Equilibrio isomérico*. Calcular ΔG° para la isomerización de la glucosa 6-fosfato hasta glucosa 1-fosfato. ¿Cuál es la relación de equilibrio entre ambos compuestos a 25 °C?

5. *Acetato activado*. La formación de acetil-CoA a partir de acetato es una reacción que requiere ATP.



- (a) Calcular ΔG° de esta reacción, utilizando los datos suministrados en este capítulo.

- (b) El PP_i formado en la reacción anterior se hidroliza rápidamente in vivo a causa de la omnipresencia de la pirofosfatasa. El ΔG° para la hidrólisis del PP_i es $-19.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$). Cal-

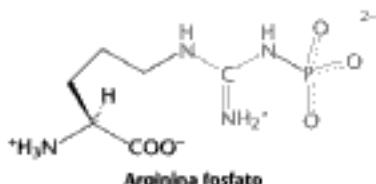
cular ΔG° para la reacción global. ¿Qué efecto tiene la hidrólisis del PPi sobre la formación del acetil-CoA?

6. *Fuerza ácida.* El pK de un ácido es una medida de su potencial de transferencia de grupos protónicos.

(a) Establecer una relación entre ΔG° y pK .

(b) ¿Cuál es el ΔG° para la ionización del ácido acético si su pK es de 4,8?

7. *Razón de ser.* Los músculos de algunos invertebrados son ricos en arginina fosfato (fosfoarginina). Proponer una función para este compuesto derivado de un aminoácido. ¿Cómo comprobaría el lector su hipótesis?

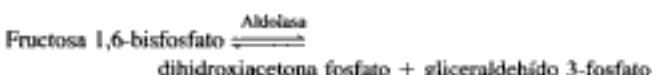


8. *Analogías recurrentes.* ¿Cuál es la característica estructural común entre ATP, FAD, NAD⁺ y CoA?

9. *Ayuda ergogénica o impedimento?* La creatina es un suplemento dietético popular, pero no está experimentado.

(a) ¿Cuál es la razón bioquímica para la utilización de la creatina?
 (b) ¿Qué tipo de ejercicio sería más beneficiado al tomar un suplemento de creatina?

10. *Condiciones estándar frente a vida real 1.* La aldolasa cataliza la siguiente reacción en la glicolisis:



El ΔG° para esta reacción es de $123,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($15,7 \text{ kcal mol}^{-1}$), mientras que el ΔG en la célula es $-1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$). Calcular la relación entre reactantes y productos en el equilibrio y en condiciones intracelulares. Utilizando los resultados obtenidos, explicar ¿cómo puede ser la reacción endergónica en condiciones estándar y exergónica en condiciones intracelulares?

11. *Condiciones estándar frente a vida real 2.* En la pág. 413 representamos la reacción A \rightleftharpoons B, con un $\Delta G^\circ = +1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$) que tiene una K_{eq} de $1,15 \times 10^{-3}$. La K_{eq} aumenta hasta $2,67 \times 10^2$, si la reacción se acopla a la hidrólisis de ATP, en condiciones estándar. El sistema generador de ATP de las células mantiene la razón $[ATP]/[ADP][Pi]$ a un nivel elevado, típicamente del orden de 500 M^{-1} . Calcular la relación B/A en las condiciones celulares.

12. *No siempre es lo mismo.* Las concentraciones de ATP, ADP y Pi difieren según el tipo de célula. Consecuentemente, la liberación de energía libre para la hidrólisis del ATP será diferente según el tipo de célula. Utilizando los datos de la tabla siguiente, calcular el ΔG para la hidrólisis del ATP en las células de músculo, hígado y cerebro. ¿En qué tipo de célula será más negativa?

	ATP (mM)	ADP (mM)	Pi (mM)
Hígado	3,5	1,8	5,0
Músculo	8,0	0,9	8,0
Cerebro	2,6	0,7	2,7

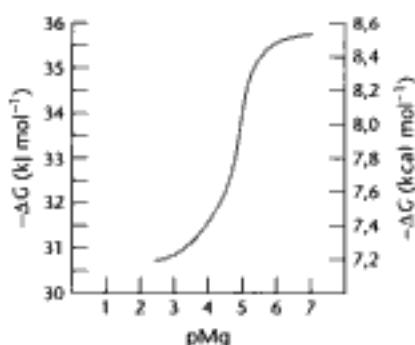
13. *Carrera cuesta abajo.* La glicolisis consta de un conjunto de 10 reacciones consecutivas que convierten una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato con una producción asociada de dos moléculas de ATP (Capítulo 16). El ΔG° para el conjunto de estas reacciones es de $-35,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$), mientras que el ΔG es de $-76,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-18,3 \text{ kcal mol}^{-1}$). Explicar por qué en condiciones intracelulares la energía libre liberada es mucho mayor que la liberada en condiciones estándar.

Problema de integración del capítulo

14. *Sulfato activado.* El fibrinógeno contiene tirosina-O-sulfato. Proponer una forma activada de sulfato que pueda reaccionar *in vivo* con el grupo hidroxilo aromático de un residuo de tirosina de una proteína, para formar tirosina-O-sulfato

Problema de interpretación de datos

15. *Los opuestos se atraen.* El gráfico siguiente muestra cómo el ΔG para la hidrólisis de ATP varía en función de la concentración de Mg²⁺ (pMg = $-\log [Mg^{2+}]$).



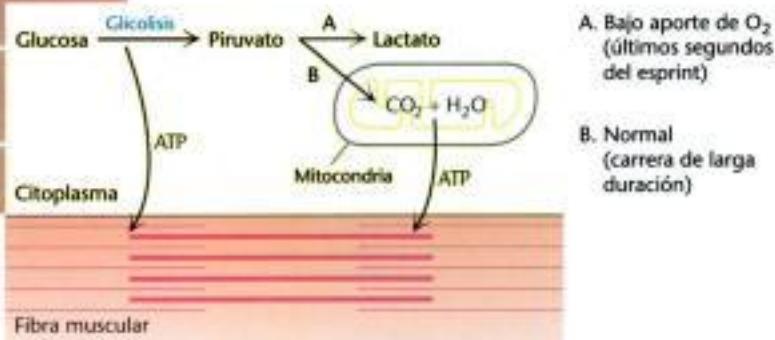
(a) ¿Cómo afecta el descenso de [Mg²⁺] al ΔG para la hidrólisis de ATP?

(b) ¿Cómo se puede explicar este efecto?

Glicolisis y gluconeogénesis



Michael Johnson esprinta hacia otra victoria en la semifinal de los 200 metros en los Juegos Olímpicos. El metabolismo de la glucosa puede generar el ATP necesario para la contracción muscular. Durante el esprint, cuando las necesidades de ATP sobrepasan el aporte de oxígeno, la glucosa se metaboliza a lactato (A). Cuando el aporte de oxígeno es el adecuado, la glucosa se metaboliza con más eficiencia a dióxido de carbono y agua (B). [(Izquierda) Simon Bruty/Allsport.]



La primera vía metabólica con la que nos encontramos es la *glicolisis*, una antigua vía utilizada por una gran cantidad de organismos. La glicolisis es la secuencia de reacciones que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato con la producción neta concomitante de dos moléculas de ATP. Este proceso es anaeróbico (es decir, no requiere O₂) puesto que evolucionó antes de la acumulación de cantidades considerables de oxígeno en la atmósfera. El piruvato se puede convertir posteriormente de forma anaeróbica en lactato (*fermentación láctica*) o etanol (*fermentación alcohólica*). En condiciones aeróbicas, el piruvato puede oxidarse completamente a CO₂, generando mucho más ATP, como se verá en los Capítulos 17 y 18. La Figura 16.1 muestra los destinos posibles del piruvato producido en la glicolisis.

Al ser la glucosa un combustible valioso, ciertos productos metabólicos, tales como el piruvato o el lactato, pueden recuperarse para sintetizar glucosa en el proceso de *gluconeogénesis*. Aunque la glicolisis y la gluconeogénesis tienen en común algunos enzimas, las dos vías no son sencillamente una la inversa de la otra. En particular, los pasos altamente exergónicos e irreversibles de la glicolisis se evitan en la gluconeogénesis. Las dos vías están estrechamente controladas por señales intercelulares e intracelulares, y están reguladas recíprocamente de forma que ni la glicolisis ni la gluconeogénesis se dan simultáneamente en la misma célula de forma significativa.

Nuestro conocimiento del metabolismo de la glucosa, especialmente de la glicolisis, tiene una larga historia. De hecho, el desarrollo de la bioquímica y el tra-

Contenido

- 16.1 En muchos organismos la glicolisis es una vía de conversión de energía
- 16.2 La vía glicolítica está rigurosamente controlada
- 16.3 La glucosa puede sintetizarse a partir de precursores no carbohidratados
- 16.4 La gluconeogénesis y la glicolisis se regulan de forma recíproca

Glicolisis

Derivado del término griego *glyk-*, "dulce", y de la palabra *lysis*, "disolución".

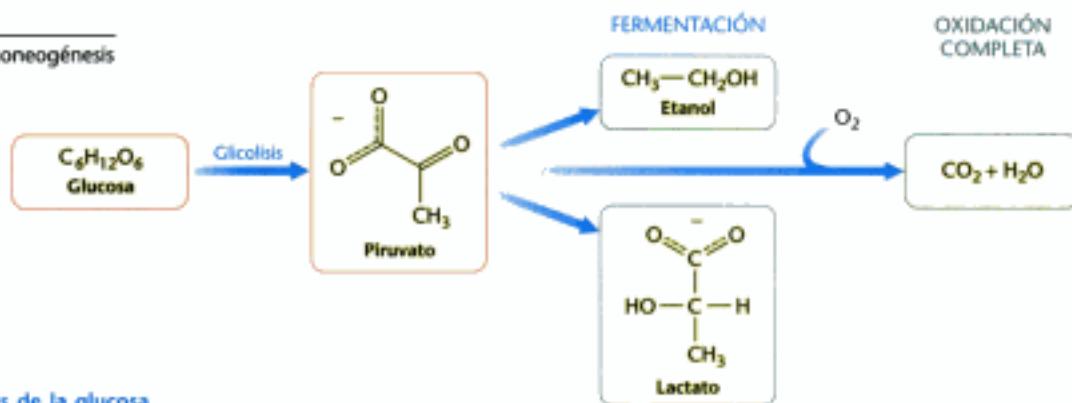


Figura 16.1 Algunos destinos de la glucosa.

zado de la glicolisis han ido de la mano. Hans Buchner y Eduard Buchner hicieron en 1897 un descubrimiento clave, totalmente por accidente. Los Buchner estaban interesados en comercializar extractos de levadura libres de células para un posible uso terapéutico. Estos extractos debían preservarse sin utilizar antisépticos como el fenol, así que decidieron probar con sacarosa, un conservante utilizado comúnmente en la química culinaria. Obtuvieron un resultado asombroso: la sacarosa se fermentó rápidamente hasta alcohol en el jugo de levadura. El significado de este descubrimiento fue inmenso. *Los Buchner demostraron por primera vez que la fermentación podía tener lugar fuera de las células vivas*. El punto de vista aceptado en aquel tiempo, establecido por Louis Pasteur en 1860, era que la fermentación estaba inseparablemente ligada a las células vivas. El descubrimiento casual de los Buchner refutó este dogma vitalista y abrió la puerta a la bioquímica moderna. *El estudio del metabolismo se convirtió en un estudio de la química*.

Enzima

Término acuñado en 1878 por Friedrich Wilhelm Kühne para designar las sustancias catalíticamente activas, a las que previamente se había llamado fermentos. Derivado de las palabras griegas *en*, "en", y *zyme*, "levadura".

Los estudios de extractos musculares demostraron más tarde que muchas de las reacciones de la fermentación láctica eran las mismas que las de la fermentación alcohólica. *Este descubrimiento sensacional reveló la unidad subyacente en la bioquímica*. La vía glicolítica completa fue aclarada en 1940, en gran parte debido a las aportaciones pioneras de Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Otto Warburg, Gerty Cori y Carl Cori. A la glicolisis también se la conoce como *vía de Embden-Meyerhof*.

La glucosa se genera a partir de los carbohidratos de la dieta

Normalmente consumimos en la dieta cantidades generosas de almidón y una pequeña porción de glucógeno. Estos carbohidratos complejos deben convertirse en otros más sencillos para absorberse en el intestino y transportarse por la sangre. El almidón y el glucógeno se digieren por el enzima α -amilasa pancreática y, en menor cuantía, por la α -amilasa salival. La amilasa corta los enlaces α -1,4 del almidón y glucógeno pero no escinde los enlaces α -1,6. Los productos de la hidrólisis son los di y trisacáridos maltosa y maltotriosa. El material no digerible debido a los enlaces α -1,6 se llama *dextrina límite*.

La *maltasa* rompe la maltosa en dos moléculas de glucosa, mientras que la α -glucosidasa digiere la maltotriosa y cualquier otro oligosacárido que pueda haber escapado de la digestión por la α -amilasa. La α -dextrinasa digiere finalmente a la dextrina límite. La maltasa y la α -dextrinasa están localizadas en la superficie de las células intestinales, así como la *sacarasa*, un enzima que degrada la sacarosa que aportan los vegetales, hasta fructosa y glucosa. El enzima *lactasa* es responsable de degradar el azúcar de la leche, la lactosa, hasta glucosa y galactosa. Los monosacáridos se transportan al interior de las células que recubren el intestino y de allí a la sangre.

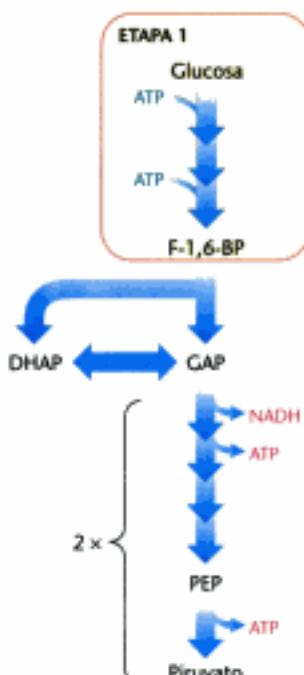
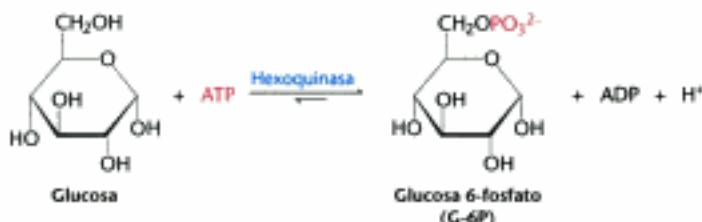
 La glucosa es un combustible habitual e importante. En mamíferos, la glucosa es el único combustible que utiliza el cerebro en condiciones de nutrición correcta y el único combustible que utilizan siempre los glóbulos rojos. De hecho, casi todos los organismos utilizan glucosa, y la mayoría la procesa de forma similar. Recordemos del Capítulo 11 que existen muchos carbohidratos. ¿Por qué es la glucosa un combustible destacado en lugar de cualquier otro monosacárido? Especulemos sobre las razones. En primer lugar, la glucosa es uno de los monosacáridos que se forma en condiciones prebióticas a partir de formaldehído, así que podría haber estado accesible como fuente de combustible en los sistemas bioquímicos primitivos. En segundo lugar, la glucosa tiene una pequeña tendencia, comparándola con otros monosacáridos, a glicosilar proteínas de modo no enzimático. En su forma de cadena abierta (carbonílica), los monosacáridos pueden reaccionar con el grupo amino de las proteínas para formar bases de Schiff, las cuales se reordenan para formar un enlace más estable amino-cetona. Tales proteínas modificadas no específicamente con frecuencia no funcionan con eficacia. La glucosa tiene una fuerte tendencia a presentarse en forma de anillo y, como consecuencia, una menor tendencia relativa a modificar proteínas. Recordemos que todos los grupos hidroxilo de la conformación cerrada de la β -glucosa son ecuatoriales, contribuyendo a esta elevada estabilidad relativa (p. 308).

16.1 En muchos organismos la glicolisis es una vía de conversión de energía

Empezamos ahora a estudiar la vía glicolítica. Esta vía es común prácticamente a todas las células, tanto procariotas como eucariotas. En las células eucariotas, la glicolisis tiene lugar en el citoplasma. Se puede considerar que esta vía comprende tres etapas (Figura 16.2). La etapa 1, que es la conversión de la glucosa en fructosa 1,6-bisfosfato, consta de tres pasos: una fosforilación, una isomerización y una segunda reacción de fosforilación. *La estrategia de estos pasos iniciales de la glicolisis es atrapar la glucosa dentro de la célula y formar un compuesto que pueda escindirse fácilmente en unidades fosforiladas de tres carbonos.* La etapa 2 es la ruptura de la fructosa 1,6-bisfosfato en dos fragmentos de tres carbonos. Estas unidades resultantes de tres carbonos son fácilmente interconvertibles. En la etapa 3, se genera ATP neto cuando los fragmentos de tres carbonos se oxidan a piruvato.

La hexoquinasa retiene la glucosa en la célula y comienza la glicolisis

La glucosa entra en las células por medio de proteínas transportadoras específicas (p. 456) y tiene un destino principal: fosforilarse mediante el ATP y formar glucosa 6-fosfato. Este paso es notorio por dos razones: (1) la glucosa 6-fosfato no puede difundir a través de la membrana debido a que no es sustrato de los transportadores de glucosa y (2) la adición del grupo fosforilo comienza a desestabilizar la glucosa, facilitando así su metabolismo posterior. La transferencia del grupo fosforilo del ATP al grupo hidroxilo del carbono 6 de la glucosa está catalizada por la *hexoquinasa*.



Etapa 1 de la glicolisis. Los tres pasos de la etapa 1 empiezan con la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa.

Etapa 1

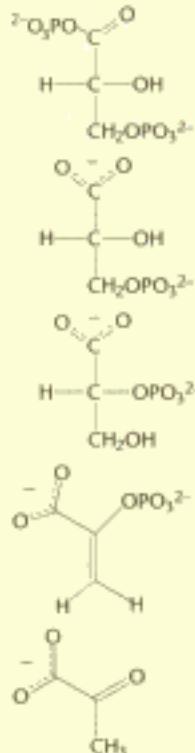
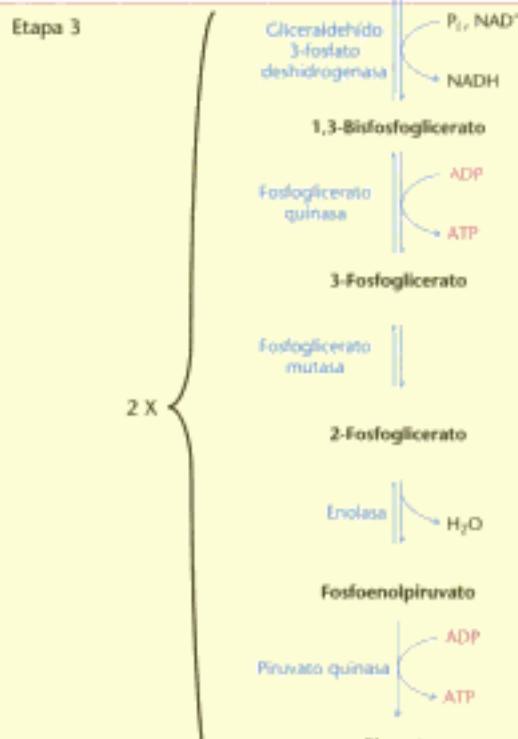
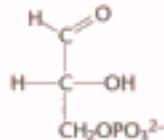
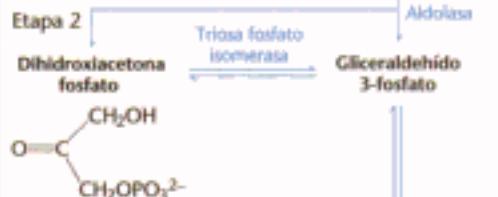
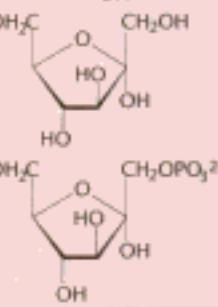
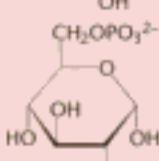
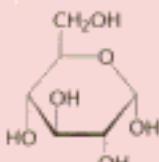


Figura 16.2 Etapas de la glicolisis. La vía glicolítica puede dividirse en tres etapas: (1) la glucosa es atrapada y se desestabiliza; (2) la fructosa de seis carbonos se rompe y da lugar a dos moléculas interconvertibles de tres carbonos; y (3) se genera ATP.

La transferencia del fosforilo es una reacción fundamental en bioquímica. Las *quinasas* son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo del ATP a un aceptor. La hexoquinasa, entonces, cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del ATP a una serie de azúcares de seis carbonos (*hexosas*), como son la glucosa y la manosa. *La hexoquinasa, al igual que la adenilato quinasa y todas las demás quinasas, requiere Mg²⁺ para su actividad (u otro ion metálico divalente como puede ser el Mn²⁺).* El ion metálico divalente forma un complejo con el ATP.

Los resultados de los estudios cristalográficos de rayos X de la hexoquinasa de levadura revelan que la unión de la glucosa induce un gran cambio conformacional en el enzima. La hexoquinasa consta de dos lóbulos los cuales se acercan mutuamente al unirse la glucosa (Figura 16.3). Al unirse este azúcar, uno de los lóbulos gira 12 grados respecto al otro provocando un desplazamiento de la cadena principal polipeptídica de hasta 8 Å. La hendidura entre los lóbulos se cierra, y la glucosa unida queda rodeada por la proteína, excepto el grupo hidroxilo del carbono 6, el cual aceptará al fosforilo del ATP. El cierre de la hendidura en la hexoquinasa es un ejemplo notable del papel del *ajuste inducido* en la acción del enzima (p. 215).

Los cambios estructurales inducidos por glucosa son significativos en dos aspectos. Primero, el entorno alrededor de la glucosa pasa a ser mucho más apolar, hecho que favorece la recepción del grupo fosforilo terminal del ATP. Segundo, como se mencionó en la página 269, los cambios conformacionales en la quinasa inducidos por el sustrato le permiten excluir el H₂O como posible sustrato. Si la hexoquinasa fuera rígida, una molécula de H₂O que ocupase el centro de unión para el -CH₂OH de la glucosa podría atacar al grupo γ fosforilo del ATP, formando ADP y P_i. En otras palabras, una quinasa rígida debería ser también necesariamente una ATPasa. Es interesante anotar que otras quinasas que participan en al glicolisis (piruvato quinasa, fosfoglicerato quinasa y fosfofructoquinasa) también contienen hendiduras entre lóbulos que se cierran cuando se unen al sustrato, aunque las estructuras de estos enzimas sean diferentes en otros aspectos. *El cierre de la hendidura inducido por el sustrato es una característica general de las quinasas.*

La fructosa 1,6-bisfosfato se forma a partir de glucosa 6-fosfato

El paso siguiente de la glicolisis es la *isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato*. Recordemos que la forma de cadena abierta de la glucosa tiene un grupo aldehído en el carbono 1, mientras que la forma de cadena abierta de la fructosa tiene un grupo cetona en el carbono 2. Así pues, la isomerización de glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato es la *conversión de una aldosa en cetosa*. La reacción catalizada por la *fosfoglucosa isomerasa* incluye pasos adicionales ya que ambas, la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato, están presentes originalmente en sus formas cíclicas. El enzima debe abrir primero el anillo de seis miembros de la glucosa 6-fosfato, catalizar la isomerización, y después promover la formación de un anillo de cinco miembros de la fructosa 6-fosfato.

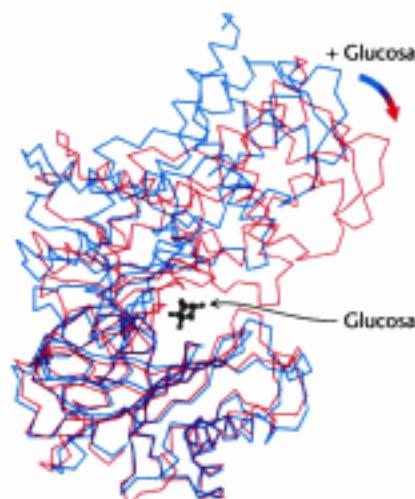
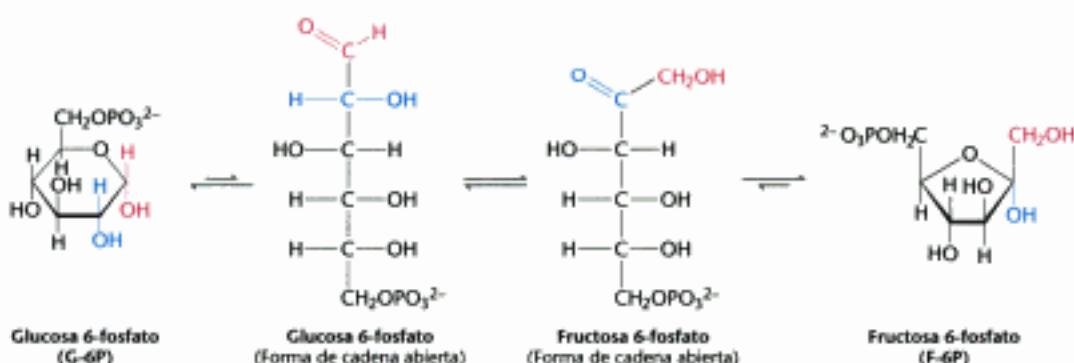
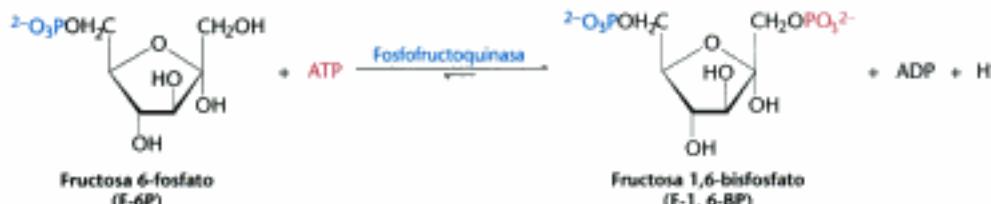


Figura 16.3 Ajuste inducido en la hexoquinasa. Como se muestra en azul, en ausencia de glucosa, los dos lóbulos de la hexoquinasa se encuentran separados. La conformación de la hexoquinasa cambia considerablemente al unirse la glucosa, como se muestra en rojo. Obsérvese que los dos lóbulos del enzima se acercan y rodean al sustrato. [Cortesía del Dr. Thomas Steitz.]

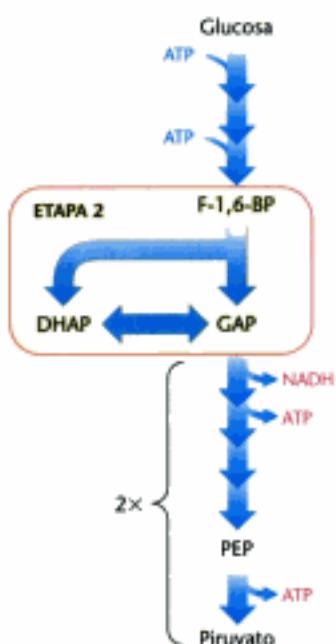
A la etapa de isomerización le sigue una segunda reacción de fosforilación. La fructosa 6-fosfato se fosforila mediante el ATP hasta fructosa 1,6-bisfosfato (F-1,6-BP). El prefijo *bis-* en bisfosfato significa que dos grupos monofosfato están presentes de forma separada, mientras que el prefijo *di-* en difosfato (como en adenosina difosfato) significaría que hay dos grupos fosfato y están conectados uno al otro por un enlace anhídrido.



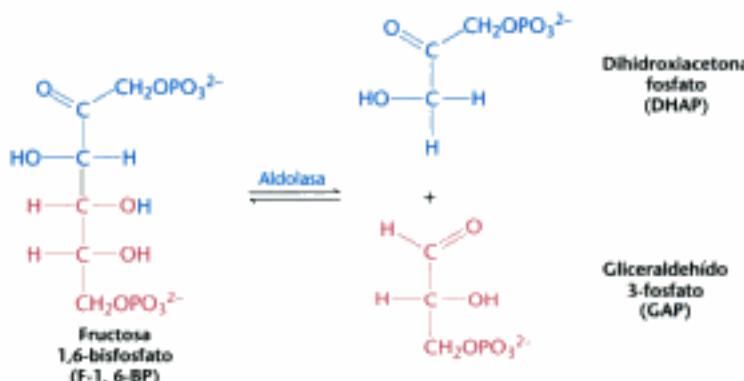
Esta reacción está catalizada por la *fosfofructoquinasa* (PFK), un enzima alostérico que marca el ritmo de la glicolisis (p. 454). Como veremos, este enzima desempeña un papel central en la integración de gran parte del metabolismo.

El azúcar de seis carbonos se escinde en dos fragmentos de tres carbonos

La segunda etapa de la glicolisis comienza con la división de la fructosa 1,6-bisfosfato en *gliceraldehído 3-fosfato* (GAP) y *dihidroxacetona fosfato* (DHAP). Los productos de los pasos posteriores de la glicolisis son unidades de tres carbonos en vez de unidades de seis carbonos.



Etapa 2 de la glicolisis. A partir de un azúcar de seis carbonos se producen dos fragmentos de tres carbonos.



Esta reacción que es fácilmente reversible está catalizada por la *aldolasa*. El nombre de este enzima deriva de la naturaleza de la reacción inversa, que es una condensación aldólica.

El gliceraldehído 3-fosfato se encuentra en la vía directa de la glicolisis, pero no la dihidroxacetona fosfato. A menos que exista una manera de convertir dihidroxacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato, se perderá un fragmento de tres carbonos útil para generar ATP. De hecho, como estos compuestos son isómeros pueden interconvertirse fácilmente: la dihidroxacetona fosfato es una cetosa, mientras que el gliceraldehído 3-fosfato es una aldosa. La isomerización de los azúcares fosforilados de tres carbonos está catalizada por la *triosfa fosfato isomerasa* (TPI, a veces abreviado como TIM; Figura 16.4).



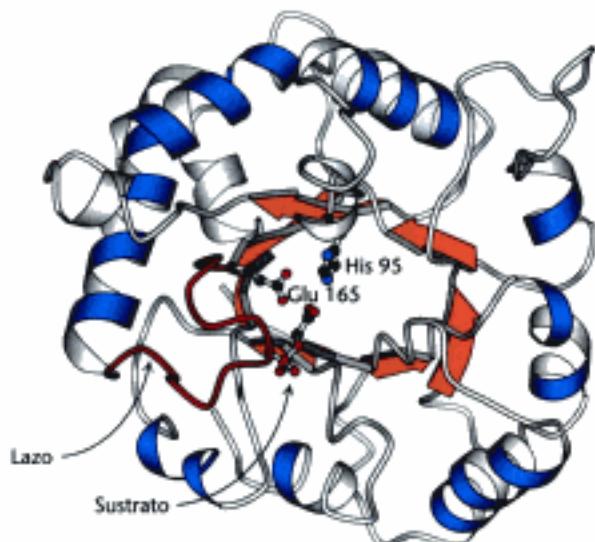


Figura 16.4 Estructura de la triosa fosfato isomerasa.

Este enzima consta de un núcleo central de ocho hebras β paralelas (en naranja) rodeadas por ocho hélices α (en azul). Este patrón estructural, llamado barrilete $\alpha\beta$, también se encuentra en los enzimas glicolíticos aldolasa, enolasa y piruvato quinasa. Obsérvese que la histidina 95 y el glutamato 165, componentes esenciales del centro activo de la triosa fosfato isomerasa, están localizados en el barrilete. Un bucle (en rojo) cierra el centro activo al unirse el sustrato. [Tomado de ZYPI.pdb.]

Esta reacción es muy rápida y reversible. En el equilibrio, el 96% de la triosa fosfato es dihidriodihidroniacetona fosfato. Sin embargo, la reacción discurre fácilmente desde la dihidriodihidroniacetona fosfato hacia el gliceraldehído 3-fosfato porque las reacciones siguientes de la glicolisis eliminan este producto.

Veamos ahora el significado de la isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato y su subsiguiente fosforilación para dar lugar a fructosa 1,6-bisfosfato. Si la ruptura aldólica hubiese ocurrido sobre la aldosa glucosa habrían resultado un fragmento de dos carbonos y otro de cuatro. Para extraer energía se hubiesen requerido dos vías metabólicas diferentes, una para procesar el fragmento de dos carbonos y la otra para el de cuatro. La isomerización a la cetosa fructosa permite que el corte aldólico origine dos fragmentos de tres carbonos fosforilados ambos e interconvertibles que serán oxidados en etapas posteriores de la glicolisis para capturar energía en forma de ATP.

Mecanismo: la triosa fosfato isomerasa recupera un fragmento de tres carbonos

Se conoce mucho del mecanismo catalítico de la triosa fosfato isomerasa. TPI cataliza la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el carbono 1 al carbono 2, una reacción de oxidorreducción intramolecular. Esta isomerización de la cetosa a aldosa transcurre a través de un *intermediario enodiol* (Figura 16.5).

La cristalografía de rayos X y otros estudios demuestran que el glutamato 165 desempeña el papel de típico catalizador ácido-base. Sin embargo, este grupo carboxilato por sí mismo no es suficientemente básico para desplazar un protón del átomo de carbono adyacente al grupo carbonilo. La histidina 95 asiste a la catálisis donando un protón para estabilizar la carga negativa que aparece en el grupo carbonilo en C-2.

Este enzima tiene dos características de interés. La primera, TPI desarrolla una gran potencia catalítica. Acelera la isomerización en un factor de 10^{10} comparándola con la velocidad obtenida con un simple catalizador básico como el ion acetato. De hecho, el cociente k_{cat}/K_M para la isomerización del gliceraldehído 3-fosfato es $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que resulta próximo al límite controlado por la difusión. En otras palabras, el paso limitante de la velocidad en la catálisis es el encuentro controlado por la difusión entre el sustrato y el enzima. TPI es un ejemplo de un *enzima cinéticamente perfecto* (p. 221). La segunda, TPI evita una reacción lateral

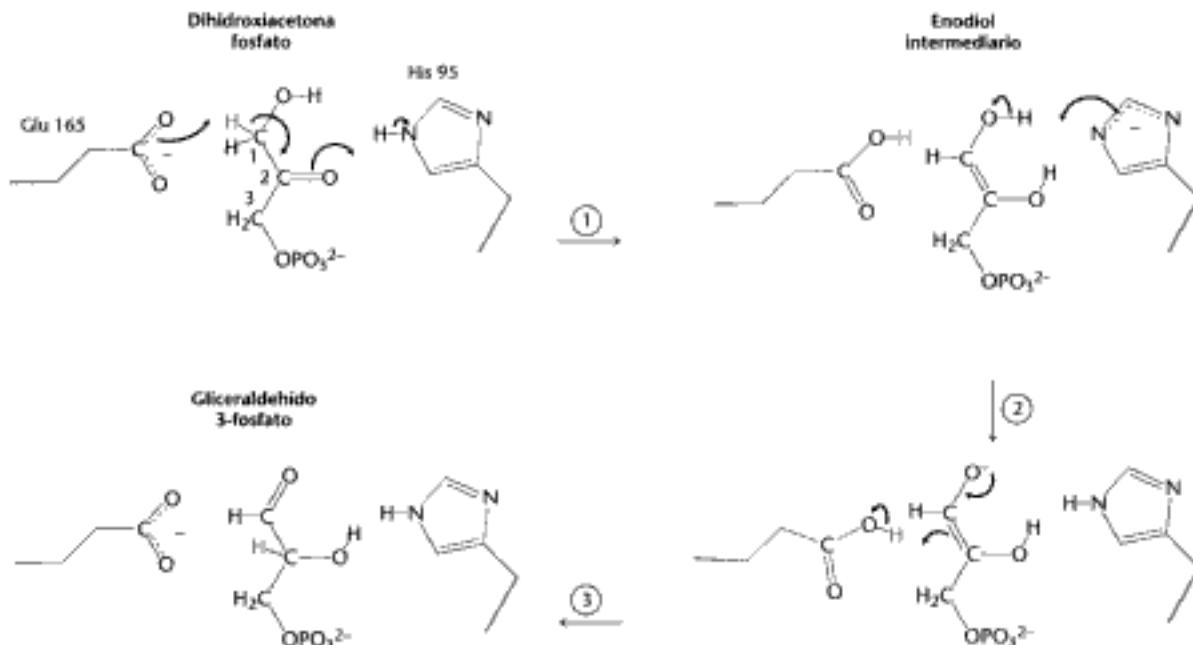
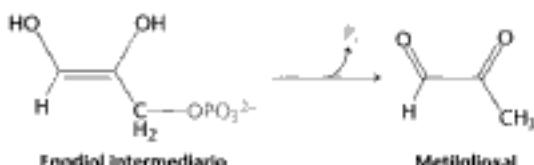


Figura 16.5 Mecanismo catalítico de la triosa fosfato isomerasa. (1) El glutamato 165 actúa como una base general porque extrae un protón (H^+) del carbono 1. La histidina 95, actuando como un ácido general, dona un protón al oxígeno unido al carbono 2, formando un enol intermediario. (2) El ácido glutámico, actuando ahora como ácido general, dona un protón al C-2 mientras la histidina arranca un protón del OH de C-1 (3) Se forma el producto, y el glutamato y la histidina regresan a sus formas ionizada y neutra, respectivamente.

indeseable, la descomposición del intermediario enediol en metilgioxal y ortofosfato.



En disolución, esta reacción fisiológicamente inútil es 100 veces más rápida que la isomerización. Por tanto, TPI debe evitar que el enediol abandone el enzima. Este intermediario labil queda atrapado en el centro activo por el desplazamiento de un bucle de 10 residuos (ver Figura 16.4). Este bucle sirve como tapadera del centro activo, cerrándose cuando el enediol está presente y reabriéndose cuando se ha completado la isomerización. *Tenemos aquí un ejemplo notable no sólo de perfección catalítica, sino también de la aceleración de una reacción deseada de modo que tenga lugar de forma mucho más rápida que la reacción alternativa no deseada.*

Por tanto, se forman dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato a partir de una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato por la acción secuencial de la aldolasa y la triosa fosfato isomerasa. En esta secuencia de reacciones, se evidencia la economía del metabolismo. La isomerasa canaliza la dihidroxiacetona fosfato hacia la vía principal de la glicolisis; así, no se requiere una serie separada de reacciones.

La oxidación de un aldehído hasta un ácido potencia la formación de un compuesto con un alto potencial de transferencia del fosforilo

Los pasos precedentes de la glicolisis han transformado una molécula de glucosa en dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato, pero aún no se ha extraído energía. Por el contrario, hasta el momento se han consumido dos moléculas de ATP. Llegamos ahora a una serie de pasos que recolectan parte de la energía contenida en el glice-

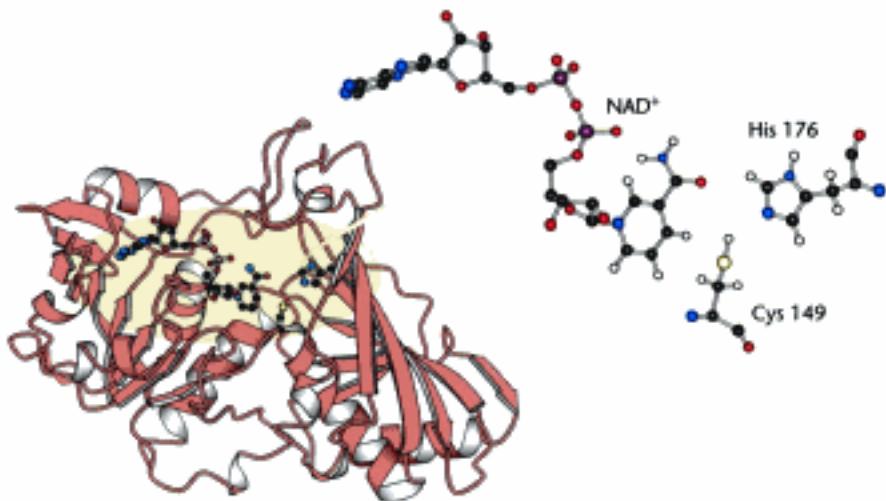
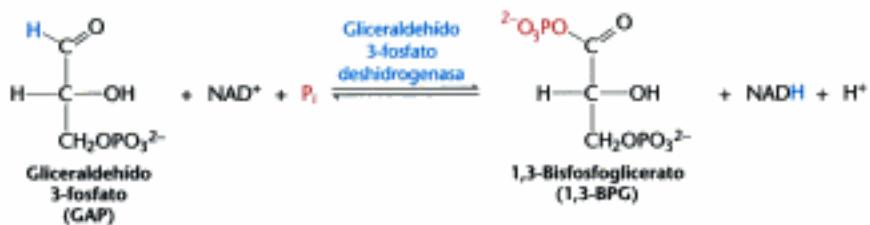


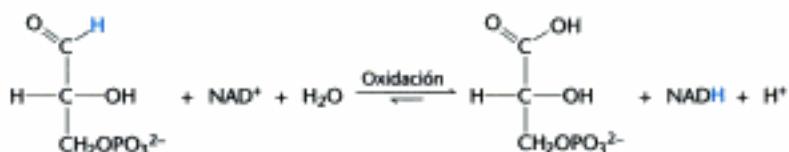
Figura 16.6 Estructura de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Obsérvese que el centro activo contiene un residuo de cisteína y otro de histidina adyacente al NAD^+ unido. El átomo de azufre de la cisteína se unirá al sustrato para formar un tioéster intermedio transitorio. [Tomado de 1GAI.pdb.]

raldehído 3-fosfato. La reacción inicial de esta secuencia es la *convertión del gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG)*, reacción catalizada por la *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (Figura 16.6).

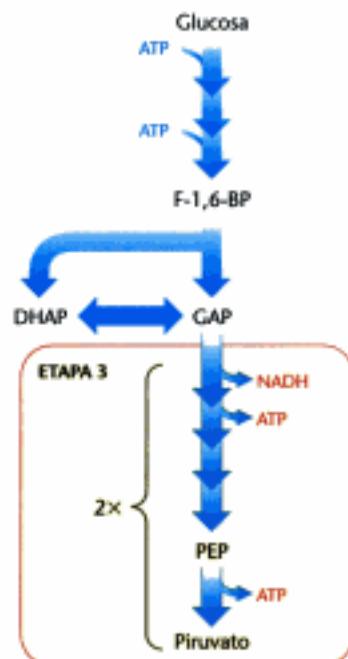


El 1,3-bisfosfoglicerato es un acilfosfato, es decir, un anhídrido mixto del ácido fosfórico y el carboxílico. Estos compuestos tienen un alto potencial de transferencia de fosforilo; uno de sus grupos fosforilo se transfiere al ADP durante los siguientes pasos de la glicolisis.

La reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es realmente la suma de dos procesos: la *oxidación* del aldehído a un ácido carboxílico por el NAD^+ y la *unión* del ácido carboxílico con el ortofosfato para formar el producto acilfosfato.



La primera reacción es muy favorable termodinámicamente con un cambio en la energía libre estándar, $\Delta G^\circ'$, de aproximadamente -50 kJ mol^{-1} ($-12 \text{ kcal mol}^{-1}$), mientras que la segunda reacción es muy desfavorable con un cambio de energía libre estándar de la misma magnitud pero de signo opuesto. Si estas dos reacciones



Etapa 3 de la glicolisis. La oxidación de los fragmentos de tres carbonos produce ATP.

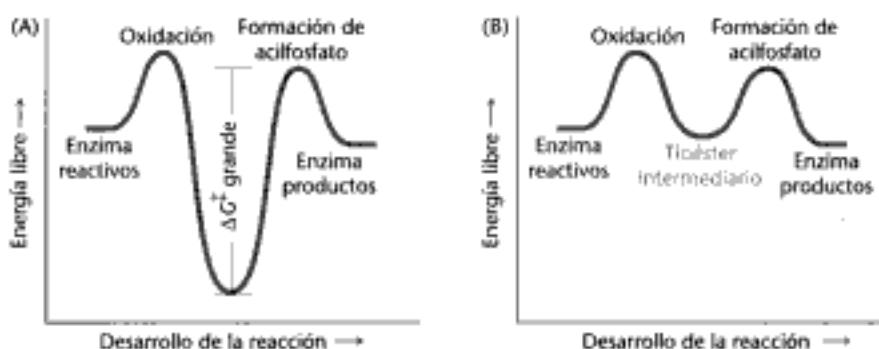


Figura 16.7 Perfiles de energía libre en la oxidación del gliceraldehído seguida de la formación de acilfosfato. (A) Un caso hipotético sin acoplamiento entre los dos procesos. El segundo paso tendrá una gran barrera de activación, haciendo que la reacción sea muy lenta. (B) El caso real con las dos reacciones acopladas a través de un tioéster intermedio.

nes simplemente tuvieran lugar de forma sucesiva, la segunda reacción tendría una energía de activación enorme y por tanto, no transcurriría a una velocidad biológicamente significativa. Estos dos procesos *deben estar acoplados* de modo que la oxidación favorable del aldehído se pueda utilizar para dirigir la formación del acilfosfato. ¿Cómo se acoplan estas reacciones? *La clave está en un intermediario, formado como resultado de la oxidación del aldehído que queda unido al enzima por un enlace tioéster*. Los tioésteres son compuestos de alta energía que se encuentran en muchos procesos bioquímicos (p. 422). Este intermediario reacciona con el ortofosfato para formar 1,3-bisfosfoglicerato, un compuesto de alta energía.

El tioéster intermedio tiene más alta energía libre que el ácido carboxílico libre. Las reacciones de oxidación favorable y fosforilación desfavorable están acopladas por el tioéster intermedio, el cual retiene gran parte de la energía libre liberada en la reacción de oxidación. Vemos aquí la utilidad de un intermediario unido covalentemente al enzima como un mecanismo de acoplamiento de la energía. El perfil de energía libre de la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, si la comparáramos con un proceso hipotético en el que la reacción tuviese lugar sin este intermediario, demuestra cómo éste permite que una reacción favorable dirija a una desfavorable (Figura 16.7).

Mecanismo: la fosforilación está acoplada a la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato por medio de un tioéster intermedio

Consideremos en detalle el mecanismo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Figura 16.8). En el paso 1, el sustrato aldehídico reacciona con el grupo sulfhidrilo de la cisteína 149 del enzima para formar un hemitioacetal. La etapa 2 es la transferencia de un ion hidruro a una molécula de NAD⁺ que está fuertemente unida al enzima y queda muy cerca del residuo de cisteína. Esta reacción resulta favorecida por la desprotonación del hemitioacetal por la histidina 176. Los productos de esta reacción son el coenzima reducido NADH y el tioéster intermedio. Este tioéster intermedio tiene una energía libre próxima a la de los reactantes (Figura 16.7). En el paso 3, el NADH formado en la oxidación del aldehído abandona al enzima y se reemplaza por una segunda molécula de NAD⁺. Este paso es importante porque la carga positiva del NAD⁺ polariza el tioéster intermedio facilitando el ataque por el ortofosfato. En el paso 4, el ortofosfato ataca el tioéster formando 1,3-BPG y libera el residuo de cisteína. Este ejemplo ilustra la esencia de las transformaciones energéticas y del propio metabolismo: la energía liberada por la oxidación del carbono se convierte en un elevado potencial de transferencia de fosforilo.

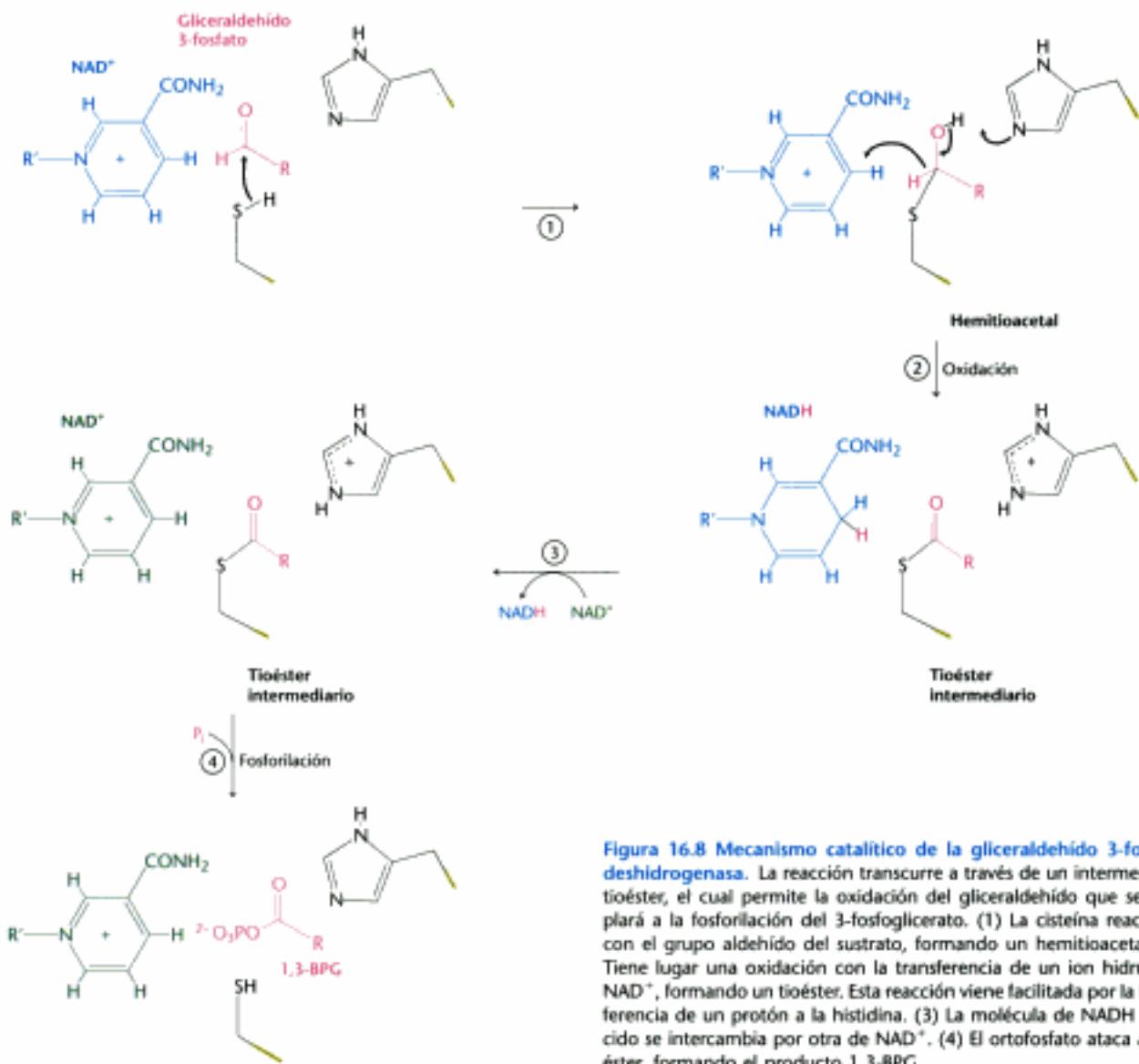
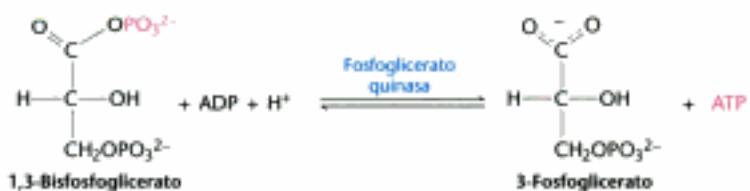


Figura 16.8 Mecanismo catalítico de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. La reacción transcurre a través de un intermediario tioéster, el cual permite la oxidación del gliceraldehído que se acoplará a la fosforilación del 3-fosfoglicerato. (1) La cisteína reacciona con el grupo aldehído del sustrato, formando un hemitioacetal. (2) Tiene lugar una oxidación con la transferencia de un ion hidruro al NAD⁺, formando un tioéster. Esta reacción viene facilitada por la transferencia de un protón a la histidina. (3) La molécula de NADH reducido se intercambia por otra de NAD⁺. (4) El ortofosfato ataca al tioéster, formando el producto 1,3-BPG.

El ATP se forma por transferencia de fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato

El 1,3-bisfosfoglicerato es una molécula rica en energía con un potencial de transferencia de fosforilos mayor que el ATP (p. 416). Por ello el 1,3-BPG se puede utilizar para potenciar la síntesis de ATP a partir de ADP. La *fosfoglicerato quinasa*催化iza la transferencia del grupo fosforilo del 1,3-fosfoglicerato al ADP a partir del acilfosfato. Los productos son ATP y 3-fosfoglicerato.



A esta forma de producción del ATP se denomina *fosforilación a nivel del sustrato* porque el dador del fosfato, 1,3-BPG, es un sustrato con un alto potencial de transferencia del grupo fosforilo. Compararemos esta forma de producir ATP con aquella en la que el ATP se forma a partir de gradientes iónicos, en los Capítulos 18 y 19.

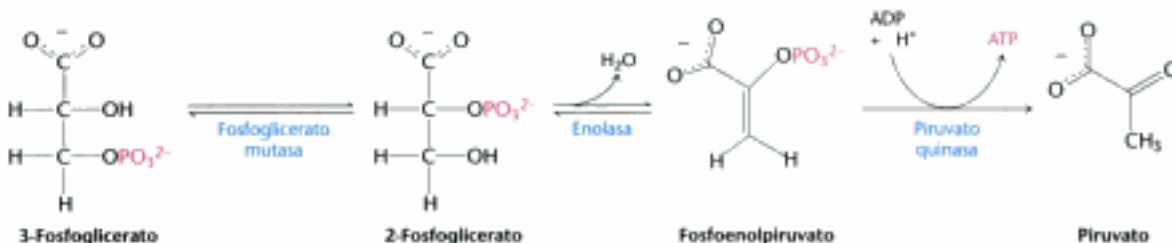
Así pues, el resultado neto de las reacciones catalizadas por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la fosforilasa quinasa es como sigue:

1. El gliceraldehído 3-fosfato, un aldehído, se oxida a 3-fosfoglicerato, un ácido carboxílico.
2. Al mismo tiempo, el NAD^+ se reduce a NADH.
3. Se forma ATP a partir de P_i y ADP a expensas de la energía de oxidación del carbono.

En esencia, la energía liberada durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato se retiene temporalmente como 1,3-bisfosfoglicerato. Esta energía potencia la transferencia de un grupo fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato al ADP para obtener ATP. Recordemos que, gracias a las acciones de la aldolasa y la triosa fosfato isomerasa, se formaban dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato y, por tanto, ahora se generan dos moléculas de ATP. Estas moléculas de ATP equivalen a recuperar las dos moléculas de ATP consumidas en la primera etapa de la glicolisis.

Se genera otro ATP con la formación de piruvato

En los pasos restantes de la glicolisis, el 3-fosfoglicerato se convierte en piruvato con la correspondiente conversión de ADP en ATP.



La primera reacción es un reordenamiento. La posición del grupo fosforilo se desplaza en la *conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato*, reacción catalizada por la *fosfoglicerato mutasa*. En general, una mutasa es un enzima que cataliza un cambio en la ubicación intramolecular de un grupo químico como puede ser el fosforilo. La fosfoglicerato mutasa tiene un mecanismo de reacción interesante:

TABLA 16.1 Reacciones de la glicolisis

Etapa	Reacción
1	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$
2	$\text{Glucosa 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{fructosa 6-fosfato}$
3	$\text{Fructosa 6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{fructosa 1,6-bisfosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$
4	$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} \rightleftharpoons \text{dihidroxiacetona fosfato} + \text{gliceraldehído 3-fosfato}$
5	$\text{Dihidroxiacetona fosfato} \rightleftharpoons \text{gliceraldehído 3-fosfato}$
6	$\text{Gliceraldehído 3-fosfato} + \text{P}_i + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{1,3-bisfosfoglicerato} + \text{NADH} + \text{H}^+$
7	$\text{1,3-Bisfosfoglicerato} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP}$
8	$\text{3-Fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerato}$
9	$\text{2-Fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + \text{H}_2\text{O}$
10	$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} + \text{H}^+ \rightarrow \text{piruvato} + \text{ATP}$

Nota: ΔG° , el incremento de energía libre real, se ha calculado a partir de ΔG° y de concentraciones conocidas de los reactantes bajo condiciones fisiológicas normales. La glicolisis sólo puede tener lugar cuando los valores de ΔG son negativos en todas las reacciones. Los pequeños valores positivos de ΔG en tres de las reacciones mostradas arriba indican que no se conocen de forma precisa las concentraciones *in vivo* de los metabolitos en las células que albergan la glicolisis.

el grupo fosforilo no se desplaza simplemente de un carbono a otro. Este enzima requiere cantidades catalíticas de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) para mantener en la forma fosforilada un residuo de histidina del centro activo. Este grupo fosforilo se transfiere al 3-fosfoglicerato para formar de nuevo 2,3-bisfosfoglicerato.



La mutasa actúa entonces como una fosfatasa: convierte el 2,3-bisfosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. La mutasa retiene el grupo fosforilo para regenerar la histidina modificada.

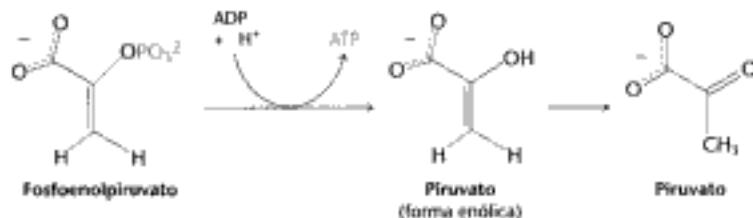


La suma de estas reacciones da como resultado la reacción de la mutasa:

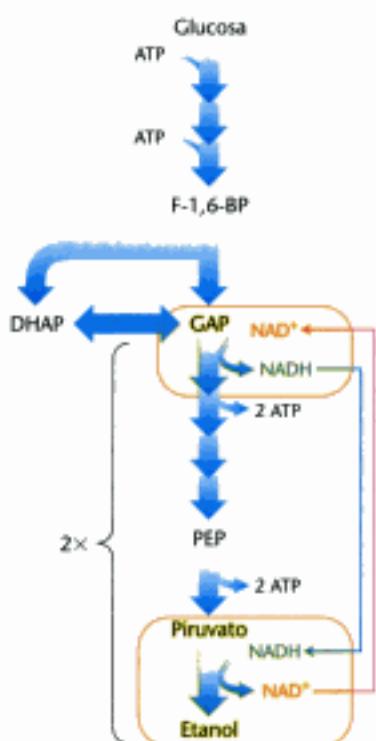


En la siguiente reacción por la deshidratación del 2-fosfoglicerato se forma un doble enlace y se crea un *enol*. La *enolasa* cataliza la formación de *fosfoenolpiruvato* (PEP). Esta reacción de deshidratación eleva marcadamente el potencial de transferencia del grupo fosforilo. El *enolfosfato* tiene un elevado potencial de transferencia del grupo fosforilo, mientras que el éster fosfato de un alcohol ordinario, como el 2-fosfoglicerato, lo tiene bajo. El $\Delta G^\circ'$ de la hidrólisis de un éster fosfato de un alcohol ordinario es -13 kJ mol^{-1} (-3 kcal mol^{-1}), mientras que el del fosfoenolpiruvato es -62 kJ mol^{-1} ($-15 \text{ kcal mol}^{-1}$).

¿Por qué tiene el fosfoenolpiruvato un potencial de transferencia del grupo fosforilo tan elevado? El grupo fosforilo atrapa la molécula en su forma enólica inestable. Cuando el grupo fosforilo se ha donado al ATP, el enol se convierte en una cetona más estable, denominada piruvato.



Enzima	Tipo de reacción	$\Delta G^\circ'$ en kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})	ΔG en kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Hexoquinasa	Transferencia de fosforilo	-16,7 (-4,0)	-33,5 (-8,0)
Fosfoglucosa isomerasa	Isomerización	+1,7 (+0,4)	-2,5 (-0,6)
Fosfofructoquinasa	Transferencia de fosforilo	-14,2 (-3,4)	-22,2 (-5,3)
Aldolasa	Escisión aldólica	+23,8 (+5,7)	-1,3 (-0,3)
Triosa fosfato isomerasa	Isomerización	+7,5 (+1,8)	+2,5 (+0,6)
Gliceralehido 3-fosfato deshidrogenasa	Fosforilación acoplada a oxidación	+6,3 (+1,5)	-1,7 (-0,4)
Fosfoglicerato quinasa	Transferencia de fosforilo	-18,8 (-4,5)	+1,3 (+0,3)
Fosfoglicerato mutasa	Migración interna de fosforilo	+4,6 (+1,1)	+0,8 (+0,2)
Enolasa	Deshidratación	+1,7 (+0,4)	-3,3 (-0,8)
Piruvato quinasa	Transferencia de fosforilo	-31,4 (-7,5)	-16,7 (-4,0)



Localización de los pasos del balance redox. La generación y consumo del NADH, localizados en la vía glicolítica.

Así pues, la gran fuerza directriz de la conversión ulterior de enol a cetona, proporciona al fosfoenolpiruvato su alto potencial de transferencia de su grupo fosforilo. De este modo, se forma piruvato y simultáneamente se genera ATP. La transferencia prácticamente irreversible del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato hasta el ADP está catalizada por la *piruvato quinasa*. Debido a que las moléculas de ATP consumidas en la producción de fructosa 1,6-bisfosfato han sido ya recuperadas, las dos moléculas de ATP producidas a partir del fosfoenolpiruvato son "ganancia neta".

En la conversión de glucosa en piruvato se forman dos moléculas de ATP

La reacción global de la transformación de glucosa en piruvato es:



Así pues, en la conversión de glucosa en dos moléculas de piruvato se generan dos moléculas de ATP. Las reacciones de la glicolisis están resumidas en la Tabla 16.1.

Nótese que la conversión anaeróbica de glucosa en dos moléculas de piruvato libera una energía de -96 kJ mol^{-1} ($-23 \text{ kcal mol}^{-1}$). En los capítulos 17 y 18 veremos que en presencia de oxígeno la glucosa puede liberar mucha más energía.

El NAD⁺ se regenera mediante el metabolismo del piruvato

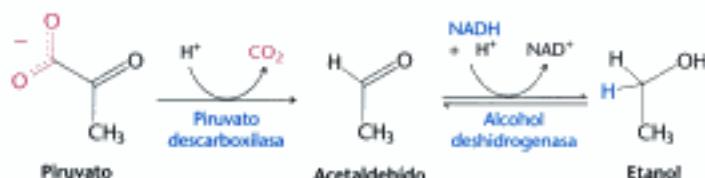
De la conversión de glucosa en dos moléculas de piruvato resulta la síntesis neta de ATP. Sin embargo, la vía de conversión de energía que finalizaba en piruvato no podría seguir más allá porque no se mantiene el balance redox. Como se ha visto anteriormente, la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, además de generar un compuesto con un alto potencial de transferencia de fosforilos, provoca necesariamente la reducción del NAD⁺ a NADH. Como en las células existen cantidades limitadas de NAD⁺, que se derivan de la vitamina niacina, requerida en la dieta humana, en consecuencia, debe regenerarse el NAD⁺ para que continúe la glicolisis. Por tanto, el proceso final de la vía es la regeneración del NAD⁺ a través del metabolismo del piruvato.

La secuencia de reacciones desde la glucosa hasta el piruvato es similar en la mayoría de los organismos y de los tipos celulares. Por el contrario, el destino del piruvato es variable. Tres de las reacciones del piruvato son de capital importancia: la conversión a etanol, ácido láctico o dióxido de carbono (Figura 16.9). Las primeras dos reacciones son fermentaciones que tienen lugar en ausencia de oxígeno. En presencia de oxígeno, la situación más universal en los seres pluricelulares y en muchos unicelulares, el piruvato se metaboliza a dióxido de carbono y agua, a través del ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones. Ahora dedicaremos una visión conjunta a los destinos posibles del piruvato.

1. El *etanol* se forma a partir del piruvato en levaduras y muchos otros microorganismos. El primer paso es la descarboxilación del piruvato. Esta reacción está catalizada por la *piruvato descarboxilasa*, la cual necesita del coenzima tiamina pirofosfato. Este coenzima, derivado de la vitamina tiamina (B₁), también participa en reacciones catalizadas por otros enzimas (p. 478). El segundo paso es la reducción de acetaldehído a etanol por el NADH, mediante una reacción catalizada por la *alcohol deshidrogenasa*. Este proceso regenera el NAD⁺.



Figura 16.9 Distintos destinos del piruvato. El etanol y el lactato se pueden formar por reacciones que involucran al NADH. Alternativamente, una unidad de dos carbonos procedente del piruvato puede acoplarse al coenzima A para formar acetil-CoA (ver p. 420).



El centro activo de la alcohol deshidrogenasa contiene un ion zinc coordinado a los átomos de azufre de dos residuos de cisteína y a un átomo de nitrógeno de una histidina (Figura 16.10). El ion zinc polariza el grupo carbonilo del sustrato para favorecer la transferencia de un hidruro desde el NADH.

La conversión de glucosa en etanol es un ejemplo de *fermentación alcohólica*. La reacción global de este proceso anaeróbico es:



Es importante señalar que ni el NAD^+ ni el NADH aparecen en esta ecuación aunque ambos son cruciales en la vía completa. El NADH producido en la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato se consume en la reducción del acetaldehído hasta etanol. Por tanto, *en la conversión de glucosa en etanol, no se produce óxido-reducción neta* (Figura 16.11). El etanol producido en la fermentación alcohólica constituye un ingrediente clave en la elaboración de la cerveza y el vino.

2. El *lactato* se forma normalmente a partir del piruvato en una serie de microorganismos en un proceso llamado *fermentación láctica*. La reacción también se produce en las células de los organismos superiores cuando la cantidad de oxígeno disponible es limitada, como ocurre en el músculo durante la actividad intensa. La reducción del piruvato por el NADH para formar lactato está catalizada por la *lactato deshidrogenasa*.



La reacción global de la conversión de glucosa en lactato es:



Al igual que en la fermentación alcohólica, aquí no existe óxido-reducción neta. El NADH formado en la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato se consume en la reducción del piruvato. *La regeneración del NAD^+ en la reducción del piruvato*

Fermentación

Es un proceso que genera ATP, en el cual las sustancias orgánicas actúan como dadores y aceptores de electrones. La fermentación puede producirse en ausencia de O_2 . Fue descubierta por Louis Pasteur, que la describió como "la vie sans l'air" ("la vida sin aire").

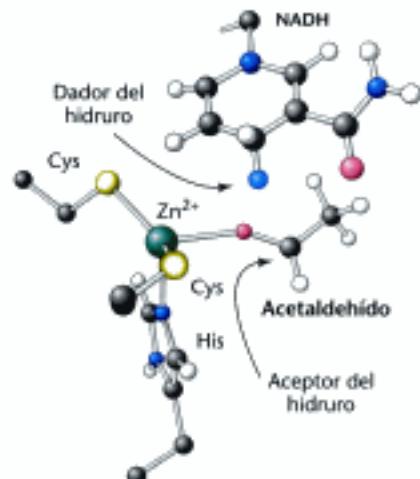


Figura 16.10 Centro activo de la alcohol deshidrogenasa. El centro activo contiene un ion zinc unido a dos residuos de cisteína y a un residuo de histidina. Obsérvese que el ion zinc se une a través del átomo de oxígeno al sustrato acetaldehído, polarizándolo de forma que acepta más fácilmente un hidruro del NADH (azul claro). Solamente se muestra el anillo nicotinamida del NADH.

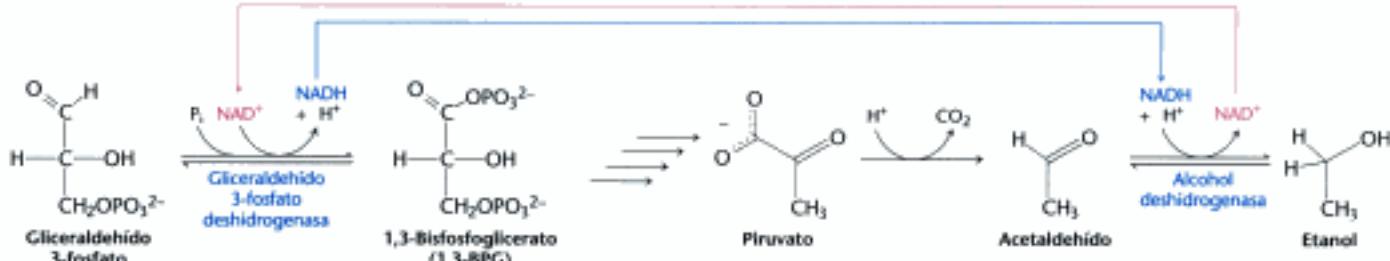


Figura 16.11 Mantenimiento del balance redox. El NADH producido por la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa debe ser reoxidado a NAD^+ para que continúe la vía glicolítica. En la fermentación alcohólica, la alcohol deshidrogenasa oxida el NADH y genera etanol. En la fermentación láctica (no mostrada), la lactato deshidrogenasa oxida el NADH al tiempo que se produce ácido láctico.

TABLA 16.2 Ejemplos de patógenos anaerobios estrictos

Bacterias	Resultado de la infección
<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo (un tipo de intoxicación alimentaria especialmente grave)
<i>Clostridium perfringens</i>	Gangrena gaseosa (el gas se genera como producto final de la fermentación y deforma y destruye el tejido)
<i>Bartonella henselae</i>	Fiebre del arañazo de gato (síntomas como en la gripe)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Infecciones abdominal, pélvica, pulmonar y sanguínea

hasta lactato o etanol mantiene a la glicolisis operativa bajo condiciones anaeróbicas.

3. Solamente una pequeña fracción de la energía de la glucosa se libera en la conversión anaeróbica hasta etanol o lactato. Se puede extraer mucha más energía de forma aeróbica por la vía del ácido cítrico y la cadena de transporte electrónico. El punto de entrada a esta vía oxidativa es el acetil-coenzima A (acetil-CoA), que se forma en el interior de la mitocondria por descarboxilación oxidativa del piruvato.



Esta reacción, que está catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, se tratará con detalle en el Capítulo 17. El NAD⁺ que se requiere para esta reacción y para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato se regenera cuando el NADH transfiere por último sus electrones al O₂ a través de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria.

Las fermentaciones aportan energía utilizable en ausencia de oxígeno

Las fermentaciones aportan solamente una fracción de la energía que se podría obtener de la combustión completa de la glucosa. ¿Por qué una vía metabólica relativamente ineficaz se utiliza con tal profusión? La razón fundamental es que no requiere oxígeno. La posibilidad de vivir sin oxígeno capacita a un huésped para acomodarse a vivir en sitios tales como suelos, aguas profundas o poros de la piel. Algunos organismos, llamados anaerobios obligados no pueden sobrevivir en presencia de O₂, un compuesto altamente reactivo. La bacteria *Clostridium perfringens*, causante de la gangrena, es un ejemplo de anaerobio obligado. La Tabla 16.2 recoge una lista de otros anaerobios obligados. Los músculos esqueléticos de la mayoría de los animales pueden funcionar de forma anaeróbica durante períodos cortos. Así, por ejemplo, cuando los animales realizan estallidos de ejercicio intenso, sus necesidades de ATP crecen más aprisa que la capacidad del cuerpo para aportar el oxígeno a los músculos. El músculo funciona de manera anaeróbica hasta llegar a la fatiga que, a su vez, está originada por la acumulación de lactato.

Aunque hemos considerado sólo las fermentaciones láctica y alcohólica, hay microorganismos capaces de generar una amplia gama de moléculas como productos finales de la fermentación (Tabla 16.3). De hecho, muchos productos alimentarios, incluyendo la crema agria, el yogur, varios quesos, la cerveza, el vino, la *choucroute*, son el resultado de fermentaciones.

TABLA 16.3 Puntos de partida y productos de varias fermentaciones

Glucosa	→	lactato
Lactato	→	acetato
Glucosa	→	etanol
Etanol	→	acetato
Arginina	→	díóxido de carbono
Pirimidinas	→	díóxido de carbono
Purinas	→	formiato
Etilenglicol	→	acetato
Treonina	→	propionato
Leucina	→	2-alquilacetato
Fenilalanina	→	propionato

El centro de unión del NAD⁺ es similar en muchas deshidrogenasas

 Las tres deshidrogenasas (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa) tienen estructuras tridimensionales totalmente distintas. Sin embargo, sus dominios de unión al NAD⁺ son llamativamente similares (Figura 16.12). Esta región de unión al nucleótido está formada por cuatro hélices α y una hoja β de seis hebras paralelas. Además, el NAD⁺ unido muestra

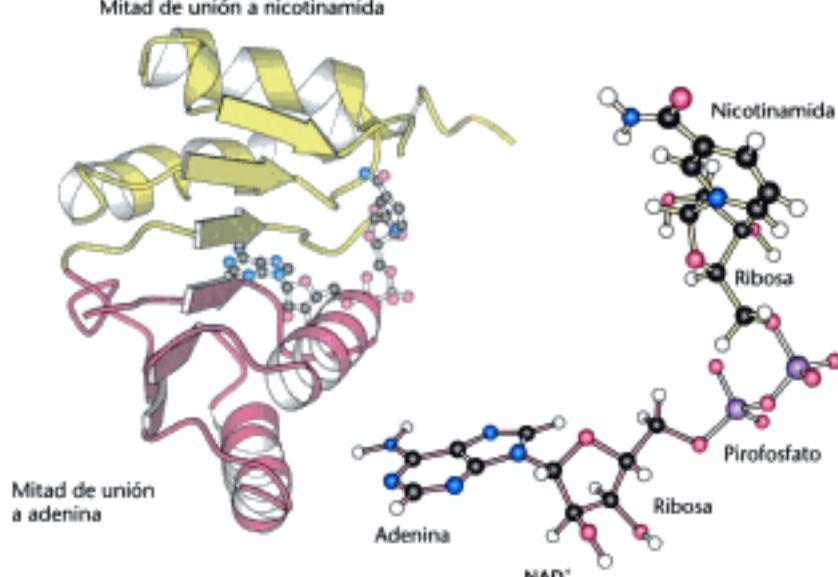


Figura 16.12 Región de unión del NAD⁺ en las deshidrogenasas. Obsérvese que la mitad de la molécula de unión a la nicotinamida (amarillo) es estructuralmente similar a la mitad de unión a la adenina (rojo). Las dos mitades juntas forman un patrón estructural denominado plegamiento de Rossmann (Rossmann fold). La molécula de NAD⁺ se une en una conformación extendida. [Tomado de 3LDH.pdb.]

casi la misma conformación en todos los casos. Este dominio estructural común, uno de los primeros dominios estructurales recurrentes descubiertos, normalmente se denomina *plegamiento de Rossmann*, porque Michael Rossmann fue el primero en describirlo. Este plegamiento probablemente representa un dominio primordial de unión a dinucleótidos que se repite en las deshidrogenasas de la glicolisis y en otros enzimas ya que descienden de un antepasado común.

La fructosa y la galactosa se convierten en intermediarios de la glicolisis

Aunque la glucosa es el monosacárido más ampliamente utilizado, otros también son combustibles importantes. Consideremos ahora cómo dos azúcares abundantes: la fructosa y la galactosa, se canalizan hacia la vía glicolítica (Figura 16.13). No existen vías metabólicas propias para metabolizar la fructosa o la galactosa, de modo que la estrategia será convertir estos azúcares en metabolitos de la glucosa.

La fructosa puede tomar una de dos vías para entrar en la vía glicolítica. La mayor parte de la fructosa ingerida se metaboliza en el hígado, utilizando la *vía de la fructosa 1-fosfato* (Figura 16.14). El primer paso en esta vía es la fosforilación de la fructosa hasta *fructosa 1-fosfato* por la *fructoquinasa*. La fructosa 1-fosfato se escinde en *gliceraldehído* y *dihidroxiacetona fosfato*, un intermediario de la glicolisis. Esta escisión alcohólica está catalizada por una *fructosa 1-fosfato aldolasa* específica. Entonces el *gliceraldehído* se fosforila hasta *gliceraldehído 3-fosfato*, un intermediario glicolítico, por la *trioso quinasa*. En otros tejidos la fructosa se fosforila hasta *fructosa 6-fosfato* por la *hexoquinasa*. La galactosa se convierte en *glucosa 6-fosfato* en cuatro pasos. La primera reacción en la *vía de interconversión galactosa-glucosa* es la fosforilación de la galactosa a galactosa 1-fosfato por la *galactoquinasa*.

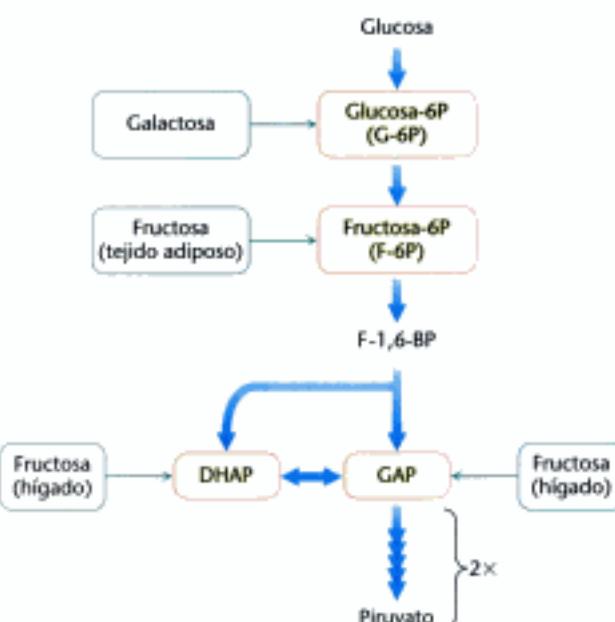
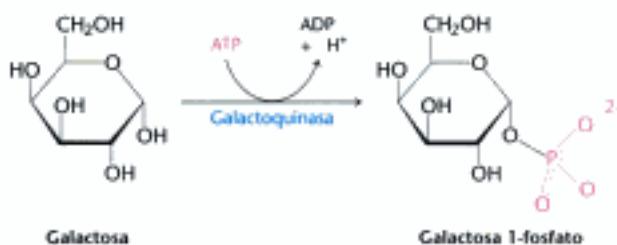
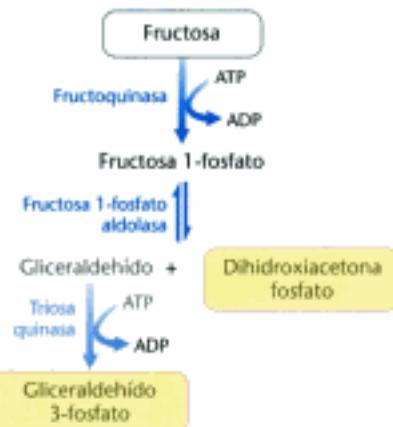


Figura 16.13 Puntos de entrada en la glicolisis para la galactosa y la fructosa.



La galactosa 1-fosfato adquiere un grupo urídilo de la uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), un intermediario en la síntesis de enlaces glicosídicos (p. 314).

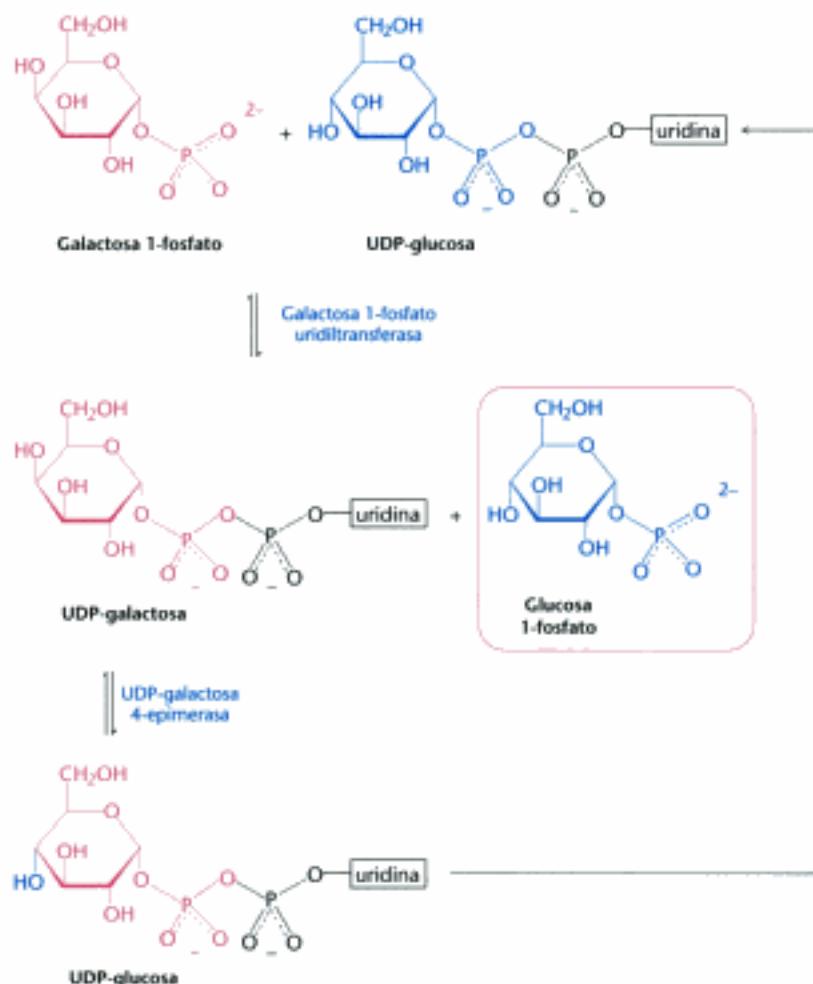


Figura 16.14 Metabolismo de la fructosa. La fructosa se incorpora a la vía glicolítica en el hígado a través de la vía de la fructosa 1-fosfato.

Los productos de esta reacción, catalizada por la *galactosa 1-fosfato uridiltransferasa*, son la UDP-galactosa y la glucosa 1-fosfato. El componente galactosa, cuando está unido al UDP, se epimeriza hasta glucosa. La *UDP-galactosa 4-epimerasa* invierte la configuración del grupo hidroxilo del carbono 4.

La suma de las reacciones catalizadas por la galactoquinasa, la transferasa y la epimerasa es:

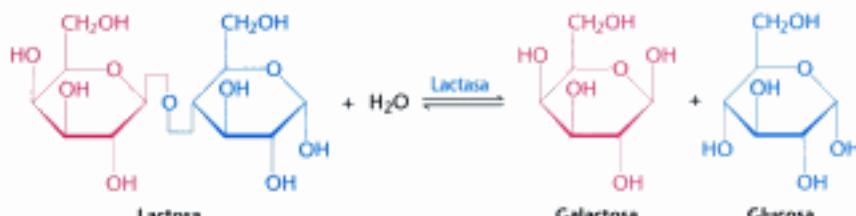


Adviéntase que la UDP-glucosa no se consume durante la transformación de la galactosa a glucosa, porque se regenera a partir de la UDP-galactosa por acción de la epimerasa. Esta reacción es reversible y el producto de la reacción inversa es también importante. *La conversión de UDP-glucosa en UDP-galactosa es esencial para la síntesis de residuos galactosílico en polisacáridos complejos y en glicoproteínas, si la cantidad de galactosa en la dieta es insuficiente para cubrir dichas necesidades.*

Por último, la glucosa 1-fosfato, formada a partir de la galactosa, se isomeriza a glucosa 6-fosfato por acción de la *fosfoglucomutasa*. Volveremos a ver esta reacción en el Capítulo 21 al estudiar la síntesis y degradación del glucógeno, que tienen lugar a través de la glucosa 1-fosfato.

Muchos adultos son intolerantes a la leche porque tienen una deficiencia de lactasa

 Muchos adultos son incapaces de metabolizar el azúcar de la leche, la lactosa, y experimentan alteraciones gastrointestinales cuando toman leche. La *intolerancia a la lactosa*, o hipolactasia, se debe, en la mayor parte de los casos, a una deficiencia del enzima lactasa, la cual debe escindir la lactosa en glucosa y galactosa.



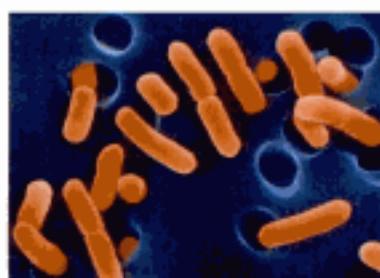
El término "deficiencia" no es exactamente apropiado, porque en todos los mamíferos es normal un descenso en los niveles de lactasa durante su desarrollo. A medida que los niños crecen y la leche se hace menos importante en la dieta, la actividad de la lactasa disminuye hasta un 5 o un 10% del nivel que tenían en el nacimiento. Esta disminución no es tan pronunciada en ciertos grupos de población, especialmente en el norte de Europa, por lo que estas personas pueden continuar tomando leche sin experimentar dificultades gastrointestinales. Con la aparición de animales domésticos productores de leche, el hombre que, por una alteración genética, mantuviese niveles altos de actividad lactasa en la edad adulta podría resultar hipotéticamente favorecido de forma selectiva al ser capaz de consumir las calorías de la leche fácilmente asequible.

¿Qué ocurre con la lactosa en el intestino de una persona deficiente en lactasa? La lactosa es una buena fuente de energía para los microorganismos del colon, que la fermentan a ácido láctico al tiempo que generan metano (CH₄) y gas hidrógeno (H₂). El gas producido crea un malestar por la distensión del intestino y el enojoso problema de la flatulencia. El ácido láctico que producen los microorganismos es osmóticamente activo y llena de agua el intestino, como lo hace la lactosa no digerida, dando lugar a diarrea. Si es grave, el gas y la diarrea dificultan la absorción de otros nutrientes como las grasas y las proteínas. El tratamiento más simple es el evitar el consumo de productos con alto contenido en lactosa. Otra alternativa puede ser ingerir el enzima lactasa conjuntamente con los productos lácteos.

Cuando falta la transferasa, la galactosa resulta muy tóxica

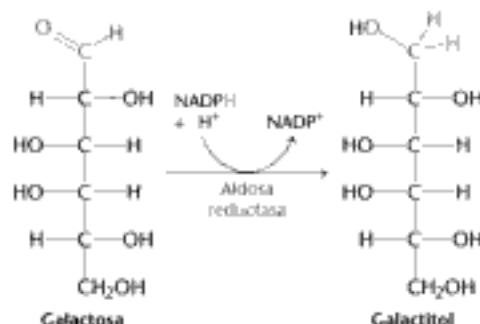
 Menos comunes que la intolerancia a la lactosa son los trastornos que interfieren en el metabolismo de la galactosa. La alteración del metabolismo de la galactosa se conoce como *galactosemia*. La forma más común, denominada galactosemia clásica, es una deficiencia hereditaria de la actividad galactosa I-fosfato uridiltransferasa. Los niños afectados no se desarrollan bien. Cuando consumen leche, presentan vómitos o diarreas, y es corriente el aumento en volumen del hígado e ictericia, que en ocasiones deriva en cirrosis. Se formarán cataratas y son también comunes el letargo y retraso mentales. El nivel de galactosa en sangre es muy elevado y aparece galactosa en la orina. Un criterio definitivo para el diagnóstico es la ausencia de la transferasa en los glóbulos rojos.

El tratamiento más empleado es la eliminación de la galactosa (y la lactosa) de la dieta. El enigma de la galactosemia es que, aún eliminando la galactosa de la dieta y evitando así los trastornos del hígado y el desarrollo de cataratas, la mayoría de los pacientes siguen sufriendo anomalías en el sistema nervioso central, normalmente un retraso en la adquisición del lenguaje. Las mujeres también presentan defectos en los ovarios.



Micrografía electrónica de barrido de *Lactobacillus*. Aquí se muestra la bacteria anaeróbica *Lactobacillus* (coloreada artificialmente) a una ampliación de 22 245X. Como sugiere su nombre, este género de bacteria fermenta glucosa a ácido láctico y es ampliamente utilizado en la industria alimentaria. *Lactobacillus* es también un componente de la flora bacteriana humana habitual del tracto urogenital donde, debido a su capacidad de generar un entorno ácido, evita el crecimiento de bacterias dañinas. [Dr. Dennis Kunkel/PhotoTake.]

La formación de cataratas se comprende mejor. Las cataratas consisten en el en turbamiento del cristalino ocular normalmente transparente. Si no resulta activa la transferasa del cristalino, la presencia de aldosa reductasa provoca la acumulación de galactosa que se reducirá a galactitol.



El galactitol es osmóticamente activo, y el agua se difundirá dentro del cristalino, provocando la formación de cataratas. De hecho, existe una alta incidencia de formación de cataratas con la edad en las poblaciones que siguen consumiendo gran cantidad de leche en la edad madura.

16.2 La vía glicolítica está rigurosamente controlada

La vía glicolítica tiene una función doble: degrada la glucosa para generar ATP y aporta precursores para reacciones sintéticas, tales como la formación de ácidos grasos. La velocidad de conversión de glucosa en piruvato está regulada para cubrir estas dos necesidades importantes de la célula. *En las vías metabólicas, los enzimas que catalizan reacciones esencialmente irreversibles son los puntos de control más probables.* En la glicolisis, las reacciones catalizadas por la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa son prácticamente irreversibles, de modo que cabe esperar que tengan funciones tanto catalíticas como reguladoras. De hecho, los tres enzimas son lugares de control. Estos enzimas se vuelven más o menos activos en respuesta a la unión reversible de efectores alostéricos o por modificación covalente. Además, las cantidades totales de estos enzimas clave se modifican por la regulación de la transcripción para ajustarse a las necesidades metabólicas del momento. El tiempo requerido para el control reversible alostérico, la regulación por fosforilación y el control transcripcional, son típicamente de milisegundos, segundos y horas respectivamente. Estudiaremos el control de la glicolisis en dos tejidos diferentes: músculo esquelético e hígado.

La glicolisis en el músculo está regulada para satisfacer las necesidades de ATP

La glicolisis en el músculo esquelético suministra ATP primeramente para potenciar la contracción. En consecuencia, el control primario de la glicolisis muscular es la carga energética de la célula, es decir, la relación entre ATP y AMP. Veamos cuáles de los enzimas reguladores clave responden a cambios de las cantidades de ATP y AMP presentes en la célula.

Fosfofructoquinasa La fosfofructoquinasa es el elemento de control más importante en la vía glicolítica en mamíferos (Figura 16.15). El enzima (un tetramero de 340 kd) es inhibido alostéricamente por niveles elevados de ATP. El ATP se une a un centro regulador específico distinto del centro catalítico. La unión del ATP hace disminuir la afinidad del enzima por la fructosa 6-fosfato. Una concentración de ATP elevada convierte la curva hiperbólica de unión de la fructosa 6-fosfato en una curva

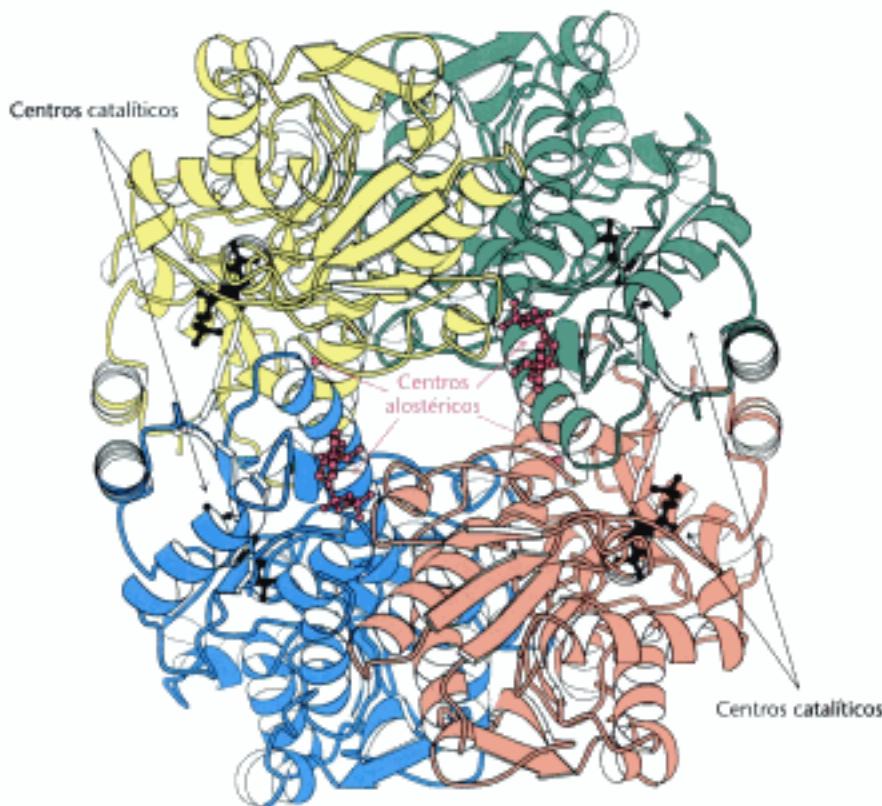


Figura 16.15 Estructura de la fosfofructoquinasa. La estructura de la fosfofructoquinasa de *E. coli* comprende un tetramero de cuatro subunidades idénticas. Obsérvese la separación de los centros catalíticos y alóstéricos. Cada subunidad del enzima hepático humano consta de dos dominios semejantes a los del enzima de *E. coli*. [Tomado de 1PFK.pdb.]

sigmoidea (Figura 16.16). La acción inhibitoria del ATP se contrarresta con el AMP, de modo que la actividad del enzima aumenta cuando disminuye la relación ATP/AMP. En otras palabras, cuando la carga energética es baja, la glicolisis se estimula. Una disminución del pH también inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa al aumentar el efecto inhibitorio del ATP. El pH debe caer cuando el músculo funciona de forma anaerobia, al producir cantidades excesivas de ácido láctico. El efecto inhibitor protege al músculo de la lesión que resultaría de la acumulación de un exceso de ácido.

¿Por qué el AMP y no el ADP es el regulador positivo de la fosfructoquinasa? Cuando el ATP está consumiéndose rápidamente, el enzima *adenilato quinasa* (Sección 9.4) puede formar nuevo ATP a partir de ADP por la siguiente reacción:



Por tanto, parte del ATP se regenera a partir del ADP, y es el AMP quien viene a indicar el estado de baja carga energética. Además, la utilidad del AMP como regulador alóstérico confiere un control especialmente sensible. Y se puede entender por qué considerando, primero, que el total de todas las formas de adenilato ([ATP], [ADP], [AMP]) en una célula permanece constante a corto plazo y, segundo, que la concentración de ATP es superior a la del ADP y ésta a su vez es superior a la del AMP. Como consecuencia, cambios pequeños en el porcentaje de [ATP] conducen a grandes cambios porcentuales en la concentración de los otros nucleótidos de adenina. Esta amplificación que va de pequeños cambios en [ATP] a grandes cambios en [AMP] conduce a un control más estricto al incrementar el margen de sensibilidad de la fosfofructoquinasa.

Hexoquinasa La fosfofructoquinasa es el enzima regulador más importante en la glicolisis, pero no es el único. La hexoquinasa, el enzima que cataliza la primera etapa de la glicolisis, se inhibe mediante su producto, la glucosa 6-fosfato. Altas con-

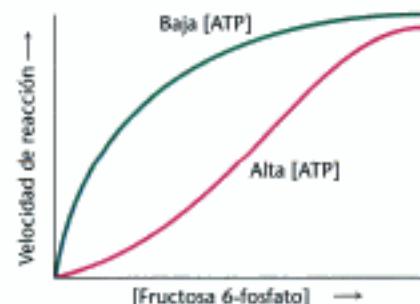


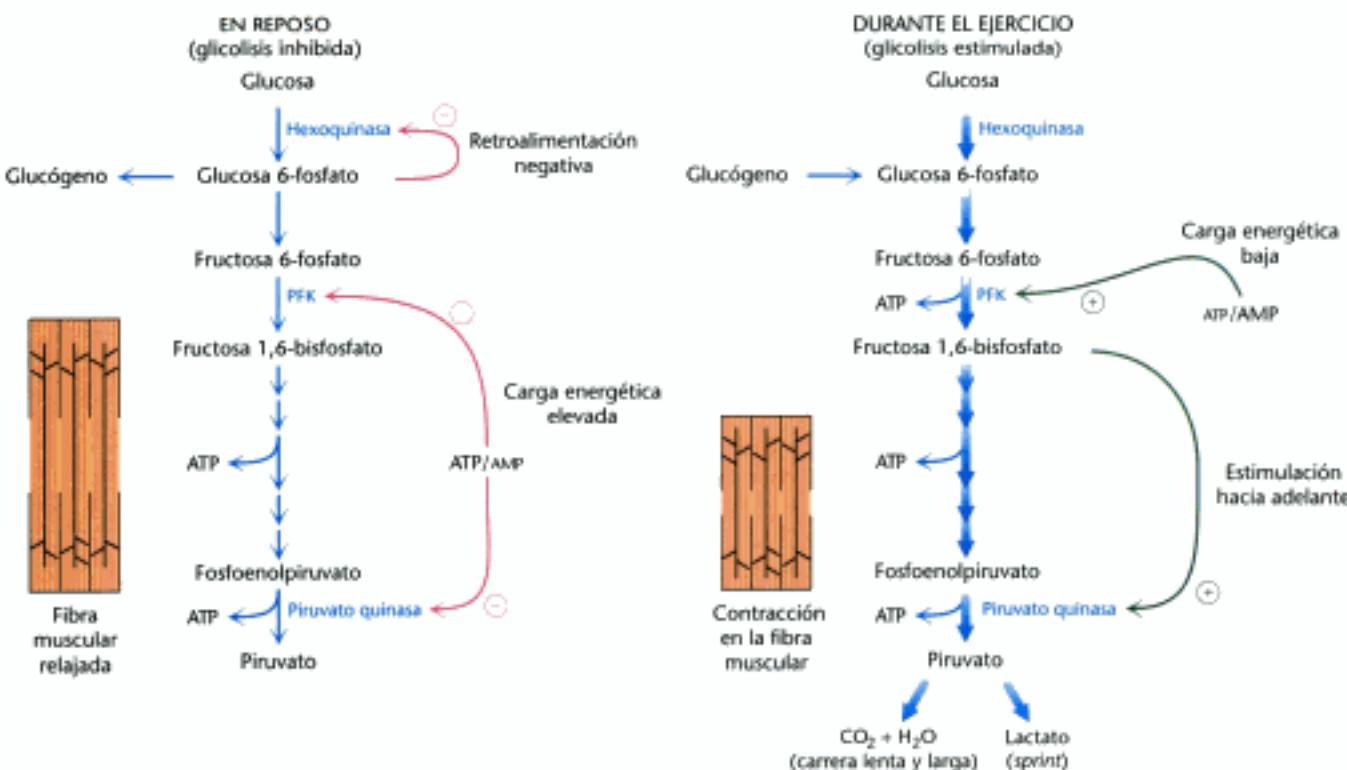
Figura 16.16 Regulación alóstérica de la fosfofructoquinasa. Un nivel alto de ATP inhibe al enzima disminuyendo su afinidad por la fructosa 6-fosfato. El AMP disminuye y el citrato aumenta el efecto de inhibición del ATP.

centraciones de esta molécula indican que la célula no requiere más glucosa como fuente de energía, o para la síntesis de glucógeno, una forma de almacenamiento de glucosa (p. 311) y la glucosa permanece en la sangre. Un aumento en la concentración de glucosa 6-fosfato es una manera por la cual la fosfofructoquinasa se comunica con la hexoquinasa. Cuando la fosfofructoquinasa es inactiva, aumenta la concentración de fructosa 6-fosfato. A su vez el nivel de glucosa 6-fosfato aumenta porque está en equilibrio con la fructosa 6-fosfato. Por consiguiente, *la inhibición de la fosfofructoquinasa conduce a la inhibición de la hexoquinasa*.

¿Por qué es la fosfofructoquinasa y no la hexoquinasa el enzima "marcapasos" de la glicolisis? La razón resulta evidente al advertir que la glucosa 6-fosfato no es únicamente un intermediario glicolítico. En el músculo la glucosa 6-fosfato puede también transformarse en glucógeno. La primera reacción irreversible característica de la vía glicolítica, el *paso comprometido* (Sección 10.1), es la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato. Así pues, resulta muy conveniente que sea la fosfofructoquinasa el punto principal de control de la glicolisis. En general, *el enzima que cataliza el paso comprometido de una secuencia metabólica es el elemento de control más importante de la vía*.

Figura 16.17 Regulación de la glicolisis en el músculo. En el reposo (izquierda) la glicolisis no es muy activa. La alta concentración de ATP inhibe a la fosfofructoquinasa (PFK), a la piruvato quinasa y a la hexoquinasa. La glucosa 6-fosfato se convierte en glucógeno (Capítulo 21). Durante el ejercicio (derecha) la disminución del cociente ATP/AMP resultante de la contracción muscular activa a la fosfofructoquinasa y por tanto a la glicolisis. Aumenta el flujo descendente de la vía, tal como lo representan las flechas gruesas.

Piruvato quinasa La piruvato quinasa, el enzima que cataliza la tercera etapa irreversible de la glicolisis, controla el flujo de esta vía. La última etapa produce ATP y piruvato, un intermediario metabólico crucial que puede o bien oxidarse o utilizarse como elemento de construcción. El ATP inhibe alostéricamente a la piruvato quinasa para frenar la glicolisis cuando la carga energética es elevada. Por último, la alanina (sintetizada a partir del piruvato en una sola etapa, p. 686) también inhibe alostéricamente a la piruvato quinasa: en este caso para señalar que los dos elementos de construcción son abundantes. Cuando aumenta el ritmo de la glicolisis, la fructosa 1,6-bisfosfato, el producto del paso precedente irreversible de la glicolisis, activa a la quinasa y la capacita para mantener el ritmo con el flujo creciente de intermediarios. Un resumen de la regulación de la glicolisis en el músculo en reposo y en actividad se representa en la Figura 16.17.



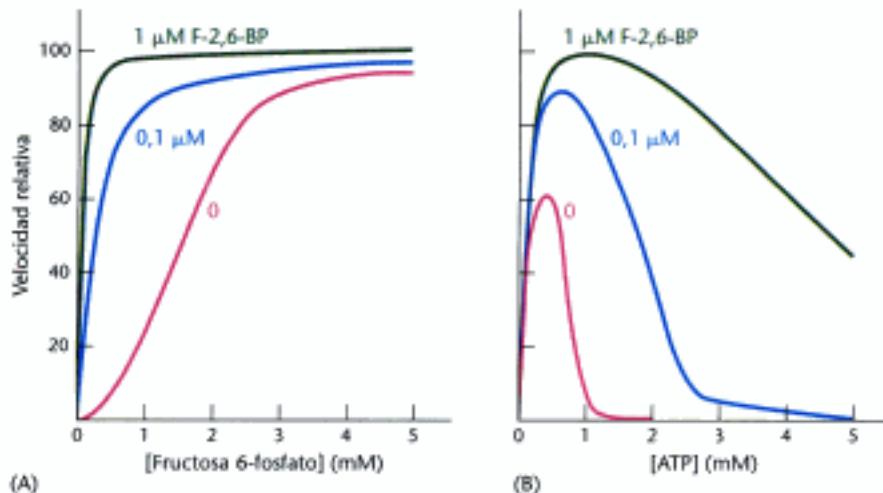


Figura 16.18 Activación de la fosfofructoquinasa por fructosa 2,6-bisfosfato. (A) El perfil sigmoidal de la velocidad frente a la concentración de sustrato se torna hiperbólico en presencia de fructosa 2,6-bisfosfato 1 μM. (B) El ATP, actuando como sustrato, estimula inicialmente la reacción. A medida que aumenta la concentración de ATP, éste actúa como un inhibidor alostérico. La fructosa 2,6-bisfosfato revierte la acción inhibitoria del ATP. [Tomado de E. Van Schafingen, M. F. Jett, L. Hue y H. G. Hers. Proc. Natl. Acad. Sci. 78(1981):3483.- 3486.]

La regulación de la glicolisis en el hígado refleja la versatilidad bioquímica de esa víscera

El hígado realiza más funciones bioquímicas que el músculo. De una forma clara, el hígado mantiene los niveles sanguíneos de glucosa: almacena la glucosa, en forma de glucógeno, cuando la glucosa es abundante, y la libera cuando los niveles son bajos. También utiliza la glucosa para generar poder reductor para la biosíntesis (p. 577), así como para sintetizar una serie de compuestos bioquímicos. Además, aunque el hígado dispone de muchos de los aspectos reguladores del músculo, la regulación de la glicolisis en el hígado es más compleja.

Fosfofructoquinasa Con respecto al ATP la regulación es igual en el hígado como en el músculo. El pH bajo no es una señal metabólica para el enzima hepático porque el lactato no se produce normalmente en el hígado.

La glicolisis también aporta esqueletos carbonados para la biosíntesis, de modo que una señal que indique si los elementos de construcción son abundantes o escasos debe también regular a la fosfofructoquinasa. En el hígado la fosfofructoquinasa resulta inhibida por el citrato, uno de los primeros intermediarios del ciclo del ácido cítrico (p. 482). Un nivel elevado de citrato en el citoplasma significa que abundan los precursores biosintéticos y por ello no hay necesidad de degradar más glucosa con este objetivo. El citrato inhibe la fosfofructoquinasa potenciando la inhibición debida al ATP.

Un modo por el cual la glicolisis del hígado responde a los cambios de glucosa en sangre es a través de la molécula señal *fructosa 2,6-bisfosfato* (F-2,6-BP), un activador potente de la fosfofructoquinasa (Figura 16.18). En el hígado, la concentración de fructosa 6-fosfato aumenta cuando la concentración de glucosa en sangre es elevada, y la abundancia de fructosa 6-fosfato acelera la síntesis de F-2,6-BP (Fig. 16.19). Por tanto, la abundancia de fructosa 6-fosfato da lugar a una mayor concentración de F-2,6-BP. La unión de la fructosa 2,6-bisfosfato acrecienta la afinidad de la fosfofructoquinasa por la fructosa 6-fosfato y disminuye el efecto inhibitorio del ATP. Así, la glicolisis resulta acelerada cuando abunda la glucosa. Este proceso se denomina *estimulación hacia delante*. Revisaremos la síntesis y degradación de esta importante molécula reguladora después de considerar la gluconeogénesis.

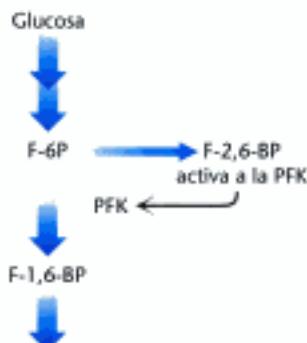
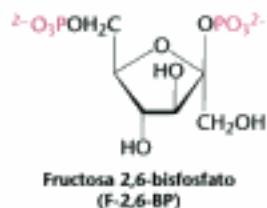


Figura 16.19 Regulación de la fosfofructoquinasa por la fructosa 2,6-bisfosfato. A concentraciones altas, la fructosa 6-fosfato (F-6P) activa al enzima fosfofructoquinasa (PFK) a través de un intermediario, la fructosa 2,6-bisfosfato (F-2,6-BP).



Hexoquinasa La reacción de la hexoquinasa en el hígado está controlada como en el músculo. Sin embargo, el hígado, de acuerdo con su función de control de los niveles de glucemia, posee otro isozima especializado de la hexoquinasa, llamado *glucoquinasa*, que no resulta inhibido por la glucosa 6-fosfato. La glucoquinasa fosforila la glucosa solamente cuando la glucosa es abundante debido a que la afinidad de la glucoquinasa por la glucosa es unas 50 veces menor que la de la hexoquinasa. El papel de la glucoquinasa es suministrar glucosa 6-fosfato para la síntesis de glucógeno y para la formación de ácidos grasos (Sección 22.1). La baja afinidad de este enzima del hígado por la glucosa confiere al cerebro y los músculos la primera opción para utilizar la glucosa cuando el aporte es limitado y, a la vez, asegura que la glucosa no será malgastada cuando abunda.

Piruvato quinasa En los mamíferos están presentes varias formas isoenzimáticas de piruvato quinasa, codificadas por diferentes genes: el tipo L predomina en el hígado (L de “liver”) y el tipo M en músculo y cerebro. Las formas L y M de la piruvato quinasa tienen muchas propiedades en común. De hecho, el enzima hepático se comporta casi como el muscular en cuanto a regulación alostérica. Sin embargo, las formas isoenzimáticas difieren en sus susceptibilidades de modificación covalente. Las propiedades de la forma L (pero no de la forma M) también están controladas por fosforilación reversible (Figura 16.20). Cuando el nivel de glucemia es bajo, el glucagón dispara la cascada del AMP cíclico (p. 466), lo que lleva a la fosforilación de la piruvato quinasa y, por tanto, hace disminuir su actividad. Esta fosforilación, disparada por la hormona, impide que el hígado consuma la glucosa cuando la necesitan con más urgencia el cerebro y el músculo (Sección 27.3). Aquí vemos un ejemplo típico de cómo los isoenzimas contribuyen a la diversidad metabólica de diferentes órganos. Volveremos al control de la glicolisis después de estudiar la gluconeogénesis.

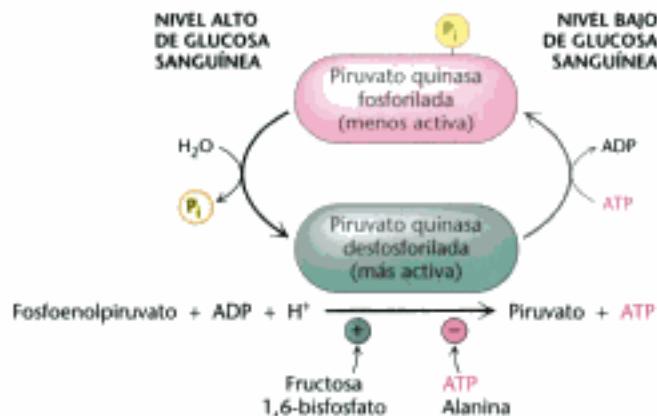


Figura 16.20 Control de la actividad catalítica de la piruvato quinasa. La piruvato quinasa se regula por efectores alostéricos y modificación covalente.

Una familia de transportadores posibilita la entrada y salida de glucosa en las células animales

El desplazamiento termodinámicamente favorecido, de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células animales está mediado por varios transportadores de glucosa. Cada miembro de esta familia de proteínas, llamados de GLUT1 a GLUT5, consta de una sola cadena polipeptídica de unos 500 residuos de longitud (Tabla 16.4). Cada transportador de glucosa presenta 12 hélices transmembrana de estructura semejante a la lactosa permeasa (Sección 13.3).

Los miembros de esta familia tienen comportamientos diferenciados:

TABLA 16.4 Familia de transportadores de glucosa

Nombre	Localización tisular	K_m	Comentarios
GLUT1	Todos los tejidos de mamífero	1 mM	Entrada de glucosa basal
GLUT2	Hígado y células β pancreáticas	15–20 mM	En el páncreas, desempeña un papel de regulación de la insulina En el hígado, retira el exceso de glucosa de la sangre
GLUT3	Todos los tejidos de mamífero	1 mM	Entrada de glucosa basal
GLUT4	Músculo y células adiposas	5 mM	Su cantidad aumenta en la membrana plasmática muscular en entrenamientos de resistencia
GLUT5	Intestino delgado	—	Transportador de fructosa principalmente

1. Los GLUT1 y GLUT3, presentes en casi todas las células de mamífero, son los responsables de la captación basal de glucosa. Sus valores de K_m para la glucosa son aproximadamente 1 mM, significativamente menores que los niveles normales de glucosa sérica, que oscilan normalmente entre 4 mM y 8 mM. Por consiguiente, GLUT1 y GLUT3 transportan glucosa continuamente al interior de la célula a una velocidad prácticamente constante.

2. El GLUT2, presente en el hígado y en las células pancreáticas β se distingue en que tiene una K_m para la glucosa muy elevada (de 15 a 20 mM). Por tanto, la glucosa entra en estos tejidos a una velocidad biológicamente significativa solamente cuando hay mucha glucosa en sangre. El páncreas puede así percibir el nivel de glucosa y ajustar adecuadamente la tasa de secreción de insulina. La insulina indica la necesidad de tomar glucosa de la sangre para almacenarla como glucógeno o convertirla en grasas (Sección 27.3). La elevada K_m de GLUT2 asegura también que la glucosa entre rápidamente en las células hepáticas sólo cuando es abundante.

3. El GLUT4, cuya K_m es 5 mM, transporta glucosa al músculo y a las células grasas. La presencia de insulina, que indica el estado de buena alimentación, induce un rápido aumento del número de transportadores GLUT4 en la membrana plasmática. Por consiguiente, la insulina promueve la captación de glucosa por el músculo y tejido adiposo. La cantidad de este transportador presente en las membranas del músculo aumenta como respuesta al ejercicio de entrenamiento intenso.

4. El GLUT5, presente en el intestino delgado, funciona principalmente como transportador de fructosa.

¶ Esta familia de transportadores ilustra vivamente cómo las isoformas de una sola proteína pueden caracterizar profundamente la conducta metabólica de las células y contribuir a su diversidad y especialización funcional. Los transportadores son miembros de una superfamilia de transportadores llamada la superfamilia de los principales facilitadores (MF). Los miembros de esta familia transportan azúcares en organismos tan diversos como *E. coli*, *Trypanosoma brucei* (un protozoo parásito que provoca la enfermedad del sueño) y los seres humanos. Una solución elegante al problema del transporte de combustible evolucionó tempranamente y se ha adaptado para cubrir las necesidades de diferentes organismos e incluso de diferentes tejidos.

El cáncer y el ejercicio continuado afectan a la glicólisis de forma semejante

¶ Hace décadas que se conoce que los tumores manifiestan velocidades incrementadas en la captación de glucosa y en la glicólisis. Ahora sabemos que estas mayores velocidades del metabolismo de la glucosa no son fundamentales para el desarrollo del cáncer, pero podemos preguntarnos qué ventaja selectiva pudieran conferir a las células cancerosas.

Las células cancerosas crecen más rápidamente que los vasos sanguíneos que las alimentan; por tanto, a medida que crecen los tumores sólidos son incapaces de ob-

TABLA 16.5 Proteínas del metabolismo de la glucosa codificadas por genes regulados por un factor inducible por hipoxia

GLUT 1
GLUT 3
Hexoquinasa
Fosfofructoquinasa
Aldolasa
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
Fosfoglicerato quinasa
Enolasa
Piruvato quinasa
Lactato deshidrogenasa

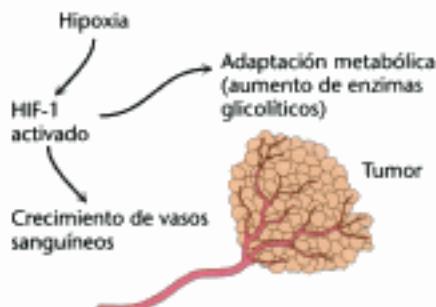


Figura 16.21 Alteración en tumores de la expresión de genes debida a hipoxia. Las condiciones de hipoxia existentes en el interior de la masa tumoral conducen a la activación del factor de transcripción (HIF-1) inducible por hipoxia, que a su vez induce la adaptación metabólica (aumento en enzimas glicolíticas) y activa factores angiogénicos que estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. [Adaptación de C. V. Dang y G. L. Semenza. Trends Biochem. Sci. 24(1999):68-72.]

tener oxígeno con eficacia. En otras palabras, comienzan a experimentar *hipoxia* o deficiencia de oxígeno. Bajo estas condiciones, la glicolisis que deriva hacia la fermentación láctica se convierte en la fuente principal de ATP. La glicolisis se hace más eficiente en los tumores hipóticos gracias a la acción de un factor de transcripción, *factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1)*. En ausencia de oxígeno, el HIF-1 aumenta la expresión de la mayoría de los enzimas glicolíticos y de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 (Tabla 16.5). De hecho, la captación de glucosa está correlacionada con la agresividad del tumor y con un mal pronóstico. Esta adaptación de las células cancerosas facilita la supervivencia del tumor hasta que se desarrolla la vascularización. El HIF-1 también estimula el crecimiento de nuevos tumores al aumentar la expresión de moléculas señal, tales como el factor de crecimiento endotelial de vasos (VEGF, “*vascular endothelial growth factor*”), que facilita el crecimiento de vasos sanguíneos (Figura 16.21). Sin la existencia de esta vascularización, el tumor dejaría de crecer y moriría o permanecería pequeño sin causar daño. Actualmente se hacen esfuerzos para desarrollar fármacos que inhiban la vascularización de los tumores.

Resulta interesante que el entrenamiento físico anaeróbico también active a HIF-1 con los mismos efectos vistos en el tumor: mejora la capacidad de generar ATP de forma anaeróbica y estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos. Estos efectos bioquímicos explican la mejora del desarrollo atlético que resulta del entrenamiento y demuestran que la conducta puede afectar a la bioquímica.

16.3 La glucosa puede sintetizarse a partir de precursores no carbohidratados

Veamos ahora la *síntesis de glucosa a partir de precursores no carbohidratados*, un proceso conocido como *gluconeogénesis*. El mantenimiento de los niveles de glucosa es importante porque el cerebro depende de la glucosa como combustible primario y los eritrocitos utilizan glucosa como combustible único. Los requerimientos diarios de glucosa del cerebro en un humano adulto normal son del orden de 120 g, lo que supone la mayor parte de los 160 g de glucosa requeridos diariamente por el organismo completo. La cantidad de glucosa presente en los líquidos corporales es de unos 20 g, y la que puede obtenerse del glucógeno, es de aproximadamente 190 g. Así pues, las reservas directas de glucosa son suficientes para cubrir las necesidades de glucosa de un día. La gluconeogénesis es especialmente importante en períodos largos de ayuno o inanición (p. 771).

La vía gluconeogénica convierte el piruvato en glucosa. Los precursores no carbohidratos de la glucosa se convierten primero en piruvato o entran en la vía a través de otros intermediarios, como el oxalacetato y la dihidroxiacetona fosfato (Figura 16.22). Los precursores no carbohidratos más importantes son el *lactato*, los *aminoácidos* y el *glicerol*. El lactato se forma en el músculo esquelético activo cuando la velocidad de la glicolisis supera la velocidad del metabolismo oxidativo. El lactato se convierte rápidamente en piruvato por la acción de la lactato deshidrogenasa (p. 447).

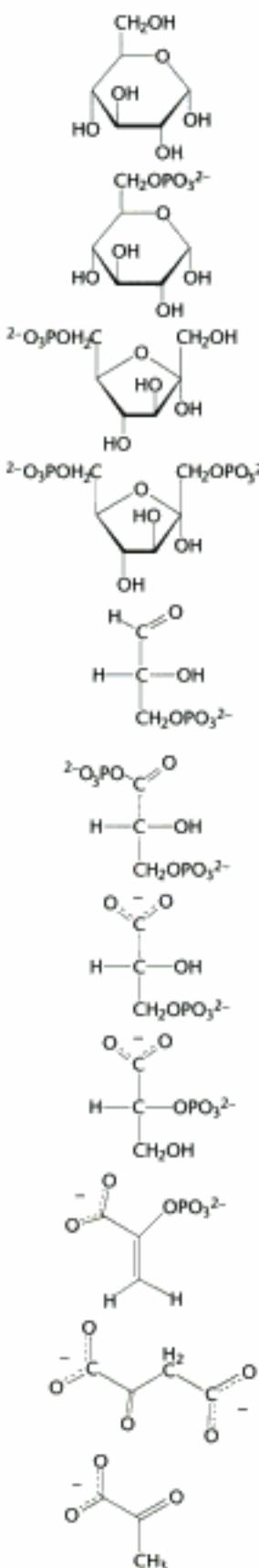
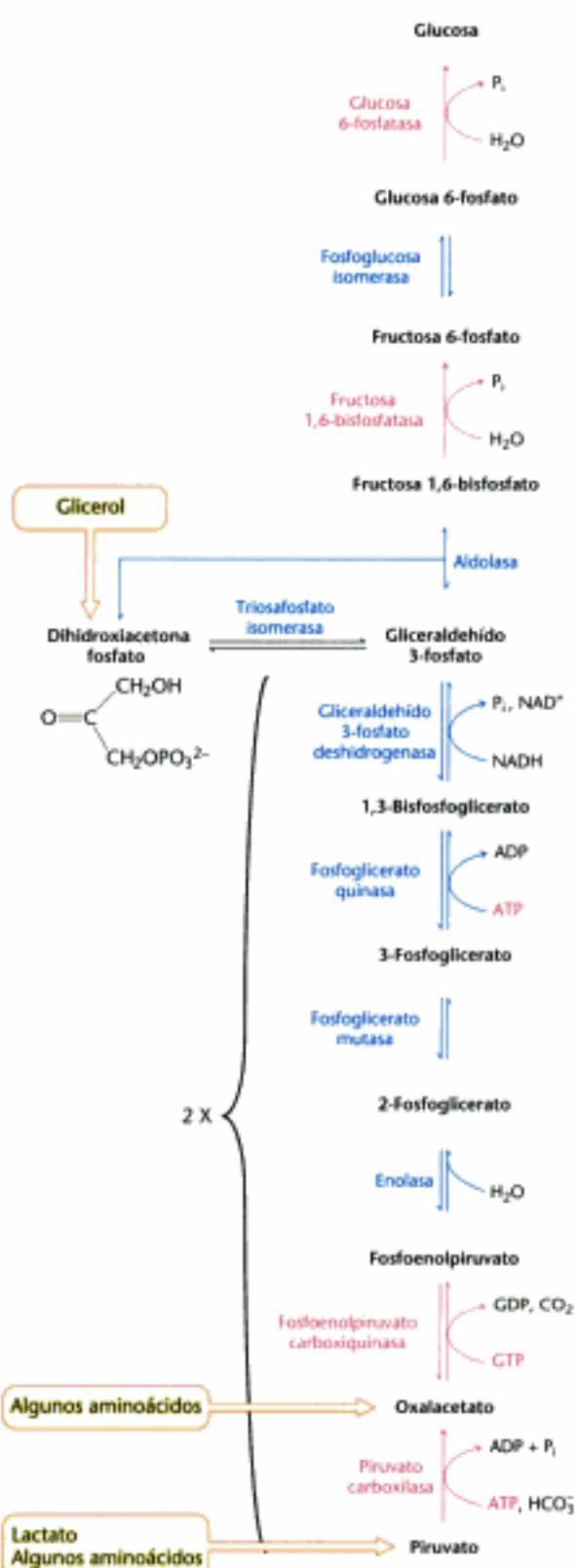
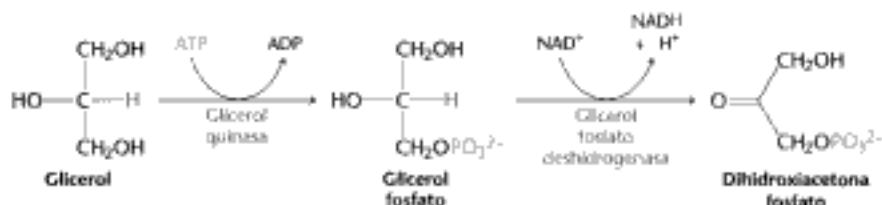


Figura 16.22 Vía de la gluconeogénesis. Las reacciones y enzimas característicos de esta vía se muestran en rojo. El resto de las reacciones son comunes a la glicolisis. Los enzimas de la gluconeogénesis se localizan en el citoplasma, excepto la piruvato carboxilasa (en la mitocondria) y glucosa 6-fosfatasa (unida a la membrana en el retículo endoplásmico). Se muestran los puntos de entrada para el lactato, glicerol y aminoácidos.

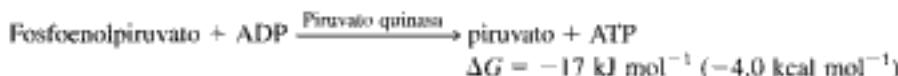
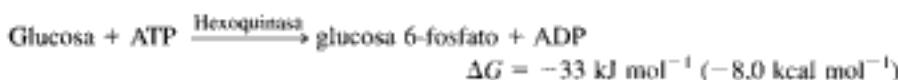
Los aminoácidos se derivan de las proteínas en la dieta, y durante el ayuno, de la destrucción de proteínas en el músculo esquelético (p. 650). La hidrólisis de triacilgliceroles (p. 621) en las células adiposas libera glicerol y ácidos grasos. El glicerol es un precursor de la glucosa, pero los ácidos grasos, en los animales, no pueden convertirse en glucosa, por razones que se estudiarán más adelante (p. 634). El glicerol puede entrar tanto en la vía gluconeogénica como en la glicolítica a través de la dihidroxiacetona fosfato.



El principal órgano donde tiene lugar la gluconeogénesis es el *hígado*, y una pequeña parte también en el *riñón*. En el cerebro, en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco tiene lugar muy poca gluconeogénesis. Más bien, *la gluconeogénesis en el hígado y riñón ayuda a mantener el nivel de glucosa sanguínea de modo que el cerebro y el músculo puedan extraer suficiente glucosa para atender sus demandas metabólicas*.

La gluconeogénesis no es la simple inversión de la glicolisis

En la glicolisis, la glucosa se convierte en piruvato; en la gluconeogénesis, el piruvato se convierte en glucosa. Sin embargo, *la gluconeogénesis no es el proceso inverso de la glicolisis*. Varias reacciones deben ser diferentes ya que el equilibrio de la glicolisis está muy desplazado hacia la formación de piruvato. El ΔG real para la formación del piruvato a partir de glucosa es del orden de -84 kJ mol^{-1} ($-20 \text{ kcal mol}^{-1}$) en condiciones celulares normales. La mayor parte de la disminución de energía libre de la glicolisis tiene lugar en tres pasos claramente irreversibles catalizados por la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa.



En la gluconeogénesis, estas reacciones de la glicolisis prácticamente irreversibles, se evitan sustituyéndolas por las siguientes reacciones nuevas:

1. El *fosfoenolpiruvato* se forma a partir del *piruvato* vía *oxalacetato* por la acción de la *piruvato carboxilasa* y la *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa*.



2. La fructosa 6-fosfato se forma a partir de fructosa 1,6-bisfosfato por hidrólisis del éster fosfato en el carbono 1. Esta hidrólisis exergónica está catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa.



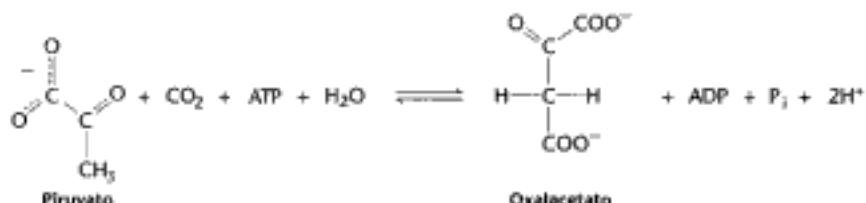
3. Por hidrólisis de la glucosa 6-fosfato se forma glucosa, en una reacción catalizada por la glucosa 6-fosfatasa.



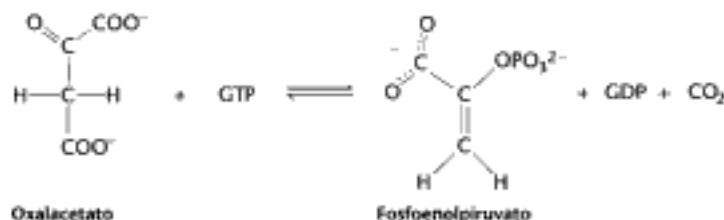
Examinaremos ordenadamente cada uno de estos pasos.

La conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato comienza con la formación de oxalacetato

El primer paso en la gluconeogénesis es la carboxilación del piruvato para formar oxalacetato a expensas de una molécula de ATP.



Después, el oxalacetato se descarboxila y fosforila para dar lugar a fosfoenolpiruvato a expensas del alto potencial de transferencia del grupo fosforilo del GTP.



La primera de estas reacciones tiene lugar en el interior de la mitocondria.

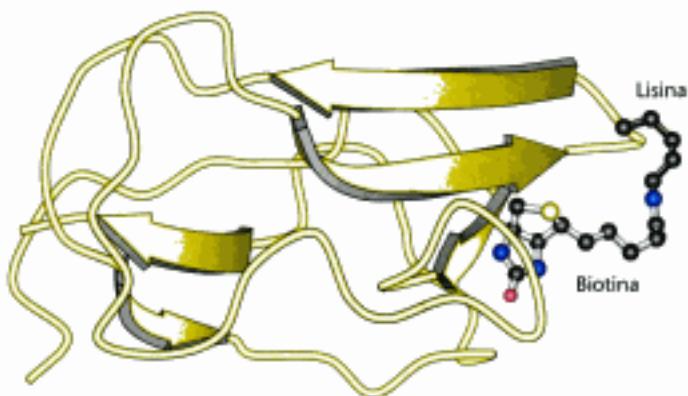
La primera reacción está catalizada por la piruvato carboxilasa y la segunda por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. La suma de estas reacciones es:



La piruvato carboxilasa tiene un interés especial debido a sus propiedades estructurales, catalíticas y alostéricas. La región N-terminal con 300 a 350 aminoácidos forma un *dominio de enganche al ATP* (Figura 16.23) que es un dominio de acti-



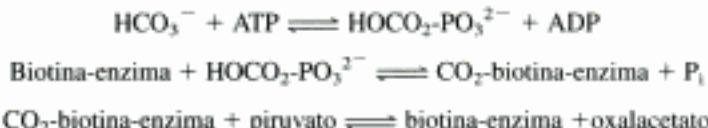
Figura 16.23 Estructura de los dominios de la piruvato-carboxilasa. El dominio de captación del ATP activa al HCO_3^- y transfiere CO_2 al dominio de unión a la biotina. Desde allí, el CO_2 se transfiere al piruvato captado por el dominio central.



 **Figura 16.24 Dominio de unión a la biotina de la piruvato carboxilasa.** Esta estructura aproximada está basada en la estructura de los dominios homólogos del enzima acetil-CoA carboxilasa (p. 635). Obsérvese que la biotina se encuentra en una cadena flexible, lo que le permite moverse entre el centro de ATP-bicarbonato y el de piruvato. [Tomado de 1BDO.pdb].

vación de ATP ampliamente utilizado como se verá con más detalle cuando investiguemos la biosíntesis de nucleótidos (p. 711). La región C-terminal de 80 aminoácidos constituye un dominio de unión de biotina (Figura 16.24) que se verá de nuevo en la síntesis de ácidos grasos (p. 635). La *biotina* es un grupo prostético que se une covalentemente, y sirve como un *transportador del CO₂ activado*. El grupo carboxilato de la biotina está unido al grupo ε-amino de un residuo específico de lisina por un enlace amida (Figura 16.25). Debe prestarse atención a que la biotina está unida a la piruvato carboxilasa por una *cadena larga y flexible*.

La carboxilación del piruvato tiene lugar en tres pasos:



Recordemos que, en disolución acuosa, el CO₂ existe como HCO₃⁻, el cual, con la ayuda de la anhidrasa carbónica (Sección 9.2), se activa y se convierte en carboxifosfato. Este CO₂ activado se une después al átomo N-1 del anillo de la biotina para formar el intermediario carboxibiotina-enzima (Figura 16.25). El CO₂ unido a la biotina se encuentra muy activado. El ΔG°' de su escisión



es -20 kJ mol⁻¹ (-4,7 kcal mol⁻¹). Este ΔG°' negativo indica que la carboxibiotina es capaz de transferir CO₂ a aceptores sin necesidad de aportación adicional de energía libre.

El grupo carboxilo activado se transfiere entonces desde la carboxibiotina al piruvato para formar oxalacetato. El enlace largo y flexible entre la biotina y el enzima permite a este grupo prostético rotar desde un centro activo del enzima (el centro ATP-bicarbonato) al otro (el centro de piruvato).

La primera reacción parcial de la piruvato carboxilasa, la formación de la carboxibiotina, depende de la presencia de acetil-CoA. *La biotina no se carboxila hasta que el acetil-CoA esté unido al enzima.* El acetil-CoA no tiene efecto en la segunda reacción parcial. La activación alóstérica por el acetil-CoA de la piruvato carboxilasa es un mecanismo importante de control fisiológico que se verá con detalle en la página 493.

El oxalacetato se transporta al citoplasma y se convierte en fosfoenolpiruvato

La piruvato carboxilasa es un enzima mitocondrial, mientras que los otros enzimas de la gluconeogénesis son citoplasmáticos. El oxalacetato, producto de la reacción de la piruvato carboxilasa, debe trasportarse al citoplasma para completar la vía. El oxalacetato debe transportarse desde la mitocondria en forma de malato: por ello, el oxalacetato se reduce a malato dentro de la mitocondria por una malato deshidrogenasa unida a NADH. Una vez que el malato ha sido transportado a través de la membrana mitocondrial, se reoxida a oxalacetato en el citoplasma por otra malato deshidrogenasa ligada a NAD⁺ (Figura 16.26). La formación de oxalacetato a partir de malato también aporta NADH para utilizarlo en los pasos siguientes de la gluconeogénesis. Finalmente, el oxalacetato se *descarboxila y fosforila* simultáneamente por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa para generar fosfoenolpiruvato. El dador del grupo fosforilo es el GTP. El CO₂ añadido al piruvato por la piruvato carboxilasa se separa en este paso.

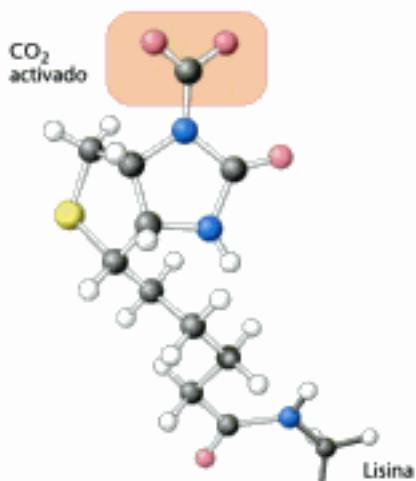


Figura 16.25 Estructura de la carboxibiotina.

¿Por qué se necesita una carboxilación y una descarboxilación para formar fosfoenolpiruvato a partir del piruvato? Recordemos que en la glicólisis, la presencia de un grupo fosforilo atrapa el isómero inestable del piruvato como fosfoenolpiruvato (p. 445). Sin embargo, la adición de un grupo fosforilo al piruvato es una reacción muy desfavorable: el ΔG° de la reacción inversa de la glicólisis, catalizada por la piruvato quinasa, es de $+31 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). En la gluconeogénesis, el uso de los pasos de carboxilación y descarboxilación supone un ΔG° mucho más favorable. La formación del fosfoenolpiruvato desde el piruvato en la vía gluconeogénica tiene un ΔG° de $+0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$). La molécula de ATP se utiliza para potenciar la adición del CO_2 al piruvato en el paso de la carboxilación. Este CO_2 es después eliminado para facilitar la formación del fosfoenolpiruvato en el paso de la descarboxilación. *Las descarboxilaciones facilitan a menudo reacciones que de otro modo serían altamente endergónicas.* Un dispositivo metabólico análogo se utiliza en el ciclo del ácido cítrico (Sección 17.1), en la vía de las pentosas fosfato (p. 577) y en la síntesis de ácidos grasos (p. 636).

La conversión de fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato y ortofosfato es un paso irreversible

Después de su formación, el fosfoenolpiruvato se metaboliza por los enzimas de la glicólisis pero en sentido inverso. Estas reacciones, en las condiciones intracelulares, se encuentran cerca del equilibrio; de modo que, cuando la gluconeogénesis está favorecida, tendrán lugar las reacciones inversas hasta que se alcance el siguiente paso irreversible. Este paso es la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato a fructosa 6-fosfato y P_i .



El enzima responsable de este paso es la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Como ocurre con su homólogo glicolítico, es un enzima alostérico que participa en la regulación de la gluconeogénesis. Retomaremos más adelante en este capítulo el estudio de sus propiedades reguladoras.

La generación de glucosa libre es un importante punto de control

La fructosa 6-fosfato generada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa se convierte rápidamente en glucosa 6-fosfato. En la mayoría de los tejidos, la gluconeogénesis finaliza en este punto. No se produce glucosa libre; mejor dicho, la glucosa 6-fosfato se procesa de otro modo, principalmente para formar glucógeno. Una de las ventajas de que la gluconeogénesis acabe en glucosa 6-fosfato es que, al contrario de la glucosa libre, la molécula no se transporta fuera de la célula. Para mantener la glucosa dentro de la célula, la generación de glucosa libre se controla de dos maneras. Primera, el enzima responsable de la conversión de glucosa 6-fosfato en glucosa, la glucosa 6-fosfatasa, está regulada. Segunda, el enzima se encuentra presente solamente en tejidos cuya función metabólica es mantener la homeostasis de glucosa en sangre, es decir, tejidos que liberan glucosa a la sangre. Estos tejidos son el hígado y en menor grado los riñones.

El último paso en la generación de glucosa no tiene lugar en el citoplasma, sino que la glucosa 6-fosfato se transporta al lumen del retículo endoplasmático. Allí se hidroliza a glucosa gracias a la glucosa 6-fosfatasa, que está unida a la membrana (Figura 16.27). Para la actividad fosfatasa es esencial la asociación de una proteína estabilizadora que une Ca^{2+} . La glucosa y el P_i se transportan de nuevo al citoplasma gracias a un par de transportadores. El transportador de glucosa de la membrana del retículo endoplasmático es como los que se encuentran en la membrana plasmática (Sección 16.2.4). Es llamativo que se necesiten cinco proteínas para transformar la glucosa 6-fosfato citoplasmática en glucosa libre.

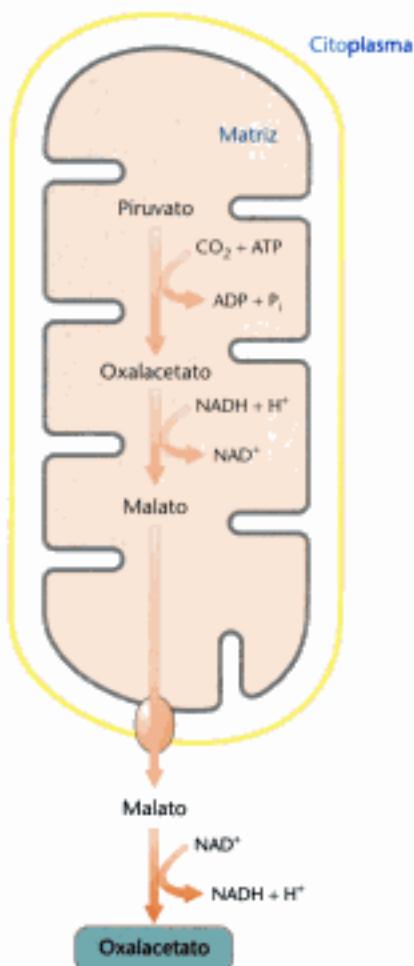
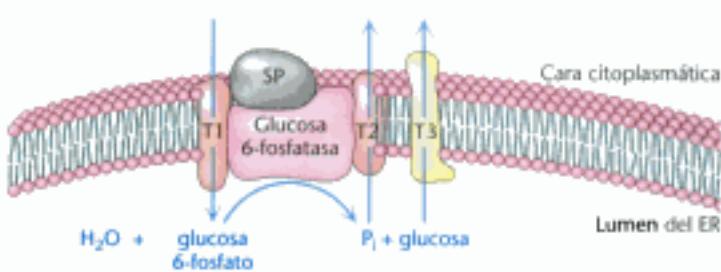


Figura 16.26 Cooperación entre compartimentos. El oxalacetato se forma en la matriz mitocondrial por carboxilación del piruvato y se utiliza en el citoplasma para la gluconeogénesis. El oxalacetato abandona la mitocondria a través de un sistema transportador específico (no mostrado) en forma de malato, el cual es reoxidado a oxalacetato en el citoplasma.

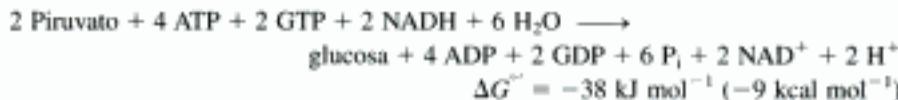
Figura 16.27 Generación de glucosa a partir de glucosa 6-fosfato. Varias proteínas del retículo endoplasmático (ER) juegan su papel en la generación de glucosa a partir de glucosa 6-fosfato. T1 transporta glucosa 6-fosfato al lumen del ER, mientras que T2 y T3 transportan P_i y glucosa, respectivamente, de vuelta al citoplasma. La glucosa 6-fosfatasa se estabiliza gracias a una proteína que une Ca^{2+} (SP). [Tomado de A. Buchell y I. D. Waddel. *Biochem. Biophys. Acta* 1092(1991):129-137.]



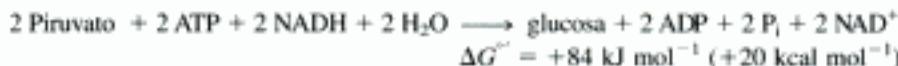
En la síntesis de glucosa a partir de piruvato se consumen seis enlaces fosfato de alta energía

La formación de glucosa a partir del piruvato es energéticamente desfavorable a menos que esté acoplada a reacciones que la vuelvan favorable. Comparemos la estequiométría de la gluconeogénesis con la inversa de la glicolisis.

La estequiometría de la gluconeogénesis es:



Por el contrario, la estequiometría de la reacción inversa de la glicolisis sería:



Obsérvese que en la síntesis de glucosa a partir de piruvato, vía gluconeogénesis, se hidrolizan *seis* moléculas de nucleótido trifosfato, mientras que en la conversión de glucosa en piruvato, vía glicolisis, sólo se generan *dos* moléculas de ATP. Por tanto, el coste extra de la gluconeogénesis es de cuatro moléculas de alto potencial de transferencia de grupo fosforilo por cada molécula de glucosa sintetizada a partir de piruvato. Se necesitan las cuatro moléculas adicionales de alto potencial de transferencia de grupo fosforilo para convertir un proceso energéticamente desfavorable (el inverso de la glicolisis) en otro favorable (gluconeogénesis). Este es un claro ejemplo de reacciones acopladas: la hidrólisis del ATP se utiliza para potenciar una reacción energéticamente desfavorecida.

16.4 La gluconeogénesis y la glicolisis se regulan de forma recíproca

La gluconeogénesis y la glicolisis están coordinadas de modo que una de las vías es relativamente inactiva mientras que la otra presenta una actividad elevada. Si ambas series de reacciones fueran muy activas al mismo tiempo, el resultado neto sería de hidrólisis de cuatro nucleótidos trifosfato (dos ATPs y dos GTPs) por cada ciclo de reacción. Tanto la glicolisis como la gluconeogénesis, en condiciones celulares, son altamente exergónicas, de modo que no existe barrera termodinámica alguna para este ciclo. Sin embargo, las *cantidad*s y las *actividades* de los enzimas característicos de cada vía están controladas de modo que ambas vías no puedan ser muy activas simultáneamente. La velocidad de la glicolisis viene también determinada por la concentración de glucosa, y la velocidad de la gluconeogénesis por las concentraciones de lactato y otros precursores de la glucosa. La condición básica de la regulación recíproca es que, cuando se necesita energía, va a predo-

minar la glicolisis. Cuando hay un superávit de energía tendrá lugar la gluconeogénesis.

La carga energética va a determinar si será más activa la glicolisis o la gluconeogénesis

El primer sitio importante de regulación es la interconversión entre la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-bisfosfato (Fig. 16.28). Consideremos primero la situación en la que se necesita energía. En este caso la concentración de AMP es elevada. En estas condiciones, el AMP estimula a la fosfofructoquinasa a la vez que inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Entonces la glicolisis se conecta y la gluconeogénesis se inhibe. Por el contrario, niveles elevados de ATP y citrato indican que la carga energética es alta y que abundan los intermediarios biosintéticos. El ATP y el citrato inhiben a la fosfofructoquinasa, mientras que el citrato activa a la fructosa 1,6-bisfosfatasa. En estas condiciones la glicolisis prácticamente se desconecta y se promueve la gluconeogénesis. ¿Por qué en este esquema regulador participa el citrato? Tal como veremos en el Capítulo 17, el citrato da cuenta del estado del ciclo del ácido cítrico, que es la vía primaria para oxidar los combustibles en presencia de oxígeno. Niveles altos de citrato indican una situación rica en energía y presencia de precursores para la biosíntesis.

La glicolisis y la gluconeogénesis también se regulan de forma recíproca mediante la interconversión, en el hígado, del fosfoenolpiruvato y el piruvato. El enzima glicolítico piruvato quinasa se inhibe por los efectores alostéricos ATP y alanina, los cuales señalan que la carga energética es elevada y abundan los bloques de

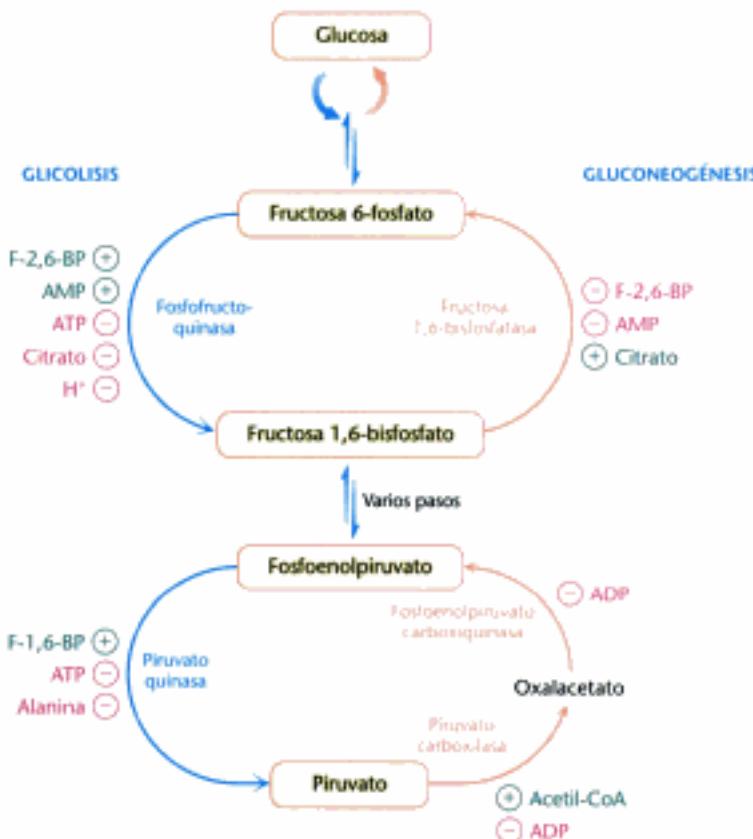


Figura 16.28 Regulación recíproca de la gluconeogénesis y glicolisis en el hígado. El nivel de fructosa 2,6-bisfosfato es alto en el estado alimentado y bajo en el ayuno. Durante el ayuno, la inhibición de la piruvato quinasa, por fosforilación, es otro control importante.

construcción. Inversamente, la piruvato carboxilasa, que cataliza el primer paso de la gluconeogénesis a partir del piruvato, resulta inhibida por el ADP. Igualmente el ADP también inhibe a la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. La piruvato carboxilasa se activa por el acetil-CoA, el cual, como el citrato, indica que el ciclo del ácido cítrico está produciendo energía e intermediarios biosintéticos (Capítulo 17). Por consiguiente, la gluconeogénesis resulta favorecida cuando la célula es rica en precursores biosintéticos y en ATP.

El balance entre la glicolisis y la gluconeogénesis en el hígado es sensible a la concentración sanguínea de glucosa

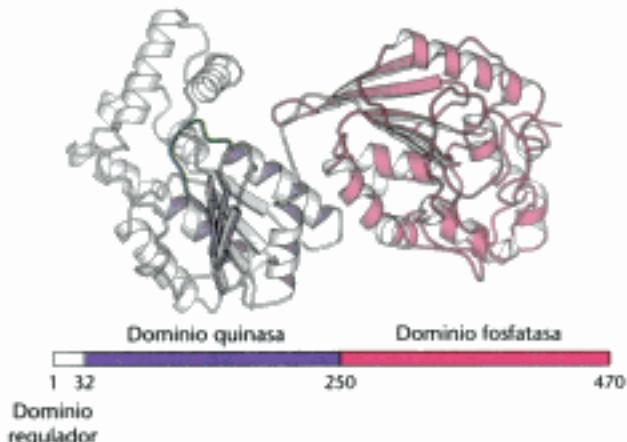
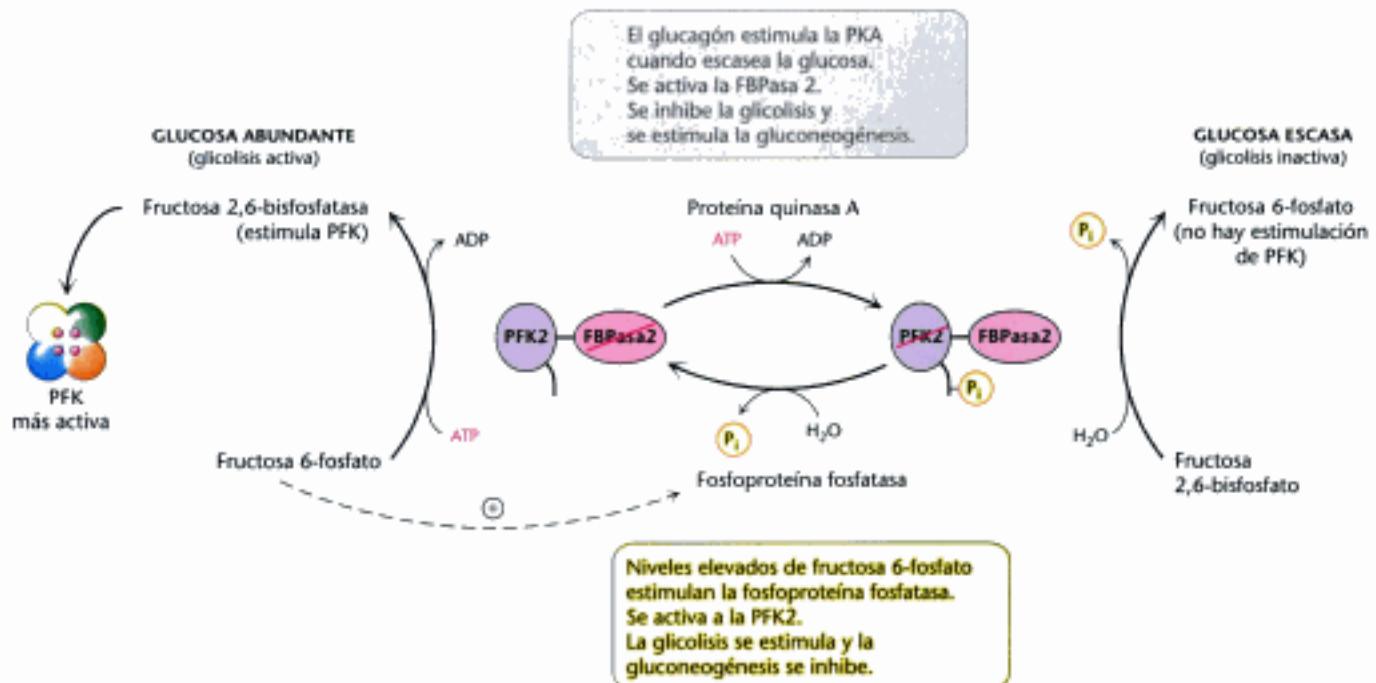


Figura 16.29 Estructura en dominios del enzima bifuncional fosfofructoquinasa 2. El dominio quinasa (en púrpura) está fundido con el dominio fosfatasa (en rojo). El dominio quinasa es un dominio NTP hidrolasa con lazo P, como se indica con el sombreado púrpura (p. 267). La barra representa la secuencia de aminoácidos del enzima. [Tomado de 1BIF.pdb.]

En el hígado las velocidades de la glicolisis y la gluconeogénesis se ajustan para mantener los niveles de glucosa en sangre. La fructosa 2,6-bisfosfato estimula fuertemente a la fosfofructoquinasa e inhibe a la F-1,6-bisfosfatasa (p. 455). Cuando la glucemia es baja, la fructosa 2,6-bisfosfato pierde un grupo fosforilo y se convierte en fructosa 6-fosfato, la cual no sigue unida a la PFK. ¿Cómo consigue la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato controlar la subida y bajada de los niveles de glucosa en sangre? Hay dos enzimas que regulan la concentración de este enzima: uno fosforila a la fructosa 6-fosfato y el otro desfosforila a la fructosa 2,6-bisfosfato. La fructosa 2,6-bisfosfato se forma mediante una reacción catalizada por la fosfofructoquinasa 2 (PFK2), un enzima distinto de la fosfofructoquinasa. La fructosa 6-fosfato se forma por la hidrólisis de la fructosa 2,6-bisfosfato catalizada por una fosfatasa específica, la fructosa bisfosfatasa 2 (FBPasa 2). Un descubrimiento llamativo es que ambos enzimas, PFK2 y FBPasa 2 están presentes en una única cadena polipeptídica de 55 kd (Fig. 16.19). Este enzima bifuncional contiene un dominio regulador en el extremo N-terminal, seguido por un dominio quinasa y un dominio fosfatasa. La PFK2 se parece a la adenilato quinasa en que tiene un dominio NTPasa con lazo P (p. 267), mientras que la FBPasa 2 se parece a la fosfoglicerato mutasa (p. 444). Recordemos que la mutasa es esencialmente una fosfatasa. En el enzima bifuncional, la actividad fosfatásica ha evolucionado para volverse específica para la F-2,6-BP. El propio enzima bifuncional probablemente se originó por la fusión de los genes que codificaban los dominios quinasa y fosfatasa.

¿Qué es lo que controla el predominio en las actividades de la PFK2 o la FBPasa 2 en el hígado? Estas actividades están controladas de forma recíproca por la fosforilación de un único residuo de serina. Cuando escasea la glucosa, como ocurre durante el ayuno nocturno, un aumento del nivel sanguíneo de la hormona glucagón dispara la señal en cascada del AMP cíclico (Sección 14.1) conduciendo a la fosforilación de este enzima bifuncional por la proteína quinasa A (Fig. 16.30). Esta modificación covalente activa a la FBPasa 2 e inhibe a la PFK2, lo que hace bajar el nivel de F-2,6-BP. Entonces predomina la gluconeogénesis. La glucosa formada en el hígado en estas condiciones resulta esencial para la viabilidad del cerebro. La estimulación por glucagón de la proteína quinasa A también inactiva a la piruvato quinasa del hígado (p. 456).

Inversamente, cuando los niveles de glucemia son elevados, como ocurre después de una comida, la gluconeogénesis no se necesita y se separa el grupo fosforilo del enzima bifuncional. Esta modificación covalente activa a la PFK2 e inhibe a la FBPasa 2. El aumento de nivel de la F-2,6-BP acelera la glicolisis. El control coordinado de la glicolisis y la gluconeogénesis resulta facilitado por la localización de los dominios de la quinasa y la fosfatasa en la misma cadena polipeptídica que el dominio regulador.



Las hormonas insulina y glucagón también regulan las cantidades de enzimas esenciales. Estas hormonas alteran la expresión génica primariamente cambiando la velocidad de la transcripción. Los niveles de insulina aumentan después de las comidas cuando abunda la glucosa para la glicólisis. Para potenciar la glicólisis, la insulina estimula la expresión de la fosfofructoquinasa, la piruvato quinasa y del enzima bifuncional que fabrica y destruye a la F-2,6-BP. El glucagón aumenta durante el ayuno, cuando se necesita la gluconeogénesis para suplir la escasez de glucosa. Para potenciar la gluconeogénesis, el glucagón inhibe la expresión de los tres enzimas glicolíticos regulables y estimula a su vez de los dos enzimas clave gluconeogénicos, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la fructosa 1,6-bisfosfatasa. El control transcripcional en los eucariotas es mucho más lento que el control alostérico, tardando horas o días en vez de segundos a minutos. La riqueza y complejidad del control hormonal son gráficamente manifiestos en el promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, el cual contiene secuencias reguladoras que responden a insulina, glucagón (a través de elementos de respuesta al cAMP), glucocorticoides y hormona tiroidea (Fig. 16.31).

Los ciclos de sustrato amplifican las señales metabólicas y producen calor

Una pareja de reacciones como la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato y la hidrólisis de ésta volviendo a fructosa 6-fosfato constituyen un *ciclo de sustrato*. Como ya se ha mencionado, ambas reacciones no son plenamente activas al mismo tiempo en la mayoría de las células gracias a controles alostéricos recíprocos. Sin embargo, investigaciones de marcaje isotópico han demostrado que, durante la gluconeogénesis, se produce cierta fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato. Un cierto grado de proceso cíclico también se da en otras parejas de reacciones opuestas de carácter irreversible. Este proceso cíclico se consideraba como una imperfección del control metabólico, de modo que a veces se ha

Figura 16.30 Control de la síntesis y degradación de la fructosa 2,6-bisfosfatasa. Una glucemia baja, señalada por el glucagón, conduce a la fosforilación del enzima bifuncional y por tanto baja el nivel de fructosa 2,6-bisfotato, lo que hace más lenta la glicólisis. Niveles altos de fructosa 6-fosfato aceleran la formación de fructosa 2,6-bisfotato al facilitar la desfosforilación del enzima bifuncional.



Figura 16.31 El promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Este promotor consta aproximadamente de 500 pb y contiene secuencias reguladoras (elementos de respuesta) que median en la acción de varias hormonas. Abreviaturas: IRE, elemento de respuesta a insulina (*insulin response element*); GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides (*glucocorticoid response element*); TRE, elemento de respuesta a hormonas tiroideas (*thyroid hormone response element*); CREI y CREII, elementos de respuesta a cAMP (*cAMP response elements*). [Tomado de M. M. McGrane, J. S. Jun, Y. M. Patel y R. W. Hanson. Trends Biochem. Sci. 17(1992):40-44.]

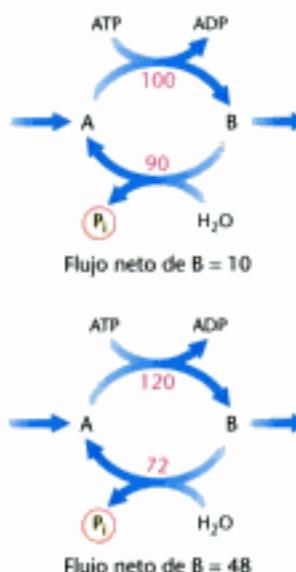


Figura 16.32 Ciclo de sustrato. Este ciclo conducido por ATP opera a dos velocidades diferentes. Un cambio pequeño en las velocidades de las dos reacciones opuestas produce en una gran modificación en el flujo neto del producto B.

llamado a los ciclos de sustrato *ciclos fáctiles o inútiles*. De hecho, existen condiciones patológicas, como por ejemplo la hipertermia maligna, en la que no existe control y las dos vías transcurren de forma inmediata con la consiguiente generación de calor debido a la rápida e incontrolada hidrólisis de ATP.

A pesar de estas circunstancias tan extraordinarias, actualmente parece que los ciclos de sustrato son importantes desde el punto de vista biológico. Una posibilidad es que *los ciclos de sustrato amplifiquen señales metabólicas*. Supongamos que la velocidad de conversión de A en B sea 100 y de B en A sea 90, originando un flujo inicial neto de 10. Imaginemos que un efector alostérico incrementa la velocidad A hacia B en un 20%, es decir, a 120, e inversamente disminuye la velocidad B hacia A en otro 20%, por tanto, a 72. El nuevo flujo neto sería 48, de tal manera que un cambio de un 20% en las velocidades de las reacciones opuestas habría originado un incremento del 380% en el flujo neto. En el ejemplo representado en la Figura 16.32 esta amplificación se consigue por medio de la hidrólisis rápida del ATP. Se ha sugerido que el flujo a través de la vía glicolítica puede aumentar hasta 1000 veces al inicio de un ejercicio intenso. La existencia de los ciclos de sustrato puede explicar en parte el rápido aumento de la velocidad de la glicolisis, ya que parece improbable que este incremento del flujo sea debido únicamente a una activación alostérica de los enzimas.

El otro posible papel biológico de los ciclos de sustrato es la *generación de calor debida a la hidrólisis de ATP*. Un ejemplo llamativo lo constituyen los abejorros que han de mantener una temperatura torácica de unos 30 °C para poder volar. Un abejorro es capaz de mantener esta elevada temperatura y volar en busca de alimento aun cuando la temperatura ambiental sea de tan solo 10 °C, porque en sus músculos de vuelo son simultáneamente muy activas tanto la fosfofructoquinasa como la fructosa 1,6-bisfosfatasa; la hidrólisis continua de ATP genera calor. Esta bisfosfatasa no es inhibida por AMP, lo que sugiere que este enzima está diseñado especialmente para la generación de calor.

El lactato y la alanina formados en el músculo en contracción son utilizados por otros órganos

El lactato producido por el músculo esquelético activo y por los eritrocitos es una fuente de energía para otros órganos. Los eritrocitos carecen de mitocondrias y no pueden oxidar completamente la glucosa. Durante el ejercicio vigoroso, cuando se contrae el músculo esquelético, la velocidad a la cual se produce piruvato, vía glicolisis, supera la velocidad de oxidación, vía ciclo del ácido cítrico. En estas células, la lactato deshidrogenasa reduce el exceso de piruvato a lactato para restaurar el balance redox (p. 447). Sin embargo, el lactato es un punto muerto en el metabolismo. Debe ser convertido de nuevo a piruvato para ser metabolizado. Tanto el piruvato como el lactato difunden al exterior de estas células por medio de transportadores hacia la sangre. En el músculo esquelético en contracción, la formación y liberación de lactato permite al músculo generar ATP en ausencia de oxígeno y desplaza el trabajo de metabolizar el

lactato desde el músculo a otros órganos. El piruvato y el lactato de la sangre tienen dos destinos. En uno de ellos, las membranas plasmáticas de algunas células, especialmente las del músculo cardíaco, contienen ciertos transportadores que las hacen muy permeables al lactato y piruvato. Estas moléculas difunden pues desde la sangre a estas células permeables. Una vez dentro de estas células bien oxigenadas, el lactato se revierte a piruvato y éste se metaboliza a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa para generar ATP. El uso por estas células de lactato en vez de glucosa incrementa la posibilidad de que la glucosa circulante pueda quedar disponible para las células musculares activas. En el segundo destino, el exceso de lactato entra en el hígado y se convierte primero en piruvato y después en glucosa por la vía de la gluconeogénesis.

La contracción del músculo esquelético suministra lactato al hígado, que lo usa para sintetizar y liberar glucosa. Así pues, el hígado restablece el nivel de glucosa necesario para las células musculares activas, las cuales obtienen ATP de la conversión glicolítica de la glucosa en lactato. Estas reacciones constituyen el ciclo de Cori (Fig. 16.33).

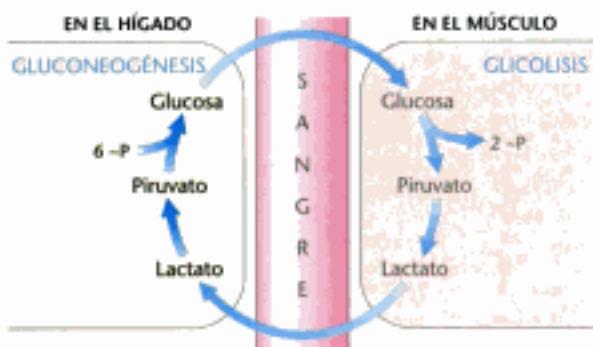


Figura 16.33 El ciclo de Cori. El lactato que se forma por la actividad muscular se convierte en glucosa en el hígado. Este ciclo desplaza al hígado parte de la carga metabólica del músculo activo.

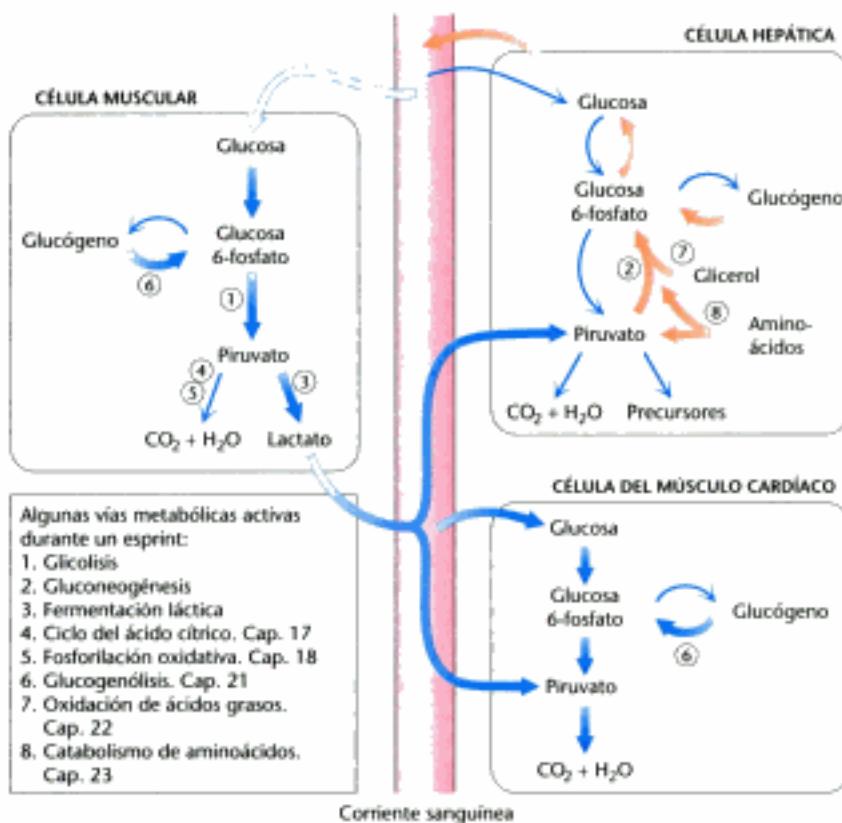


Figura 16.34 Integración de vías metabólicas. Cooperación entre glicólisis y gluconeogénesis durante el esprint. La glicólisis y la gluconeogénesis se coordinan de una manera específica de cada tejido, para asegurar que se cubren las necesidades de todas las células. Consideremos un esprinter. En los músculos esqueléticos de las piernas la glucosa se metabolizará de forma aeróbica a CO_2 y H_2O o, más probablemente, a lactato. En el músculo cardíaco, el lactato se puede convertir en piruvato y usar como combustible, junto con la glucosa, para potenciar los latidos cardíacos y mantener el flujo sanguíneo del esprinter. La gluconeogénesis, una función primaria del hígado, tendrá lugar rápidamente (flechas gruesas) para asegurar la presencia en sangre de suficiente glucosa para los músculos esqueléticos y cardíacos, al igual que para otros tejidos. El glucógeno, glicerol y aminoácidos son otras fuentes de energía que se estudiarán en capítulos posteriores.

También se ha demostrado que la alanina, como el lactato, es un precursor importante de la glucosa en el hígado. La alanina se genera en el músculo cuando se utilizan como combustible los esqueletos carbonados de algunos aminoácidos. El nitrógeno de estos aminoácidos se transfiere al piruvato para formar alanina (p. 660); en el hígado tiene lugar la reacción inversa. Este proceso también ayuda a mantener el balance de nitrógeno. En la Figura 16.34 se resume la interacción entre la glicólisis y la gluconeogénesis, y muestra cómo estas vías cubren las necesidades energéticas de diferentes tipos de células.

Las formas isozimáticas de la lactato deshidrogenasa de diferentes tejidos catalizan la interconversión de piruvato y lactato. La lactato deshidrogenasa es un tetramero de dos tipos de subunidades de 35 kd codificadas por genes similares: el tipo H (*heart*) predomina en el corazón, y su homólogo tipo M en el músculo esquelético y en el hígado. Estas subunidades se asocian formando cinco tipos de tetrameros: H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 y M_4 . El isozima H_4 (tipo 1) tiene una mayor afinidad por los sustratos de la que tiene el isozima M_4 (tipo 5) y, a diferencia de M_4 , se inhibe alostéricamente por niveles altos de piruvato. Los otros isozimas tienen propiedades intermedias dependiendo de la proporción de las dos clases de cadenas. H_4 tiene designada la oxidación del lactato a piruvato, el cual lo utilizará el corazón como combustible a través del metabolismo aeróbico. De hecho, el músculo cardíaco nunca funciona de forma anaeróbica. Por el contrario, M_4 está optimizada para actuar en sentido inverso, para convertir piruvato en lactato y permitir que se dé la glicólisis en condiciones anaeróbicas. Vemos aquí un ejemplo de cómo la duplicación y divergencia de genes genera una serie de enzimas homólogas que facilitan la cooperación metabólica entre diversos órganos.

La glicólisis y la gluconeogénesis están entrecruzadas evolutivamente

El metabolismo de la glucosa es de origen arcaico. En la biosfera primitiva, los organismos vivientes dependían de la generación anaeróbica de energía hasta que, hace 2 mil millones de años, comenzaron a acumularse cantidades signifi-

ficativas de oxígeno. Lo más probable es que la mayoría de los enzimas glicolíticos hayan evolucionado con independencia en vez de hacerlo por duplicación de genes, porque enzimas con propiedades similares no tienen secuencias de aminoácidos semejantes. Aunque existen cuatro quinasas y dos isomerasas en la vía, las comparaciones tanto de secuencias como estructurales no sugieren que estas series de enzimas tengan una relación debida a una evolución divergente. Los únicos elementos importantes que se repiten en las deshidrogenasas son el dominio común de unión a dinucleótidos y los barriales $\alpha\beta$ (p. 449).

Podemos especular con la relación entre la glicolisis y la gluconeogénesis si pensamos en la glicolisis como vía consistente en dos segmentos: el metabolismo de las hexosas (segmento superior) y el metabolismo de las triosas (segmento inferior). Los enzimas del segmento superior son diferentes en algunas especies y faltan por completo en algunas árqueas, mientras que los enzimas del segmento inferior están bastante conservados. De hecho, cuatro de los enzimas del segmento inferior están presentes en todas las especies. *Esta parte inferior de la vía es común a la glicolisis y a la gluconeogénesis.* Es posible que esta parte común a las dos vías sea la más antigua, constituyendo el núcleo al cual se añadieron el resto de las etapas. La parte superior pudo haber variado dependiendo de los azúcares que se encontraban disponibles a los organismos en evolución en nichos particulares. Resulta interesante que esta parte central del metabolismo de carbohidratos pueda generar precursores de triosas para azúcares como la ribosa, un componente del RNA y un requerimiento crítico en el mundo del RNA. Por tanto, nos quedamos con la pregunta sin responder, ¿sirvió el núcleo primitivo de la vía para la conversión de la energía o para la biosíntesis?

Resumen

16.1 En muchos organismos la glicolisis es una vía de conversión de energía

La glicolisis es la secuencia de reacciones que convierten la glucosa en piruvato. Las 10 reacciones de la glicolisis tienen lugar en el citoplasma. En la primera etapa, la glucosa se convierte en fructosa 1,6-bisfosfato por una reacción de fosforilación seguida de una isomerización y de una segunda reacción de fosforilación. En estas reacciones se consumen dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, como preámbulo de la síntesis neta de ATP. En la segunda etapa, la aldolasa escinde la fructosa 1,6-bisfosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, que son fácilmente interconvertibles. En la tercera etapa, se genera ATP. El gliceraldehído 3-fosfato se oxida y fosforila para formar 1,3-bisfosfoglicerato, un acilfosfato con un alto potencial de transferencia de fosforilo. Esta molécula transfiere un grupo fosforilo al ADP para formar ATP y 3-fosfoglicerato. Se desplaza un fosforilo y se forma fosfoenolpiruvato por deshidratación, que constituye un segundo intermediario con alto potencial de transferencia de fosforilo. Al tiempo que el fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato se genera otra molécula de ATP. Hay una ganancia neta de dos moléculas de ATP en la formación de dos moléculas de piruvato a partir de una de glucosa.

El acceptor de electrones durante la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato es el NAD^+ , que debe regenerarse para que la glicolisis continúe. En organismos aeróbicos el NADH formado en la glicolisis transfiere sus electrones al O_2 a través de la cadena transportadora de electrones, regenerando con ello el NAD^+ . Bajo condiciones anaeróbicas y en ciertos microorganismos el NAD^+ se regenera por reducción del piruvato a lactato. En otros microorganismos, el NAD^+ se regenera gracias a la reducción del piruvato a etanol. Estos dos procesos son ejemplos de fermentaciones.

16.2 La vía glicolítica está rigurosamente controlada

La vía glicolítica tiene una función doble: degradar la glucosa para generar ATP y suministrar sillares de construcción para la síntesis de componentes celulares. La velocidad de conversión de la glucosa en piruvato está regulada para sa-

tisfacer estas dos necesidades principales de la célula. En condiciones fisiológicas, las reacciones de la glicolisis son fácilmente reversibles, excepto las catalizadas por la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. La fosfofructoquinasa, el elemento de control más importante en la glicolisis, es inhibida por niveles altos de ATP y de citrato y es activada por AMP y por fructosa 2,6-bisfosfato. En el hígado, este bisfosfato señala que la glucosa es abundante. Resumiendo, la fosfofructoquinasa se activa cuando aumentan las necesidades energéticas o las de sillares de construcción. La hexoquinasa se inhibe por la glucosa 6-fosfato, que se acumula cuando se inactiva la fosfofructoquinasa. La piruvato quinasa, otro centro de control, es inhibida alostéricamente por ATP y por alanina, y se activa por la fructosa 1,6-bisfosfato. Como consecuencia, la activación máxima de la piruvato quinasa tiene lugar cuando la carga energética es baja y se acumulan los intermediarios de la glicolisis.

16.3 La glucosa puede sintetizarse a partir de precursores no carbohidratados

La gluconeogénesis es la síntesis de glucosa a partir de fuentes no glicídicas, tales como lactato, aminoácidos y glicerol. Varias de las reacciones que permiten convertir el piruvato en glucosa son comunes a la glicolisis. Sin embargo, la gluconeogénesis requiere cuatro nuevas reacciones para soslayar la irreversibilidad esencial de tres reacciones de la glicolisis. En dos de estas reacciones nuevas, el piruvato se carboxila para dar oxalacetato en la mitocondria y de nuevo se descarboxila y fosforila a fosfoenolpiruvato en el citoplasma. En estas reacciones se consumen dos moléculas con alto potencial de transferencia de grupos fosforilo y son catalizadas por la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. La piruvato carboxilasa contiene biotina como grupo prostético. Las otras reacciones características de la gluconeogénesis son la hidrólisis de la fructosa 1,6-bisfosfato y de la glucosa 6-fosfato, catalizadas por fosfatases específicas. Los principales materiales de partida para la gluconeogénesis en el hígado son el lactato y la alanina producidos en el músculo esquelético, a partir del piruvato. La formación de lactato durante la actividad muscular intensa sirve para ganar tiempo y desplazar parte de la carga metabólica del músculo al hígado.

16.4 La gluconeogénesis y la glicolisis se regulan de forma recíproca

La gluconeogénesis y la glicolisis se regulan de forma recíproca, de modo que, cuando una vía es muy activa, la otra es relativamente inactiva. Los puntos clave de control son la fosfofructoquinasa y la fructosa 1,6-bisfosfatasa. La fructosa 2,6-bisfosfato, una molécula-señal intracelular, presente en altos niveles cuando abunda la glucosa, activa la glicolisis e inhibe la gluconeogénesis, regulando a estos enzimas. La piruvato quinasa y la piruvato carboxilasa se regulan mediante otros efectores, de modo que ambas no pueden presentar la actividad máxima al mismo tiempo. La regulación alostérica y la fosforilación reversible, que son procesos rápidos, se ven complementadas por el control transcripcional, que tiene lugar en cuestión de horas o de días.

Términos clave

glicolisis (p. 433)	tioéster intermediario (p. 442)	estimulación postalimentación (p. 455)
fermentación láctica (p. 433)	fosforilación a nivel de sustrato (p. 443)	piruvato carboxilasa (p. 461)
fermentación alcoholica (p. 433)	mutasa (p. 444)	biotina (p. 462)
gluconeogénesis (p. 433)	enol fosfato (p. 445)	glucosa 6-fosfatasa (p. 463)
α -amilasa (p. 434)	piruvato quinasa (p. 446)	enzima bifuncional (p. 466)
hexoquinasa (p. 435)	anaerobio estricto (p. 448)	ciclo de sustrato (p. 467)
quinasa (p. 437)	plegamiento de Rossmann (p. 449)	ciclo de Cori (p. 468)
fosfofructoquinasa (PFK) (p. 438)	paso comprometido (p. 454)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Knowles, J. R., 1991. Enzyme catalysis: Non different, just better. *Nature* 350:121-124.
- Granner, D. y Pilks, S., 1990. The genes of hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 265:10173-10176.
- McGrane, M. M., Yun, J. S., Patel, T. M. y Hanson, R. W., 1992. Metabolic control of gene expression: In vivo studies with transgenic mice. *Trends Biochem. Sci.* 17:40-44.
- Pilks, S. J. y Granner, D. K., 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:885-909.

Libros

- Fell, D., 1997. *Understanding the Control of Metabolism*. Portland.
- Fersht, A., 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman y Compañía.
- Frayn, K. N., 1996. *Metabolic Regulation: A Human Perspective*. Portland.
- Hargreaves, M. y Thompson, M. (Eds.) 1999. *Biochemistry of Exercise X*. Human Kinetics.
- Poortmans, J. R. (Ed.). 2004. *Principles of Exercise Biochemistry*. Krager

Estructura de los enzimas glicolíticos y gluconeogénicos

- Aleshin, A. E., Kirby, C., Liu, X., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Fromm, H. J. y Honzatko, R. B., 2000. Crystal structures of mutant monomeric hexokinase I reveal multiple ADP binding sites and conformational changes relevant to allosteric regulation. *J. Mol. Biol.* 296:1001-1015.
- Jeffery, C. J., Bahnsen, B. J., Chien, W., Ringe, D. y Petsko, G. A., 2000. Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuropeptide, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry* 39:955-964.
- Schirmer, T. y Evans, P. R., 1990. Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343:140-145.
- Cooper, S. J., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Thompson, A. W., Naismith, J. H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A. y Hunter, W. N., 1996. The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* 4:1303-1315.
- Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A. y Ringe, D., 1991. Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase complex: An analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 30:5821-5826.
- Skarzynski, T., Moody, P. C. y Wonacott, A. J., 1987. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 193:171-187.
- Bernstein, B. E. y Hol, W. G., 1998. Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism. *Biochemistry* 37:4429-4436.
- Rigden, D. J., Alexeev, D., Phillips, S. E. V. y Fothergill-Gilmore, L. A., 1998. The 2.3 Å X-ray crystal structure of *S. cerevisiae* phosphoglycerate mutase. *J. Mol. Biol.* 276:449-459.
- Zhang, E., Brewer, J. M., Minor, W., Carreira, L. A. y Leboda, L., 1997. Mechanism of enolase: The crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate-enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 36:12526-12534.
- Mattevi, A., Valentini, G., Rizzi, M., Speranza, M. L., Bolognesi, M. y Coda, A., 1995. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: Molecular basis of the allosteric transition. *Structure* 3:729-741.
- Hasemann, C. A., Istvan, E. S., Uyeda, K. y Diesenhofer, J., 1996. The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure* 3:1017-1029.

- Tari, L. W., Mattei, A., Pugazhenthi, U., Goldie, H. y Delbaere, L. T. J., 1996. Snapshot of an enzyme reaction intermediate in the structure of the ATP-Mg²⁺-oxalate ternary complex of *Escherichia coli* PEP carboxykinase. *Nat. Struct. Biol.* 3:355-363.

Mecanismos catalíticos

- Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C. y Branlant, G., 1989. Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 28:2586-2592.
- Bash, P. A., Field, M. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., Ringe, D. y Karplus, M., 1991. Computer simulation and analysis of the reaction pathway of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 30:5826-5832.
- Knowles, J. R. y Albery, W. J., 1977. Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* 10:105-111.
- Rose, I. A., 1981. Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Philos. Trans. R. Soc. Lond.: Series B, Biol. Sci.* 293:131-144.

Regulación

- Iancu, C. V., Mukund, S., Fromm, H. J. y Honzatko, R. B., 2005. Rstate AMP complex reveals initial steps of the quaternary transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 280:19737-19745.
- Wilson, J. E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, function and subcellular location. *J. Exp. Biol.* 206:2049-2057.
- Lee, Y. H., Li, Y., Uyeda, K. y Hasemann, C. A., 2003. Tissue-specific structure/function differentiation of the five isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 278:523-530.
- Dang, C. V. y Semenza, G. L., 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24:68-72.
- Depre, C., Rieter, M. H. y Hue, L., 1998. Mechanism of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 258:277-290.
- Harrington, G. N. y Bush, D. R., 2003. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* 15:2493-2496.
- Gleeson, T. T., 1996. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 58:556-581.
- Hers, H.-G. y Van Schaftingen, E., 1982. Fructose 2,6-bisphosphate two years after its discovery. *Biochem. J.* 206:1-12.
- Middleton, R. J., 1990. Hexokinases and glucokinases. *Biochem. Soc. Trans.* 18:180-183.
- Nordlie, R. C., Foster, J. D. y Lange, A. J., 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19:379-406.
- Jitrapakdee, S. y Wallace, J. C., 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1-16.
- Pilks, S. J. y Claus, T. H., 1991. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: Regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 11:465-515.
- Plaxton, W. C., 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185-214.
- van de Werf, G., Lange, A., Newgard, C., Mecham, M. C., Li, Y. y Berteloot, A., 2000. New lesson in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* 267:1533-1549.

Transportadores de azúcares

- Czech, M. P. y Corvera, S., 1999. Signaling mechanism that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 274:1865-1868.
- Silverman, M., 1991. Structure and function of hexose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 60:757-794.
- Thorens, B., Charron, M. J. y Lodish, H. F., 1990. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 13:209-218.

Enfermedades genéticas

- Nakajima, H., Raben, N., Hamaguchi, T. y Yamasaki, T. 2002. Phosphofructokinase deficiency, past, present, and future. *Curr. Mol. Med.* 2:197-212.
- Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D. (Eds.), 1995. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (7th ed.). McGraw-Hill.

Evolución

- Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynh, M. y Bork, P. 1999. Pathway alignment: Application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* 343:115-124.
- Heinrich, R., Meléndez-Hevia, E., Montero, F., Nuno, J. C., Stephan, A. y Waddel, T. G. 1999. The structural design of glycolysis: An evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* 27:294-298.

Problemas

1. *Química de cocina.* Habitualmente para las conservas de frutas se utiliza sacarosa. ¿Por qué la glucosa no es adecuada como conservante?

2. *Átomos de carbono trazadores.* Se incuba glucosa marcada con ¹⁴C en C-1 con los enzimas glicolíticos y cofactores necesarios.

(a) ¿Cuál es la distribución del ¹⁴C en el piruvato que se forma? (Suponer que la interconversión entre el glicerolaldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato es muy rápida comparada con la etapa siguiente.)

(b) Si la actividad específica de la glucosa sustrato fuese de 10 mCi mmol⁻¹, ¿cuál sería la actividad específica del piruvato que se formase?

3. *Fermentación láctica.* (a) Escribir una ecuación equilibrada para la conversión de glucosa en lactato. (b) Calcular el cambio de energía libre estándar de esta reacción utilizando los datos de la tabla 16.3 y el hecho de que ΔG° es -25 kJ mol⁻¹ (-6 kcal mol⁻¹) para la reacción



¿Cuál es el cambio real de energía libre (ΔG , no ΔG°) de esta reacción cuando las concentraciones de los reactantes son: glucosa, 5 mM; lactato, 0,05 mM; ATP, 2 mM; ADP, 0,2 mM; y P_i , 1 mM?

4. *Potencial elevado.* ¿Cuál es la relación de concentraciones en el equilibrio entre fosfoenolpiruvato y piruvato en condiciones estándar cuando $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] = 10$?

5. *Equilibrio hexosa-triosas.* ¿Cuáles son las concentraciones de equilibrio de la fructosa 1,6-bisfosfato, dihidroxiacetona fosfato y glicerolaldehído 3-fosfato cuando se incuba 1 mM de fructosa 1,6-bisfosfato con aldolasa en concentraciones estándar?

6. *Doble marcado.* Se incuba 3-fosfoglicerato, marcado uniformemente con ¹⁴C, con 1,3-BPG marcado con ³²P en C-1. ¿Cuál es la distribución de radioisótopos del 2,3-BPG que se forma al añadir BPG metasa?

7. *Un análogo informativo.* La xilosa tiene la misma estructura que la glucosa excepto que en C-6 hay un átomo de hidrógeno en lugar de un grupo hidroximetilo. La velocidad de hidrólisis del ATP por la hexoquinasa crece notablemente con la adición de xilosa. ¿Por qué?

Walmsley, A. R., Barrett, M. P., Bringaud, F. y Gould, G. W. 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: Structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23:476-480.

Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martínez, J. A., Wyns, L., Jueckle, R. y Wierenga, R. K. 1999. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* 37:441-453.

Aspectos históricos

Friedmann, H. C. 2004. From *Botryobacterium* to *E. coli*: An Essay on Unity in Biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* 47:47-66.

Fruton, J. S. 1972. *Molecules and Life: Historical Essay on the Interplay of Chemistry and Biology*. Wiley Interscience.

Kalekar, H. M. (Ed.), 1969. *Biological Phosphorylations: Development of Concepts*. Prentice Hall.

8. *Diferenciación entre azúcares.* La inyección intravenosa de fructosa a sujetos voluntarios sanos produce un aumento, de dos a cinco veces, de lactato en sangre, mucho mayor que el observado cuando se inyecta la misma cantidad de glucosa.

- (a) ¿Por qué la inyección de fructosa acelera la glicólisis?
 (b) En la nutrición endovenosa se ha utilizado fructosa en lugar de glucosa. ¿Por qué este uso es inadecuado?

9. *Mutantes metabólicos.* Predecir el efecto de cada una de las siguientes mutaciones sobre la marcha de la glicólisis en las células hepáticas:

- (a) Pérdida del centro alostérico para el ATP en la fosfofructoquinasas.
 (b) Pérdida del centro de unión para el citrato en la fosfofructoquinasas.
 (c) Pérdida del dominio fosfatasa del enzima bifuncional que regula el nivel de fructosa 2,6-bisfosfato.
 (d) Pérdida del centro de unión para la fructosa 1,6-bisfosfato en la piruvato quinasa.

10. *Mutante metabólico.* ¿Cuáles serían las consecuencias probables de una anomalía genética por la cual la fructosa 1,6-bisfosfataza hepática fuese menos sensible a la regulación por la fructosa 2,6-bisfosfato?

11. *Secuestradora de biotina.* La avidina, una proteína de 70 kDa de la clara de huevo, tiene una gran afinidad por la biotina. De hecho, es un inhibidor muy específico de proteínas con biotina. ¿Cuál de las siguientes conversiones serían bloqueadas por la adición de avidina a un homogenado celular?

- (a) Glucosa → piruvato
 (b) Piruvato → glucosa
 (c) Oxalacetato → glucosa
 (d) Malato → oxalacetato
 (e) Piruvato → oxalacetato
 (f) Glicerolaldehído 3-fosfato → fructosa 1,6-bisfosfato

12. *Átomos de carbono trazadores 2.* Si las células que sintetizan glucosa a partir de lactato se exponen a CO₂ marcado con ¹⁴C, ¿cuál sería la distribución del marcado en la glucosa sintetizada *de novo*?

13. *Envenenamiento por arseniato.* El arseniato (AsO_4^{3-}) se parece mucho en estructura y reactividad al Pi . En la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshídrogenasa, al arseniato puede sustituir al fosfato en el ataque al tióster intermedio rico en energía. El producto de esta reacción, l-arseno-3-fosfoglicerato, es inestable. Este y otros acil-arsenatos se hidrolizan rápida y espontáneamente. ¿Cuál es el efecto del arseniato en la generación de energía de la célula?

14. *Reduce, reutiliza, recicla.* Durante la conversión de glucosa en dos moléculas de lactato, el NADH generado anteriormente en la vía, se oxida a NAD^+ . ¿Por qué no representa una ventaja para la célula hacer simplemente más NAD^+ de modo que no fuera necesaria la regeneración? Después de todo, la célula ahorraría mucha energía porque no necesitaría sintetizar más ácido láctico deshídrogenasa.

15. *De nuevo adenilato quinasa.* La adenilato quinasa, un enzima estudiado en detalle en el Capítulo 9, es responsable de interconvertir la reserva de nucleótido de adenilato:



La constante de equilibrio de esta reacción es próxima a 1, en tanto que el número de enlaces fosfoanídrido es el mismo a cada lado de la ecuación. Utilizando la ecuación de la constante de equilibrio para esta reacción, explicar por qué cambios en la [AMP] constituyen un indicador más efectivo de la reserva de nucleótidos de adenilato que la [ATP].

16. *¿Trabajando con propósitos cruzados?* La gluconeogénesis tiene lugar durante el ejercicio intenso, lo cual parece paradójico. ¿Por qué un organismo sintetizaría glucosa al tiempo que la utiliza para generar energía?

17. *Vías potenciadoras.* Comparar las estequiometrías de la glicólisis y la gluconeogénesis. Recordar que la entrada de un equivalente de ATP cambia la constante de equilibrio de una reacción en un factor de 10^8 aproximadamente (p. 414). ¿En qué factor alteran la constante de equilibrio de la gluconeogénesis los compuestos adicionales con alto potencial de transferencia del grupo fosforilo?

Problema mecanístico

18. *Argumentar por analogía.* Proponer un mecanismo para la conversión de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato por la fosfoglucosa isomerasa basado en el mecanismo de la triosa fosfato isomerasa.

Problema de comprensión del capítulo

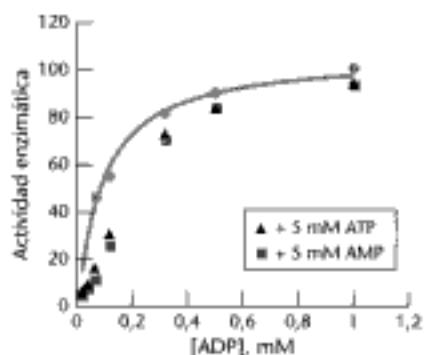
19. *No solamente por energía.* Individuos con galactosemia desarrollan anomalías en el sistema nervioso central incluso al eliminarse la galactosa de la dieta. No se conoce con precisión la causa. Sugerir una explicación aceptable.

Problema de interpretación de datos

20. *Ahora, esto es atípico.* Recientemente se ha identificado fosfofructoquinasa en la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus*. Se la sometió a análisis bioquímicos estándar para determinar los parámetros catalíticos básicos. Los procesos estudiados fueron de la siguiente forma:



El ensayo midió el incremento de fructosa 1,6-bisfosfato. En la gráfica adjunta se muestran resultados seleccionados.



[Datos de J. E. Tuininga et al. / Biol. Chem. 274(1999):21023-21028.]

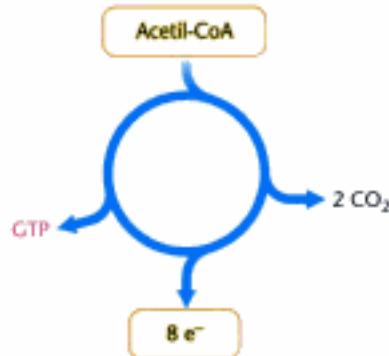
- ¿En qué difiere la fosfofructoquinasa de *P. furiosus* de la fosfotructoquinasa estudiada en este capítulo?
- ¿Qué efectos tienen el AMP y el ATP en la reacción con el ADP?

El ciclo del ácido cítrico



Las rotundas, o plazas circulares, se comportan como un centro para facilitar el flujo de tráfico. El ciclo del ácido cítrico es el centro bioquímico de la célula, ya que oxida los sustratos carbonados, habitualmente en forma de acetil-CoA, y sirve también como fuente de precursores para la biosíntesis. [(Arriba) Chris Warren/International Stock.]

El metabolismo de la glucosa hasta convertirse en piruvato mediante la glicolisis es un proceso anaeróbico y sólo aporta una parte de todo el ATP que puede proporcionar la glucosa. La mayor parte del ATP generado en el metabolismo proviene de la transformación aeróbica de la glucosa. Este proceso comienza con la oxidación completa de los derivados de la glucosa hasta dióxido de carbono. Esta oxidación tiene lugar en una serie de reacciones denominadas *ciclo del ácido cítrico*, también conocido como *ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, "tricarboxylic acid cycle")* o *ciclo de Krebs*. El ciclo del ácido cítrico es la *vía final común para la oxidación de las moléculas energéticas*: carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. La mayoría de las moléculas energéticas entran en el ciclo como acetil-coenzima A.



Contenido

- 17.1 La piruvato deshidrogenasa conecta la glicolisis con el ciclo del ácido cítrico
- 17.2 El ciclo del ácido cítrico oxida unidades de dos carbonos
- 17.3 La entrada en el ciclo del ácido cítrico y sus reacciones están controladas
- 17.4 El ciclo del ácido cítrico es una fuente de precursores biosintéticos
- 17.5 El ciclo del glicoxilato permite a las plantas y bacterias crecer en acetato

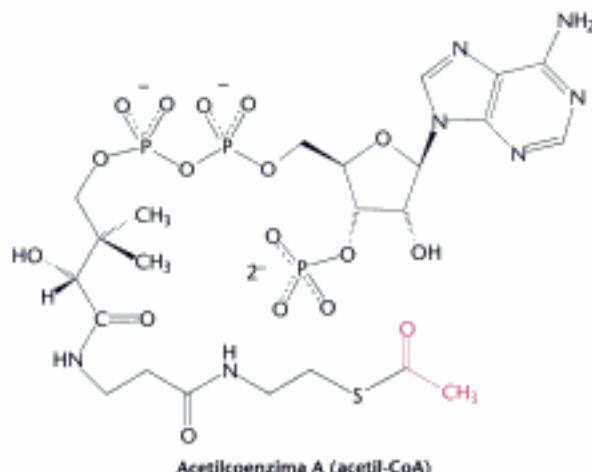
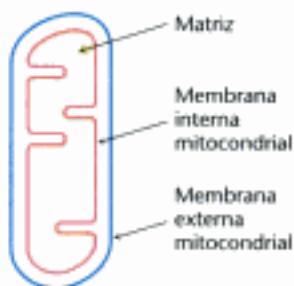


Figura 17.1 Mitocondria. En esta micrografía electrónica se aprecia claramente la doble membrana de la mitocondria. Se denominan crestas a las numerosas invaginaciones de la membrana interna mitocondrial. La descarboxilación oxidativa del piruvato y la secuencia de reacciones del ciclo del ácido cítrico tienen lugar en la matriz. [(Izquierda) Omikron/Photo Researchers.]



En condiciones aerobias, el piruvato generado a partir de la glucosa sufre una descarboxilación oxidativa para dar acetil-CoA. En los eucariotas, las reacciones del ciclo del ácido cítrico transcurren en el interior de la mitocondria, en tanto que las de la glicolisis tienen lugar en el citoplasma (Figura 17.1).

El ciclo del ácido cítrico aporta electrones de alta energía

El ciclo del ácido cítrico es el eje central del metabolismo celular. Es la vía de entrada al metabolismo aerobio de cualquier molécula que será transformada en un grupo acetilo o en un ácido dicarboxílico. El ciclo es también una fuente importante de precursores, no solo de formas de almacenamiento de energía, sino también de los componentes para la biosíntesis de otras muchas moléculas tales como aminoácidos, bases de nucleótidos y porfirinas (el componente orgánico del grupo hemo). Un componente del ciclo del ácido cítrico, el oxalacetato, es también un precursor importante de la glucosa (p. 460).

¿Cuál es el papel del ciclo del ácido cítrico en la transformación de las moléculas energéticas en ATP? Se debe recordar que las moléculas energéticas son compuestos carbonados susceptibles de ser oxidados mediante pérdida de electrones (Capítulo 15). El ciclo del ácido cítrico incluye una serie de reacciones de oxidación-reducción que conducen a la oxidación de un grupo acetilo hasta dos moléculas de dióxido de carbono. Esta oxidación genera electrones de alta energía que van a utilizarse para potenciar la síntesis de ATP. *La función específica del ciclo del ácido cítrico es la producción de electrones de alta energía a partir de combustibles carbonados.*

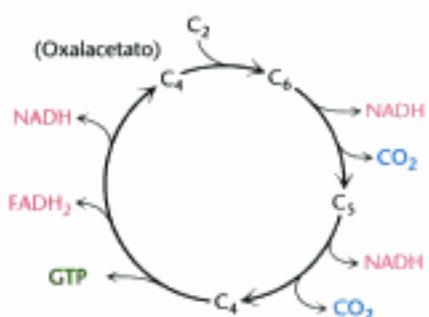
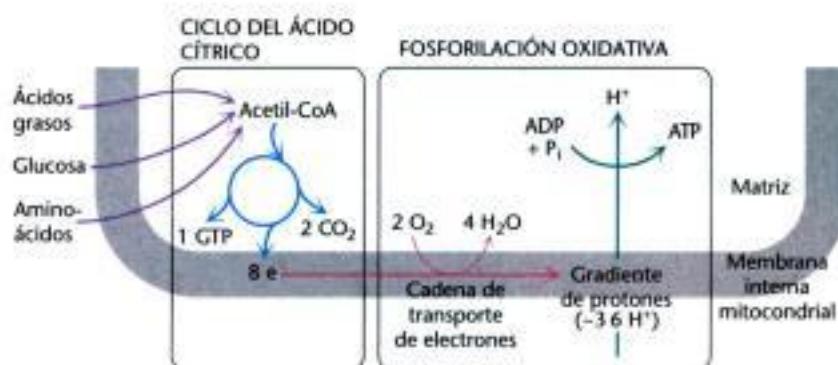


Figura 17.2 Visión general del ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico oxida unidades de dos átomos de carbono, para dar dos moléculas de CO_2 , una molécula de GTP, y electrones con alta energía en forma de NADH y FADH_2 .

En la Figura 17.2 se muestra una visión general del ciclo del ácido cítrico. Un compuesto de cuatro carbonos (oxalacetato) se condensa con una unidad acetilo de dos carbonos para dar lugar a un ácido tricarboxílico de seis carbonos. Un compuesto de seis carbonos libera dos veces CO_2 en dos descarboxilaciones oxidativas que proporcionan electrones de alta energía. Queda un compuesto de cuatro carbonos. Este compuesto tetracarbonado después es transformado regenerando el oxalacetato, que inicia otra vuelta al ciclo. Dos átomos de carbono entran en el ciclo como una unidad de acetilo y dos átomos de carbono dejan el ciclo en forma de dos moléculas de dióxido de carbono.

Se debe tener en cuenta que el ciclo del ácido cítrico en sí mismo no genera una gran cantidad de ATP ni tampoco incluye como un reactante al oxígeno (Figura 17.3). Por el contrario, el ciclo del ácido cítrico toma electrones del acetil-CoA y los utiliza para formar NADH y FADH_2 . Tres iones hidruro (es decir, seis electrones) se transfieren a tres moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y un par de átomos de hidrógeno (por consiguiente, dos electrones) se transfieren a una molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD). Estos transportadores de electrones rinden nueve moléculas de ATP cuando se oxidan mediante el O_2 en la *fosforilación oxidativa* (Capítulo 18). Los electrones liberados en la reoxidación del NADH y FADH_2 fluyen a través de una serie de proteínas de membrana (denominada *cadena de transporte de electrones*) para generar un gradiente de protones a través de la membrana. Entonces estos protones fluyen a través de la ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

El ciclo del ácido cítrico, juntamente con la fosforilación oxidativa, aportan la mayor parte de la energía utilizada por las células aerobias—en el hombre es más del 90%.



Su eficacia es muy alta ya que un número limitado de moléculas del ciclo puede generar grandes cantidades de NADH y FADH₂. Obsérvese en la Figura 17.2 que la molécula de cuatro carbonos, el oxalacetato, que inicia el primer paso del ciclo del ácido cítrico se regenera al final de una vuelta del ciclo. Por tanto, una molécula de oxalacetato es capaz de intervenir en la oxidación de muchas moléculas de acetato.

17.1 La piruvato deshidrogenasa conecta la glicolisis con el ciclo del ácido cítrico

Los carbohidratos, principalmente la glucosa, son procesados en la glicolisis hasta piruvato (capítulo 16). En condiciones anaerobias, dependiendo del organismo, el piruvato se transforma en ácido láctico o en etanol. En condiciones aerobias, el piruvato es transportado al interior de la mitocondria mediante una proteína transportadora específica, integrada en la membrana mitocondrial. En la matriz mitocondrial, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa mediante el *complejo piruvato deshidrogenasa* para dar acetil-CoA.



Esta reacción irreversible es la conexión entre la glicolisis y el ciclo del ácido cítrico (Figura 17.4). Obsérvese que, en la preparación para su entrada en el ciclo del ácido cítrico del piruvato derivado de la glucosa, tiene lugar una descarboxilación oxidativa y se capturan electrones con alto potencial de transferencia, en forma de NADH. Por tanto, la reacción de la piruvato deshidrogenasa tiene muchos de los aspectos clave de las reacciones del ciclo del ácido cítrico en sí mismo.

El complejo piruvato deshidrogenasa es un complejo grande formado por tres tipos de enzimas altamente integrados (Tabla 17.1). La piruvato deshidrogenasa es miembro de la familia de complejos homólogos que incluye al enzima del ciclo del ácido cítrico α -cetoglutarato deshidrogenasa (p. 485). Estos complejos son enormes, con masas moleculares del orden de 4 a 10 millones de daltons (Figura 17.5). Como más tarde veremos, sus elaboradas estructuras permiten a los grupos viajar de un centro activo a otro, sujetos al centro de la estructura mediante enlaces.

TABLA 17.1 Complejo piruvato deshidrogenasa de *E. coli*

Enzima	Abreviatura	Número de cadenas	Grupo prostético	Reacción catalizada
Componente piruvato deshidrogenasa	E ₁	24	TPP	Descarboxilación oxidativa del piruvato
Dihidrolipoilo transacetilasa	E ₂	24	Lipoamida	Transferencia del grupo acetilo al CoA
Dihidrolipoilo deshidrogenasa	E ₃	12	FAD	Regeneración de la forma oxidada de la lipoamida

Figura 17.3 Respiración celular. El ciclo del ácido cítrico constituye el primer paso de la respiración celular, la captura de electrones de alta energía desde las moléculas energéticas (izquierda). Estos electrones reducen el O₂ para generar un gradiente de protones (vía en rojo), el cual es utilizado para sintetizar ATP (vía en verde). La reducción del O₂ y la síntesis de ATP constituyen la fosforilación oxidativa.

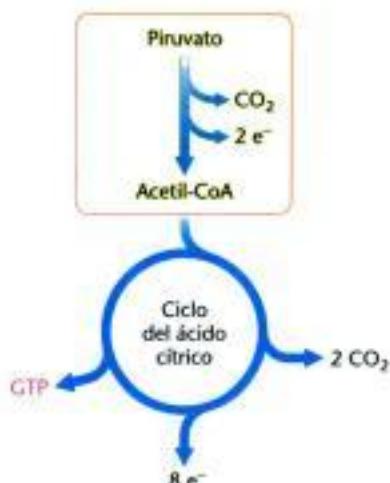


Figura 17.4 La conexión entre la glicolisis y el ciclo del ácido cítrico. El piruvato producido en la glicolisis se convierte en acetil-CoA, el combustible del ciclo del ácido cítrico.

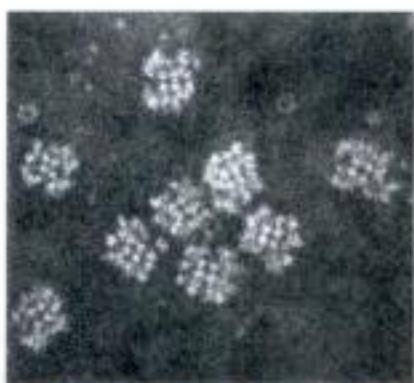
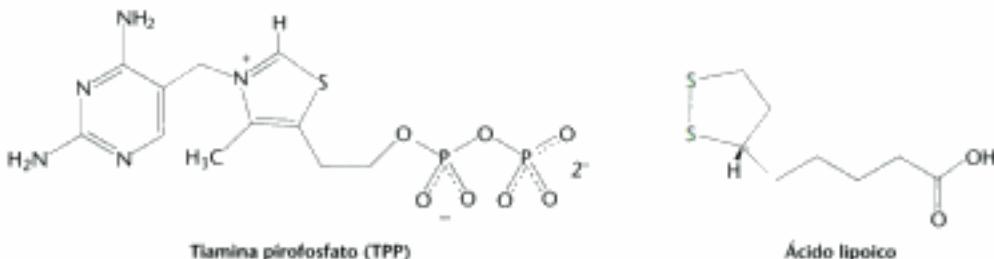


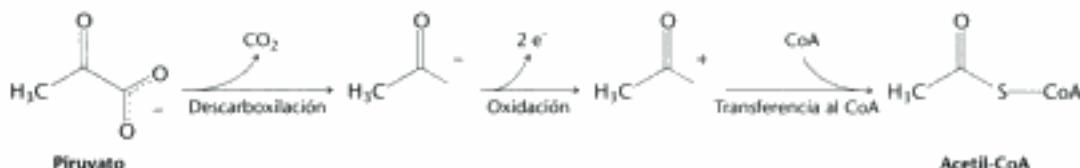
Figura 17.5 Micrografía electrónica del complejo piruvato deshidrogenasa de *E. coli*. [Cortesía del Dr. Lester Reed.]

Mecanismo: la síntesis de acetilcoenzima A a partir del piruvato requiere tres enzimas y cinco coenzimas.

El mecanismo de la piruvato deshidrogenasa es maravillosamente complejo, más de lo que se podría suponer a partir de su estequiometría relativamente simple. La reacción precisa de la intervención de tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa y de cinco coenzimas: *tiamina pirofosfato (TPP)*, *ácido lipoico* y *FAD* como cofactores catalíticos y de CoA y NAD⁺ como cofactores estequiométricos.

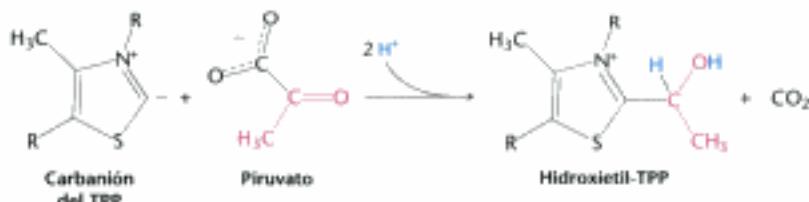


La conversión de piruvato en acetil-CoA tiene lugar en tres etapas: descarboxilación, oxidación y transferencia del grupo acetilo resultante al CoA.



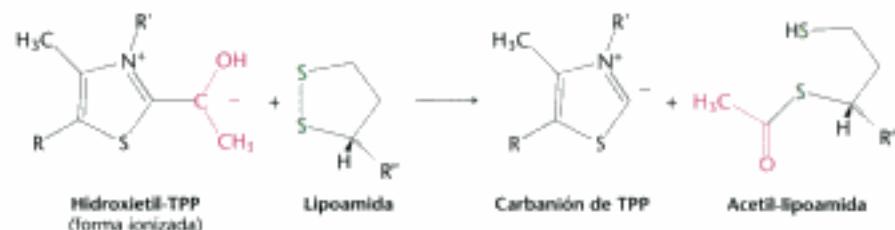
Estas etapas deben estar acopladas para conservar la energía libre derivada de la descarboxilación y permitir la formación de NADH y acetil-CoA.

1. *Descarboxilación*. El piruvato se combina con el TPP y es descarboxilado (Figura 17.6). Esta reacción está catalizada por el *componente piruvato deshidrogenasa* (*E₁*) del complejo multienzimático.



Esta adición va seguida por la descarboxilación del piruvato. El anillo del TPP cargado positivamente actúa como un sumidero de electrones que estabiliza la carga negativa que se transfiere al anillo en la descarboxilación. La protonación conduce al hidroxietil-TPP.

2. *Oxidación*. El grupo hidroxietilo unido al TPP se *oxida* para formar un grupo acetilo y acto seguido se *transfiere* a la lipoamida, un derivado del ácido lipoico, unido a la cadena lateral de lisina mediante un enlace amida. Se observa que esta transferencia conduce a la formación de un enlace tioéster rico en energía.



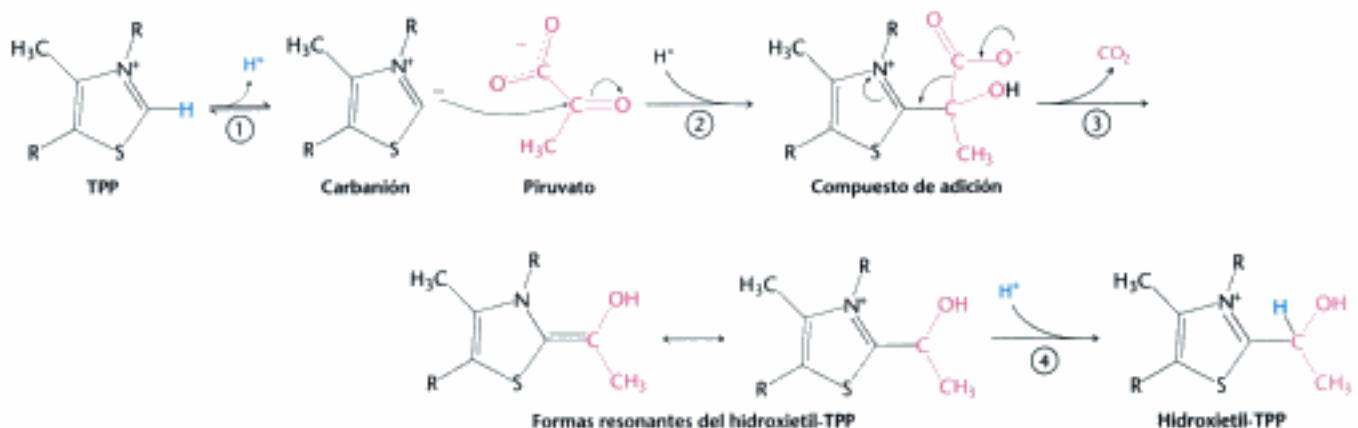
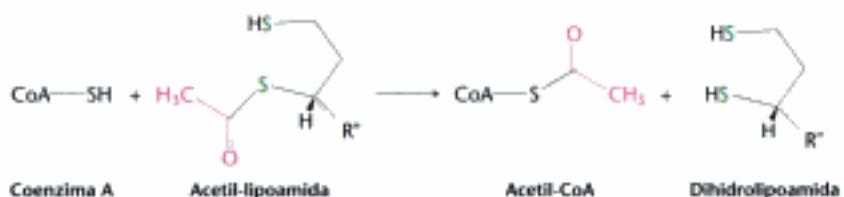


Figura 17.6 Mecanismo de la reacción de descarboxilación por E_1 . E_1 es el componente piruvato deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa. Una característica clave del TPP, el grupo prostético del componente piruvato deshidrogenasa, es que el átomo de carbono que se encuentra entre los átomos de nitrógeno y de azufre en el anillo de tiazol es mucho más ácido que la mayoría de los grupos $=\text{CH}-$, con un valor de pK_a próximo a 10. (1) Este grupo se ioniza formando un carbanión. (2) El carbanión se adiciona fácilmente al grupo carbonílico del piruvato. (3) A esta adición le sigue la descarboxilación del piruvato. El anillo del TPP cargado positivamente actúa con un sumidero de electrones que estabiliza la carga negativa que se transfiere al anillo en la descarboxilación. (4) La protonación conduce al hidroxietil-TPP.

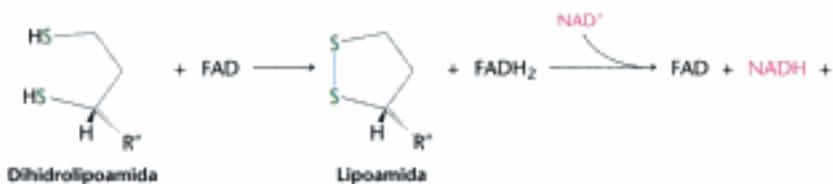
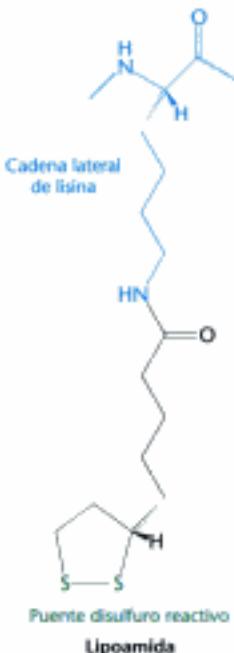
En esta reacción el oxidante es el grupo disulfuro de la lipoamida, el cual se reduce a disulfidrido. El producto de esta reacción, también catalizada por el componente piruvato deshidrogenasa E_1 , es la acetil-lipoamida.

3. Formación del acetil-CoA. Se transfiere el grupo acetilo desde la acetil-lipoamida al CoA para formar acetil-CoA.



Esta reacción está catalizada por la dihidrolipoilo transacetilasa (E_2). El enlace tioéster rico en energía se mantiene hasta la transferencia del grupo acetilo al CoA. Se debe recordar que el CoA sirve de portador de muchos grupos acilo activados, de los cuales el acetilo es el más simple (p. 422). En este momento ya se ha obtenido a partir del piruvato el acetil-CoA, el combustible para el ciclo del ácido cítrico.

El complejo piruvato deshidrogenasa no puede realizar otro ciclo catalítico hasta que la dihidrolipoamida sea oxidada a lipoamida. En la cuarta etapa, se regenera la forma oxidada de la lipoamida mediante la dihidrolipoilo deshidrogenasa (E_3). Para ello, se transfieren dos electrones a un grupo prostético FAD del enzima y posteriormente al NAD^+ .



Esta transferencia de electrones del FAD al NAD^+ es poco habitual, ya que lo normal es que el FAD reciba electrones del NADH. El potencial de transferencia de elec-

trones del FAD está modificado por su asociación con el enzima y esto le permite transferirlos al NAD⁺. Las proteínas que se asocian fuertemente con el FAD o con el flavina mononucleótido (FMN) se denominan *flavoproteínas*.

Los enlaces flexibles permiten a la lipoamida desplazarse entre distintos centros activos

Se conoce ya la estructura de todos los enzimas que integran el complejo piruvato deshidrogenasa, aunque de diferentes complejos procedentes de distintas especies. Con todo ya resulta posible construir un modelo atómico del complejo para comprender su actividad (Figura 17.7).

El componente transacetilasa E2 constituye el núcleo del complejo. La transacetilasa está formada por ocho trímeros catalíticos ensamblados que forman un cubo hueco. Cada una de las subunidades que forman un trímero presenta tres dominios principales (Figura 17.8). En el extremo amino terminal se encuentra un pequeño dominio con un cofactor lipoamida unido a un residuo de lisina. Este dominio es homólogo a los dominios de unión a la biotina tales como el de la piruvato carboxilasa (ver Figura 16.26). Al dominio lipoamida le sigue un pequeño dominio que interacciona dentro del complejo con la E₃. La subunidad E₂ se completa con un gran dominio transacetilasa. E₁ es un tetramero $\alpha_2\beta_2$, y E₃ es un dímero $\alpha\beta$. En torno al núcleo E₂ se sitúan veinticuatro copias de E₁ y doce copias de E₃. ¿Cómo actúan conjuntamente los tres distintos centros activos? (Figura 17.9). La clave radica en el brazo, largo y flexible, de la lipoamida de la subunidad E₂ del complejo, capaz de transportar el sustrato de un centro activo a otro.

1. El piruvato se descarboxila en el centro activo de E₁, formando el intermediario de TPP sustituido, y como primer producto se libera CO₂. Este centro activo se encuentra en el interior del complejo E₁ y está conectado con la superficie del enzima mediante un conducto hidrofóbico de 20 Å de longitud.
2. E₂ inserta el brazo lipoilo amida del dominio lipoamida en el conducto profundo de E₁ dejando el centro activo.

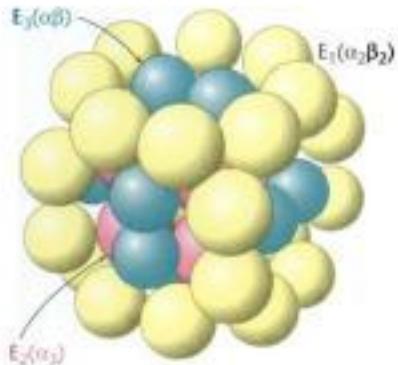


Figura 17.7 Representación esquemática de la piruvato deshidrogenasa. En rojo se representa el núcleo transacetilasa (E₂), el componente piruvato deshidrogenasa (E₁) en amarillo y la dihidrolipoilo deshidrogenasa (E₃) en verde.

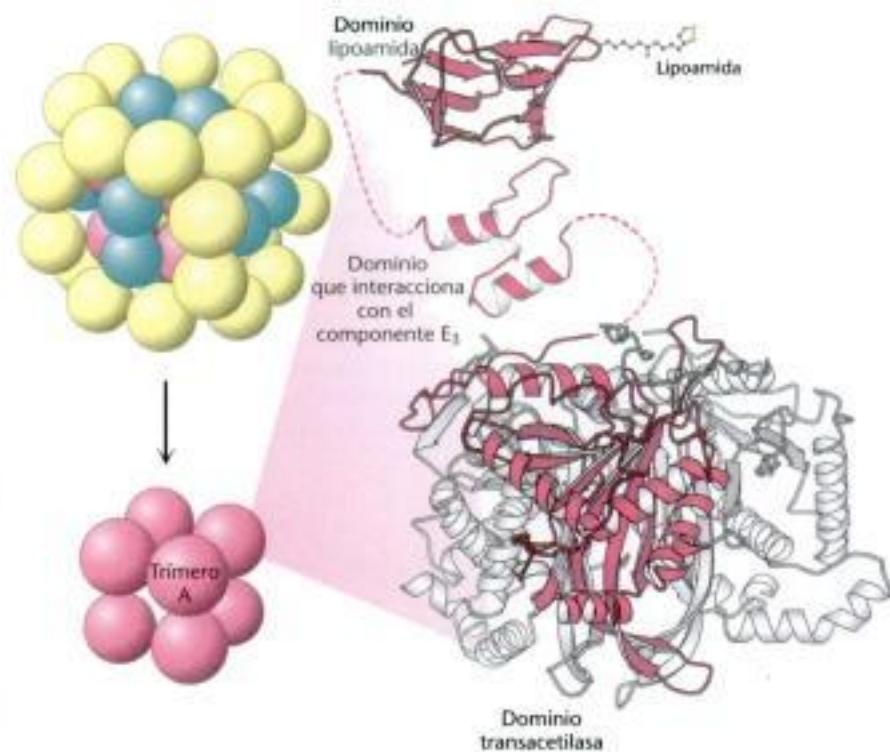


Figura 17.8 Estructura del núcleo de la transacetilasa (E₂). Cada una de las bolas rojas representa un trimero de tres subunidades E₂. Nótese que cada subunidad está formada por tres dominios: un dominio de unión a la lipoamida, un pequeño dominio de interacción con E₃, y un gran dominio catalítico transacetilasa. El dominio transacetilasa tiene tres subunidades, una dibujada en rojo y las otras en blanco, en la representación en cintas.

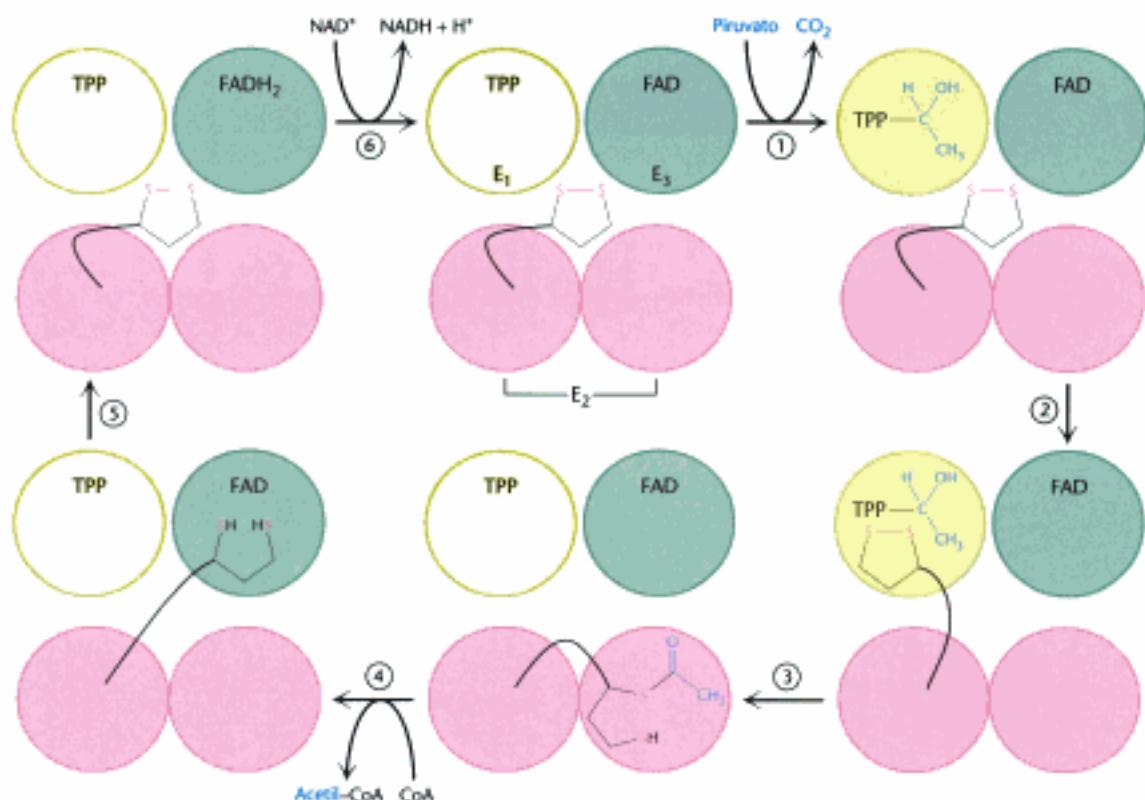


Figura 17.9 Reacciones del complejo piruvato deshidrogenasa. Arriba (en el centro), el enzima (representado por una esfera amarilla, una verde, y dos rojas) está sin modificar y preparado para un ciclo catalítico. (1) El piruvato es descarboxilado para formar hidroxietil-TPP. (2) La rama dihidrolipoilo de E₂ se sitúa en el centro activo de E₁. (3) E₁ cataliza la transferencia del grupo de dos carbonos al grupo dihidrolipoilo para formar el complejo acetil-dihidrolipoilo. (4) E₂ cataliza la transferencia del residuo acetilo al CoA para formar el producto acetil-CoA. Entonces la rama disulfhidril-lipoilo se desplaza hacia el centro activo de E₃. E₃ cataliza (5) la oxidación del ácido dihidrolipoico y (6) la transferencia de protones y electrones al NAD⁺ completa el ciclo de reacción.

3. E₁ cataliza la transferencia del grupo acetilo a la lipoamida. Entonces la rama lipoilo-lisina acetilada abandona E₁ y se introduce en el cubo E₂ situándose en el centro activo de E₂, que se encuentra en el interior del cubo en la interfase de la subunidad.

4. En ese momento se transfiere el residuo acetilo al CoA, y el segundo producto, acetil-CoA, se desprende del cubo. Entonces la rama lipoilo-lisina reducida se desplaza al centro activo de la flavoproteína E₃.

5. En el centro activo de E₃, la lipoamida se oxida mediante el coenzima FAD. La lipoamida reactivada está preparada para otro ciclo de reacción.

6. El producto final, NADH, se obtiene en la reoxidación del FADH₂ a FAD.

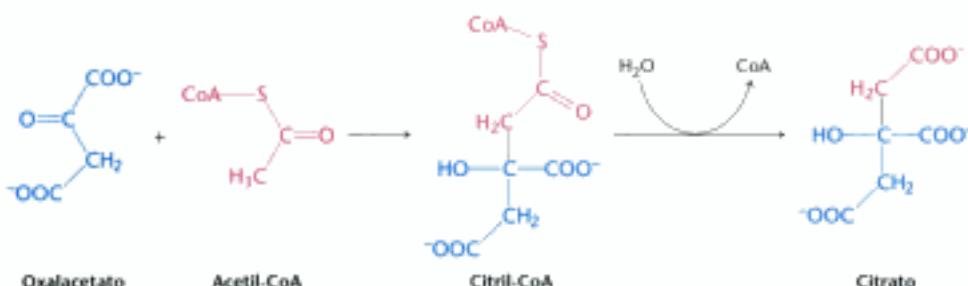
La integración estructural de tres clases de enzimas hace posible la catálisis coordinada de una reacción compleja. La proximidad de un enzima a otro aumenta la velocidad de la reacción total y reduce al mínimo las reacciones colaterales. Todos los intermediarios de la descarboxilación oxidativa del piruvato quedan estrechamente ligados al complejo y se transfieren con rapidez debido a la capacidad de la rama lipoilo-lisina de E₂ para desplazarse de un centro activo a otro en cada vuelta del ciclo.

17.2 El ciclo del ácido cítrico oxida unidades de dos carbonos

La conversión del piruvato en acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenada es la conexión entre la glicólisis y la respiración celular, debido a que *el acetil-CoA es el combustible del ciclo del ácido cítrico*. De hecho, todos los combustibles acaban siendo metabolizados hasta acetil-CoA o algún componente del ciclo del ácido cítrico.

La citrato sintasa produce citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA

El ciclo del ácido cítrico comienza con la condensación de una unidad de cuatro carbonos, el oxalacetato, con una unidad de dos carbonos, el grupo acetilo del acetil-CoA. El oxalacetato reacciona con el acetil-CoA y H_2O para dar citrato y CoA.



Sintasa

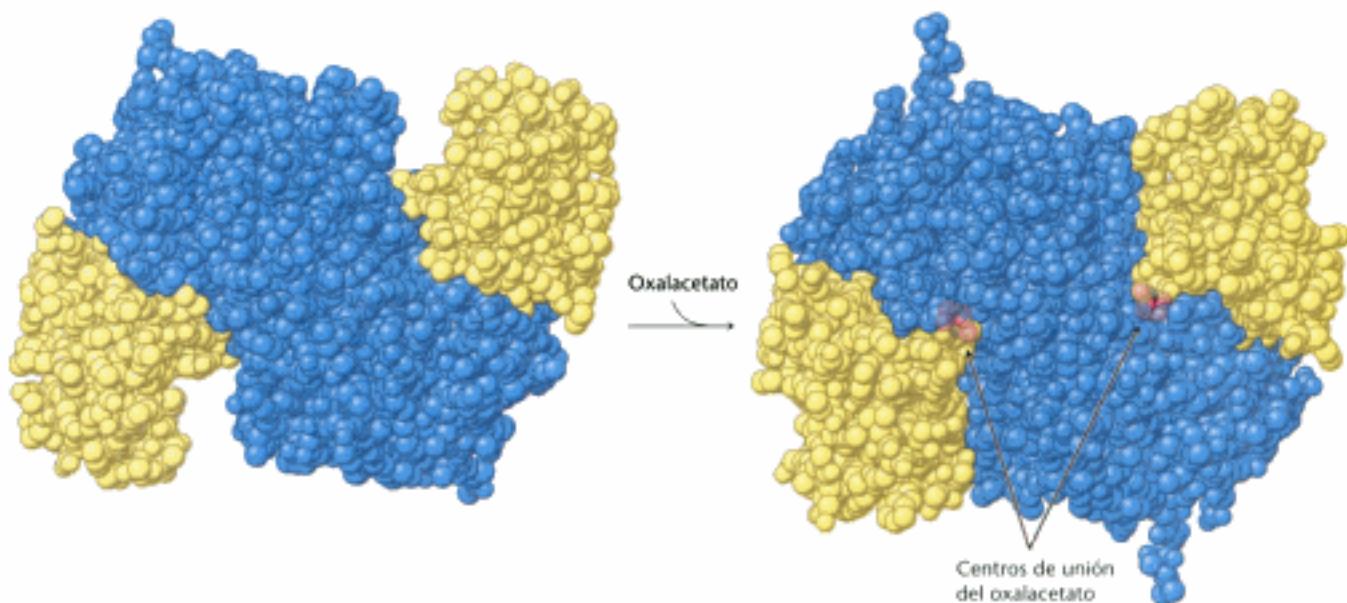
Enzima que cataliza una reacción de síntesis en la que se unen dos componentes sin participación directa del ATP (o de otro nucleótido trifosfato).

Esta reacción que es una condensación aldólica seguida de una hidrólisis, está catalizada por la *citrato sintasa*. Primero el oxalacetato se condensa con el acetil-CoA para dar *citril-CoA*, una molécula de alta energía porque contiene un enlace tioéster procedente del acetil-CoA. La hidrólisis del tioéster citril-CoA hasta citrato y CoA desplaza la reacción completa en el sentido de la síntesis de citrato. Básicamente, la hidrólisis del tioéster proporciona la energía necesaria para la síntesis de la nueva molécula a partir de sus dos precursores.

Mecanismo: el mecanismo de la citrato sintasa evita que se produzcan reacciones no deseadas

Debido a que la condensación del acetil-CoA y el oxalacetato inicia el ciclo, es muy importante que las reacciones colaterales sean mínimas. Vamos ahora a estudiar brevemente cómo la citrato sintasa impide los procesos innecesarios tales como la hidrólisis del acetil-CoA.

La citrato sintasa de los mamíferos es un dímero con dos subunidades idénticas de 49 kd cada una. Cada centro activo está localizado en una hendidura situada entre los dominios grande y pequeño de cada subunidad, y queda junto a la interfase entre las subunidades. Los estudios cristalográficos con rayos X de la citrato sintasa y de sus complejos con varios sustratos e inhibidores han revelado que este enzima sufre grandes cambios conformacionales durante la catálisis. La citrato sintasa muestra una cinética secuencial ordenada: primero se une al oxalacetato y después al acetil-CoA. La razón de este procedimiento ordenado es que *el oxalacetato induce en el enzima una profunda reorganización estructural que lleva a la creación de un centro de enlace para el acetil-CoA*. La forma abierta del enzima, en ausencia de ligandos, se convierte en una forma cerrada cuando se une al oxalacetato (Figura 17.10). En cada subunidad, el dominio pequeño gira 19 grados con respecto al dominio grande. *Pequeños desplazamientos de cadenas laterales de aminoácidos alrededor del oxalacetato ligado ocasionan rotaciones en las α-hélices y reajustes globales de hasta 15 Å*. Esta transición conformacional recuerda el cierre de la hendidura de la hexoquinasa inducida por la unión a la glucosa (p. 437).



La citrato sintasa cataliza la reacción de condensación al situar a los sustratos en estrecha proximidad, orientándolos y polarizando ciertos enlaces (Figura 17.11). La donación y separación de protones transforma el acetil-CoA en un *enol intermedio*. El enol ataca al oxalacetato para formar un enlace carbono-carbono entre el acetil-CoA y el oxalacetato. El citril-CoA recién formado induce nuevos cambios estructurales en el enzima, de modo que el centro activo se cierra por completo. El enzima rompe el citril-CoA mediante hidrólisis del tioéster. El coenzima A abandona el enzima, seguido por el citrato, y el enzima recupera su conformación inicial abierta.

Figura 17.10 Cambios conformativos de la citrato sintasa al unirse con el oxalacetato. El dominio pequeño de cada subunidad del homodímero se muestra en amarillo; el dominio grande se muestra en azul. (Izquierda) Forma abierta del enzima solo. (Derecha) Forma cerrada del enzima ligado. [Tomado de SCSC.pdb y 4 CTS.pdb.]

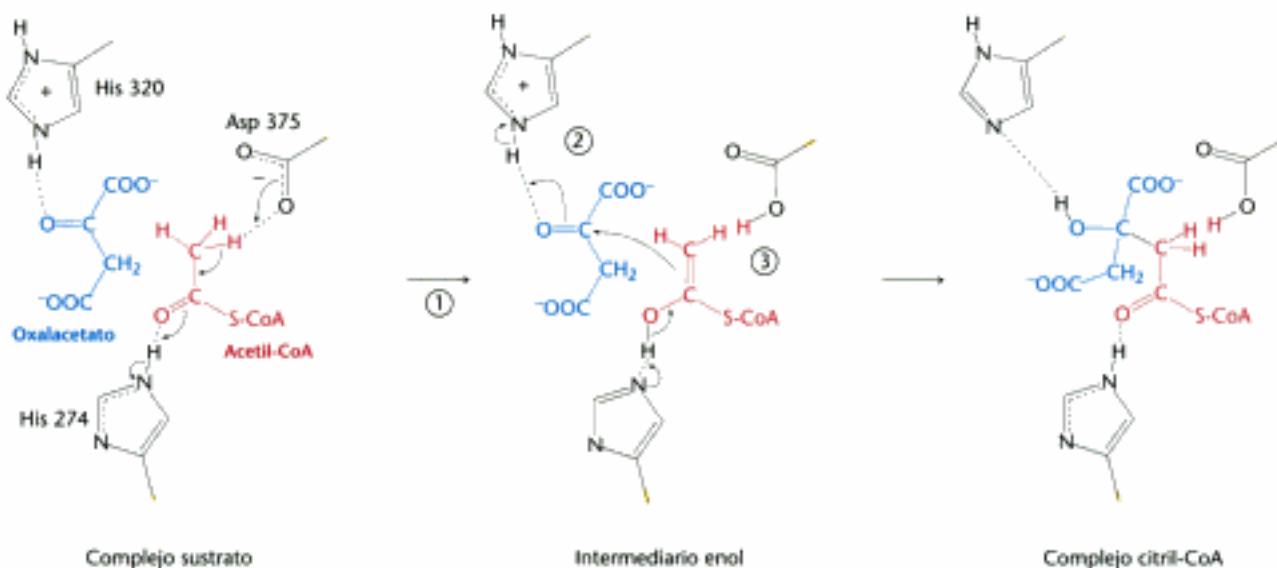
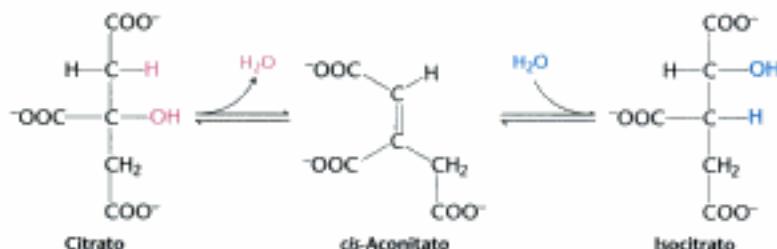


Figura 17.11 Mecanismo de la síntesis del citril-CoA por la citrato sintasa. En el complejo con el sustrato (a la izquierda), la His 274 dona un protón al oxígeno carbonílico del acetil-CoA para favorecer la cesión de un protón del metilo al Asp 375, formando un enol intermedio (en el centro). (2) Por la transferencia de un protón procedente de la His 320 al átomo de oxígeno carbonílico el oxalacetato éste resulta activado. (3) Simultáneamente el enol del acetil-CoA ataca al carbono carbonílico del oxalacetato para formar un enlace carbono-carbono que une el acetil-CoA y el oxalacetato. La His 274 recupera el protón. Así se forma el citril-CoA. La His 274 participa otra vez como dadora de protón para hidrolizar el tioéster (no representado) y se obtiene citrato y CoA.

Ahora podemos comprender cómo se evita la hidrólisis innecesaria del acetil-CoA. La citrato sintasa está bien diseñada para hidrolizar al *citril-CoA* pero no para hidrolizar al *acetil-CoA*. ¿Cómo se consigue esta discriminación? En primer lugar, el acetil-CoA no se une al enzima hasta que el oxalacetato no está preparado para la condensación. En segundo lugar, los residuos catalíticos cruciales para la hidrólisis del tioéster no están dispuestos adecuadamente *hasta que se forma el citril-CoA*. Al igual que en el caso de la hexoquinasa (p. 437) y en el de la triosafosfato isomerasa (p. 440), el *ajuste inducido evita las reacciones colaterales indeseables*.

El citrato se isomeriza a isocitrato

El grupo hidroxilo terciario no se encuentra adecuadamente situado en la molécula de citrato para permitir la descarboxilación oxidativa siguiente. Por tanto, el citrato se isomeriza a isocitrato para permitir que la unidad de seis carbonos sufra una descarboxilación oxidativa. La isomerización del citrato se consigue mediante una etapa de *deshidratación* seguida por una de *hidratación*. El resultado es un intercambio de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo. El enzima que cataliza ambas etapas se denomina *aconitasa* por que el *cis-aconitato* es el intermediario.



La aconitasa es una *ferro-sulfo-proteína*, o *proteína con hierro no hemo*, que contiene cuatro átomos de hierro sin que formen parte de un grupo hemo. Los cuatro átomos de hierro constituyen un complejo con cuatro sulfuros inorgánicos y tres átomos de azufre de cisteinas, dejando un átomo de hierro disponible para la unión con el citrato y luego con el isocitrato mediante sus grupos carboxilato e hidroxilo (Figura 17.12). Este núcleo de hierro, juntamente con otros grupos del enzima, facilita las reacciones de deshidratación y rehidratación del sustrato enlazado.

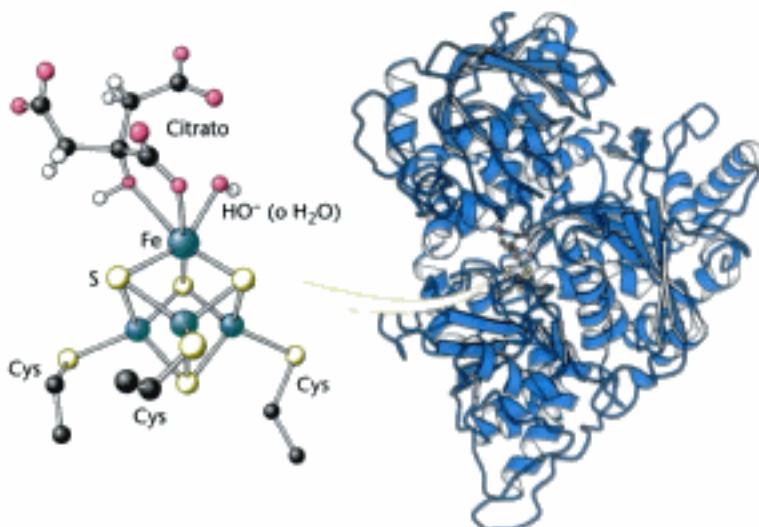
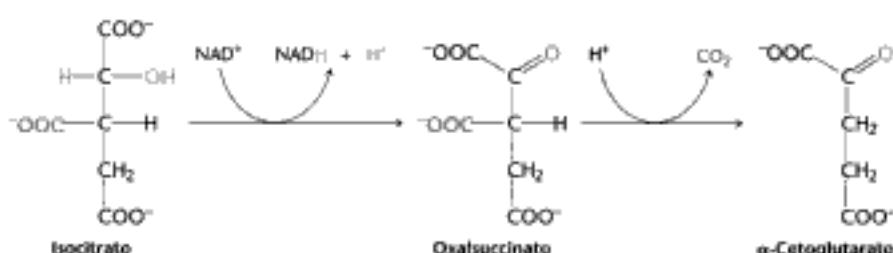


Figura 17.12 Unión del citrato al complejo hierro-azufre de la aconitasa. El complejo hierro-azufre 4Fe-4S es un componente del centro activo de la aconitasa. Nótese que uno de los átomos de hierro del complejo se une a los grupos carboxilato e hidroxilo del citrato. [Tomado de 1C96.pdb.]

El isocitrato se oxida y descarboxila hasta α -cetoglutarato

Llegamos ahora a la primera de las cuatro reacciones de oxidación-reducción del ciclo del ácido cítrico. La descarboxilación oxidativa del isocitrato está catalizada por la *isocitrato deshidrogenasa*.



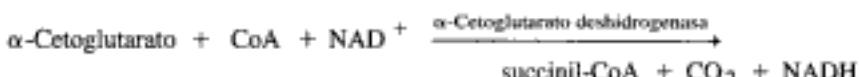
Tal como se verá en la página 492, la velocidad de formación del α -cetoglutarato es importante para determinar la velocidad media del ciclo. Esta oxidación genera el primer portador de electrones de alta energía NADH del ciclo.

Por la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato se forma succinil-coenzima A

La conversión del isocitrato en α -cetoglutarato va seguida de una segunda descarboxilación oxidativa; esta reacción produce succinil-CoA a partir del α -cetoglutarato.



Esta reacción está catalizada por el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, una asociación organizada de tres clases de enzimas, homóloga del complejo piruvato deshidrogenasa. De hecho, la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato se parece mucho a la del piruvato, también un α -cetoácido.

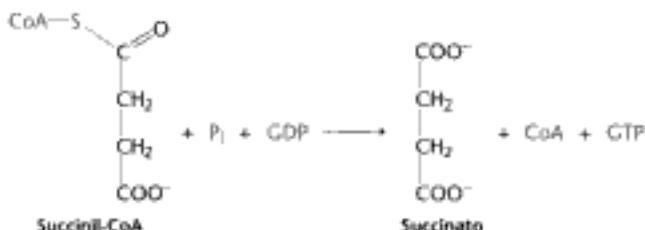


Ambas reacciones incluyen la descarboxilación de un α -cetoácido y la consiguiente formación de un enlace tioéster con CoA de alto potencial de transferencia. El mecanismo de la reacción es totalmente análogo en ambos casos (p. 478).

A partir del succinil-coenzima A se genera un compuesto con alto potencial de transferencia de grupos fosfato

El succinil-tioéster del CoA es un compuesto rico en energía. El ΔG° para la hidrólisis del succinil-CoA es de unos $-33,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ (-8 kcal mol^{-1}), lo que resulta comparable al del ATP ($-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, $6 - 7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$). En la reacción de la citrato sintasa, la ruptura del enlace tioéster proporciona la energía para la síntesis del citrato de seis carbonos a partir del oxalacetato de cuatro carbonos y un

grupo de dos carbonos. La ruptura del enlace tioéster del succinil-CoA se acopla a la fosforilación de un nucleósido difosfato de purina, normalmente GDP. Esta reacción está catalizada por la succinil-CoA sintetasa (succinato tioquinasa).



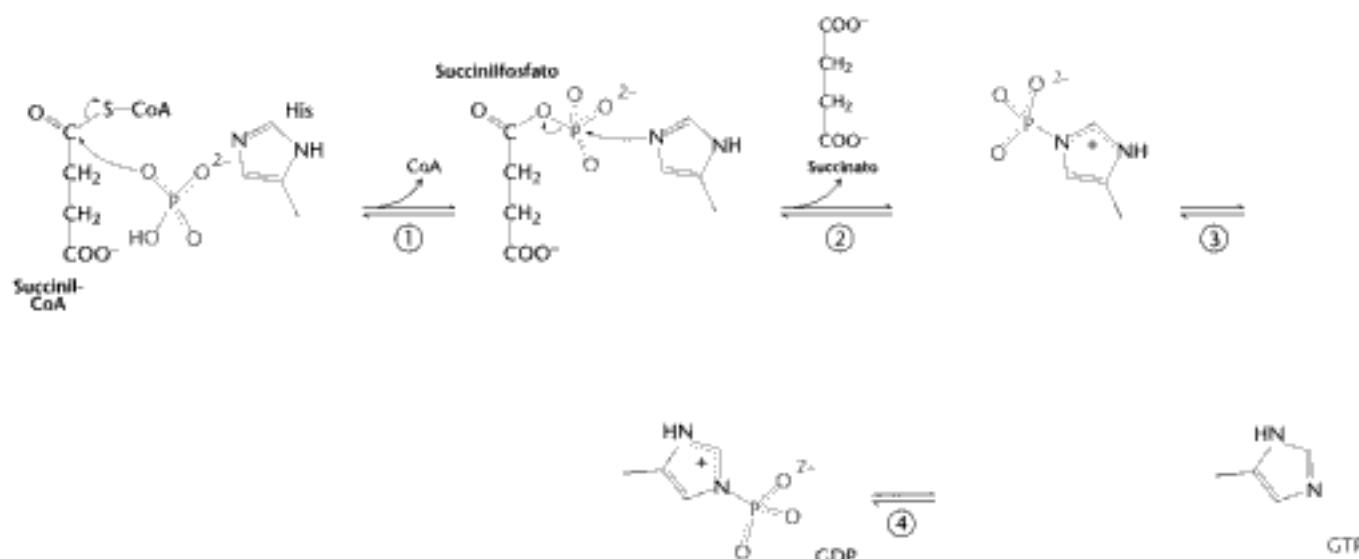
Ésta es la única etapa del ciclo del ácido cítrico que proporciona directamente, un enlace fosfato de alta energía. Algunas succinil-CoA sintetasas de mamíferos son específicas para el GDP y otras lo son para el ADP. El enzima de *E. coli* utiliza tanto GDP como ADP como acceptor de grupos fosforilo. Anteriormente vimos como el GTP es un componente importante de los sistemas de transducción de señales (Capítulo 14). Asimismo, su grupo γ -fosforilo se puede transferir con facilidad al ADP para formar ATP, en una reacción catalizada por la *nucleósido difosfoquinasa*.

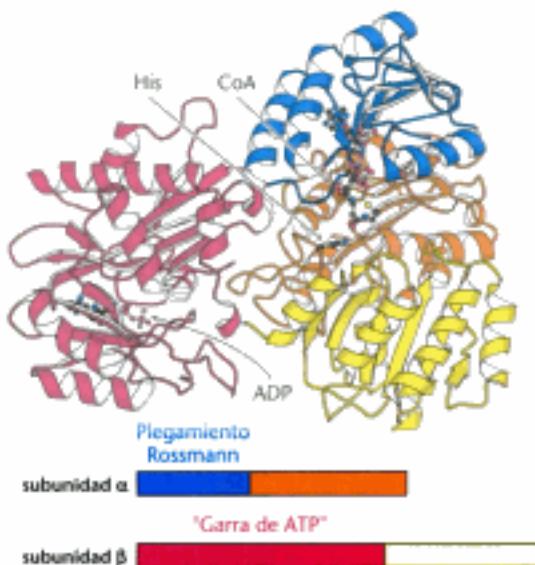


Mecanismo: la succinil-CoA sintetasa transforma los tipos de energía bioquímica

El mecanismo de esta reacción constituye un claro ejemplo de transformación de la energía: la energía de la molécula tioéster se transforma en potencial de transferencia de grupo fosforilo (Figura 17.13). En el primer paso, un grupo ortofosfato desplaza al CoA, lo cual genera succinilfosfato, otro compuesto rico en energía. Un residuo de histidina desempeña un papel clave al desplazar un brazo que transporta el grupo fosforilo, el cual bascula hacia un nucleósido difosfato previamente unido y le transfiere el grupo fosforilo para formar el nucleósido trifosfato. La participación de compuestos de alta energía en todas las etapas viene avalada por el hecho de que la reacción es fácilmente reversible: $\Delta G^\circ = -3,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$). La formación de GTP a expensas del succinil-CoA es un ejemplo de fosforilación a nivel sustrato.

Figura 17.13 Mecanismo de reacción de la succinil-CoA sintetasa. La reacción tiene lugar mediante un intermediario fosforilado del enzima. (1) El ortofosfato desplaza al coenzima A, el cual genera succinilfosfato, otro compuesto rico en energía, el succinilhifosfato. (2) Un residuo de histidina arranca el grupo fosforilo con lo que genera succinato y fosforilhistidina. (3) El residuo fosforilhistidina se desplaza entonces hacia un nucleósido difosfato unido, y (4) el grupo fosforilo es transferido para originar el nucleósido trifosfato.

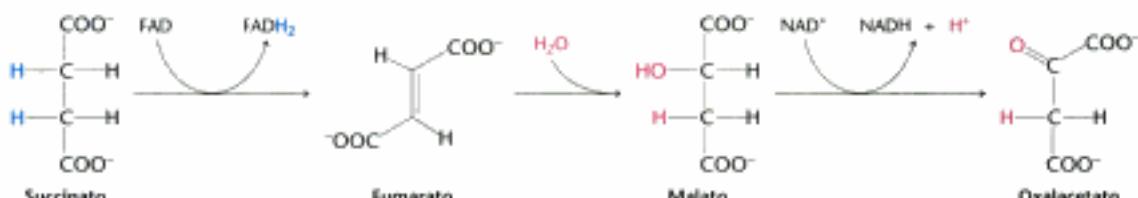




Y La succinil-CoA sintetasa es un heterodímero $\alpha_2\beta_2$; la unidad funcional es la pareja $\alpha\beta$. El mecanismo del enzima muestra que primero se transfiere el grupo fosforilo al succinil-CoA unido a la subunidad α y seguidamente se transfiere al nucleótido difosfato unido a la subunidad β . El examen de la estructura tridimensional de la succinil-CoA sintetasa revela que cada subunidad presenta dos dominios (Figura 17.14). Los dominios amino terminales de las dos subunidades tienen estructuras diferentes, siendo cada uno característico de su papel en el mecanismo de la reacción. El dominio amino terminal de la subunidad α presenta un plegamiento Rossmann (p. 449), el cual se une al componente ADP del succinil-CoA, en tanto que el dominio amino terminal de la subunidad β es un dominio cazador de ATP ("garra de ATP"), hallado en muchos enzimas, el cual aquí se une y activa al GDP. La succinil-CoA sintetasa ha evolucionado adoptando y aparejando estos dominios de tal modo que le permite capturar la energía asociada a la ruptura del succinil-CoA para generar un nucleótido trifosfato.

El oxalacetato se regenera por oxidación del succinato

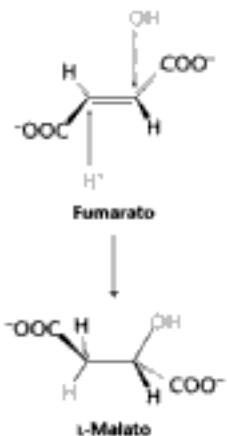
La etapa final del ciclo del ácido cítrico: la regeneración del oxalacetato, está formada por una serie de reacciones de compuestos de cuatro carbonos.



Estas reacciones constituyen un patrón metabólico que nuevamente veremos en la síntesis y degradación de los ácidos grasos al igual que en la degradación de algunos aminoácidos. La transformación de un grupo metíleno (CH_2) en un grupo carbonilo (C=O) tiene lugar en tres etapas: una oxidación, una hidratación, y una segunda reacción de oxidación. En cada vuelta del ciclo no sólo se regenera el oxalacetato, sino que también se acumula energía en forma FADH_2 y NADH .

El succinato se oxida a fumarato mediante la *succinato deshidrogenasa*. El acceptor de hidrógeno es el FAD en vez del NAD^+ , que se utiliza en otras tres reacciones de oxidación del ciclo. En la succinato deshidrogenasa, el anillo de isoaloxazina del

FAD está unido covalentemente a la cadena lateral de una histidina del enzima (se representa E-FAD). El FAD es el aceptor de hidrógeno en esta reacción porque el cambio de energía libre es insuficiente para reducir al NAD⁺. El FAD actúa casi siempre como aceptor de electrones en las oxidaciones que suponen arrancar dos *dítoxos* de hidrógeno al sustrato.



La succinato deshidrogenasa, al igual que la aconitasa, es una ferro-sulfo-proteína. De hecho, la succinato deshidrogenasa contiene tres clases diferentes de agrupaciones hierro-azufre, 2Fe-2S (dos hierros unidos a dos sulfuros inorgánicos), 3Fe-4S, y 4Fe-4S. La succinato deshidrogenasa, que está formada por dos subunidades, una de 70 kd y otra de 27 kd, difiere de los demás enzimas del ciclo del ácido cítrico en que es parte integrante de la membrana interna mitocondrial. De hecho, *la succinato deshidrogenasa está directamente unida a la cadena de transporte electrónico, cadena que constituye el nexo de unión entre el ciclo del ácido cítrico y la formación de ATP*. El FADH₂ producido por la oxidación del succinato no se disocia del enzima, a diferencia del NADH producido en otras reacciones de oxidación-reducción. En lugar de ello, dos electrones del FADH₂ se transfieren directamente a las agrupaciones Fe-S del enzima, que, a su vez, pasan los electrones al coenzima Q (CoQ). El coenzima Q, un miembro importante de la cadena de transporte electrónico, pasa los electrones al oxígeno molecular, tal como se verá en el Capítulo 18.

La siguiente etapa del ciclo es la hidratación del fumarato para formar L-malato. La *fumarasa* cataliza una adición estereoespecífica en trans de un H⁺ y un OH⁻. El grupo OH⁻ se añade solamente a un lado del doble enlace del fumarato; por tanto, sólo se forma el isómero L del malato.

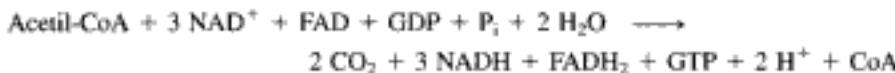
Finalmente, el malato se oxida para formar oxalacetato. Esta reacción está catalizada por la *malato deshidrogenasa* y de nuevo es el NAD⁺ el aceptor de hidrógeno.



Es de señalar que la energía libre estándar de esta reacción, a diferencia de las otras reacciones del ciclo del ácido cítrico, es notablemente positiva ($\Delta G^\circ = +29,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ó $+7,1 \text{ kcal mol}^{-1}$). La oxidación del malato resulta posible por la utilización de sus productos, oxalacetato por la citrato sintasa y NADH por la cadena de transporte de electrones.

El ciclo del ácido cítrico produce electrones con alto potencial de transferencia, GTP y CO₂

La reacción global del ciclo del ácido cítrico es:



Las reacciones que dan esta estequiométría (Figura 17.15 y Tabla 17.2) se resumen a continuación:

1. En la condensación de una unidad de acetilo (del acetil-CoA) con el oxalacetato entran en el ciclo dos átomos de carbono. Por las descarboxilaciones sucesivas catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa salen del ciclo dos carbonos en forma de CO₂.
2. En las cuatro reacciones de oxidación salen del ciclo cuatro pares de átomos de hidrógeno. En las descarboxilaciones oxidativas del isocitrato y del α -cetoglutarato se reducen dos moléculas de NAD⁺; en la oxidación del succinato se reduce una molécula de FAD y en la oxidación del malato se reduce otra de NAD⁺. Recordemos

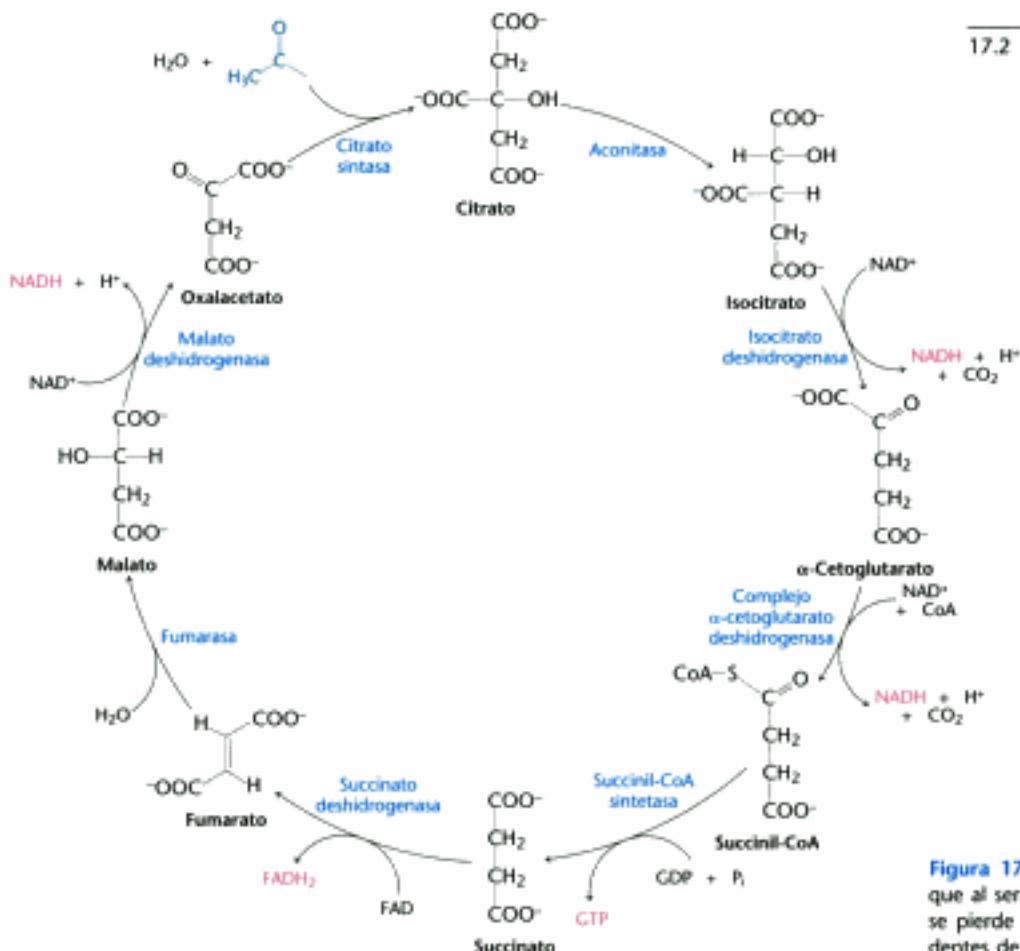


Figura 17.15 Ciclo del ácido cítrico. Nótese que al ser el succinato una molécula simétrica se pierde la identidad de los carbonos procedentes de la unidad acetilo.

aquí que en la descarboxilación oxidativa del piruvato para formar acetil-CoA también se reduce una molécula de NAD^+ .

3. A partir del enlace tioéster del succinil-CoA se genera un compuesto, normalmente GTP, con alto potencial de transferencia de fosforilos.

4. Se consumen dos moléculas de agua: una en la síntesis del citrato, por la hidrólisis del citrilo-CoA, y la otra en la hidratación del fumarato.

TABLA 17.2 Ciclo del ácido cítrico

Etapa	Reacción	Enzima	Grupo prostético	Tipo*	ΔG°	
					kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}
1	Acetil-CoA + oxalacetato + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ citrato + CoA + H^+	Citrato sintasa		a	-31,4	-7,5
2a	Citrato \rightleftharpoons cis-aconitato + H_2O	Aconitasa	Fe-S	b	+8,4	+2,0
2b	cis-Aconitato + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ isocitrato	Aconitasa	Fe-S	c	-2,1	-0,5
3	Isocitrato + $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons$ α -cetoglutarato + $\text{CO}_2 + \text{NADH}$	Isocitrato deshidrogenasa		d + e	-8,4	-2,0
4	α -Cetoglutarato + $\text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightleftharpoons$ succinil-CoA + $\text{CO}_2 + \text{NADH}$	Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa	ácido lipoico, FAD, TPP	d + e	-30,1	-7,2
5	Succinil-CoA + Pi + GDP \rightleftharpoons succinato + GTP + CoA	Succinil-CoA sintetasa		f	-3,3	-0,8
6	Succinato + FAD (unido al enzima) \rightleftharpoons fumarato + FADH ₂ (unido al enzima)	Succinato deshidrogenasa	FAD, Fe-S	e	0	0
7	Fumarato + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ L-malato	Fumarasa		c	-3,8	-0,9
8	L-Malato + $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons$ oxalacetato + $\text{NADH} + \text{H}^+$	Malato deshidrogenasa		e	+29,7	+7,1

* Tipo de reacción: (a) condensación; (b) deshidratación; (c) hidratación; (d) descarboxilación; (e) oxidación; (f) fosforilación a nivel sustrato.

Los resultados de los estudios con marcaje isotópico han demostrado que los dos átomos que salen del ciclo son diferentes de los que entran en cada vuelta. Los dos átomos de carbono que entran en el ciclo en forma de grupos acetilo resultan retenidos en las dos primeras reacciones de descarboxilación (ver figura 17.15), y permanecen incorporados en los ácidos tetracarbonados del ciclo. Nótese que el succinato es una molécula simétrica. En consecuencia, los dos átomos de carbono que entran en el ciclo pueden ocupar cualesquiera de las posiciones del carbono en el subsiguiente metabolismo de los ácidos tetracarbonados. Los dos átomos de carbono que entran en el ciclo como grupo acetilo serán liberados en forma de CO_2 en pasos *subsiguentes* del propio ciclo. Para comprender por qué el citrato no recibe un tratamiento de molécula simétrica, resolver los problemas 11 y 12.

Se están acumulando evidencias de que los enzimas del ciclo del ácido cítrico están asociados físicamente unos a otros. La estrecha asociación de estos enzimas facilitaría la eficacia del ciclo porque los productos de reacción pasarían directamente desde un centro activo al siguiente a través de conductos de conexión, un proceso denominado *canalización del sustrato*. Para nombrar a estos complejos multienzimáticos se ha propuesto el término *metabolón*.

Tal como se verá en el Capítulo 18, el NADH y el FADH_2 formados en el ciclo del ácido cítrico se oxidan en la cadena de transporte de electrones. La transferencia de electrones desde estos transportadores al O_2 , el acceptor final de los electrones, provoca la aparición de un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Esta fuerza protón-motriz favorece la formación de ATP; la estequiometría neta resultante es de unos 2,5 ATPs por cada NADH y 1,5 ATPs por cada FADH_2 . En consecuencia, cuando se oxidan, en la cadena de transporte de electrones, 3 moléculas de NADH y 1 molécula de FADH_2 , se generan 9 enlaces fosfato de alto potencial de transferencia por cada unidad de acetilo que entra en el ciclo del ácido cítrico. Además directamente se forma 1 grupo fosforilo de alta energía. Por lo tanto, por cada unidad de acetato se obtienen aproximadamente 10 moléculas de ATP. La diferencia con la glicolisis anaerobia es significativa, ya que en ella por cada molécula de glucosa sólo se obtenían 2 ATPs (y se forman 2 moléculas de lactato).

Se debe recordar que el oxígeno molecular no interviene directamente en el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, el ciclo opera únicamente en condiciones aeróbicas ya que en la mitocondria sólo se pueden regenerar el NAD^+ y el FAD mediante la transferencia de electrones al oxígeno molecular. *La glicolisis puede ser tanto anaerobia como aerobia, en tanto que el ciclo del ácido cítrico es estrictamente aeróbico.* La glicolisis puede tener lugar en condiciones anaeróbicas porque el NAD^+ se regenera en la conversión del piruvato en lactato o etanol.

17.3 La entrada en el ciclo del ácido cítrico y sus reacciones están controladas

El ciclo del ácido cítrico es la vía final común para la oxidación aeróbica de las moléculas energéticas. Aún más, tal como veremos en breve (Sección 17.4) y repetidamente en cualquier parte de nuestro estudio de la bioquímica, el ciclo es una fuente importante de precursores de una multitud de biomoléculas importantes. Dado su papel de centro metabólico de la célula, su entrada y velocidad están controladas en varios puntos.

El complejo piruvato deshidrogenasa se regula alostéricamente mediante fosforilación reversible

Tal como se ha visto anteriormente, se puede obtener glucosa a partir del piruvato (Sección 16.3). Sin embargo, la formación de acetil-CoA desde piruvato es un proceso irreversible en los animales y por tanto éstos son incapaces de reconvertir el acetil-CoA en glucosa. La descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA dirige a los átomos de carbono de la glucosa hacia dos destinos principales: oxidación

a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico, con la consiguiente generación de energía, o bien su incorporación a los lípidos (Figura 17.16). Tal y como sería de esperar, en un enzima situado en un punto crítico del metabolismo, la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa está estrictamente regulada. La reacción del complejo se inhibe mediante altas concentraciones de los productos de reacción: el acetil-CoA inhibe al componente transacetilasa (E_2) por unión directa, en tanto que el NADH inhibe a la dihidrolipoilo deshidrogenasa (E_3). Concentraciones elevadas de NADH y de acetil-CoA informan al enzima que las necesidades energéticas de la célula han sido atendidas o que los ácidos grasos se están degradando para producir acetil-CoA y NADH (p. 624). En cualquier caso no hay necesidad de metabolizar al piruvato hacia acetil-CoA. Esta inhibición tiene el efecto de ahorrar glucosa, ya que la mayor parte del piruvato procede de la glucosa a través de la glicolisis (Sección 16.1).

Sin embargo, en los eucariotas, el método principal para su regulación consiste en la modificación covalente del componente piruvato deshidrogenasa (figura 17.17). *La fosforilación mediante una quinasa específica del componente piruvato deshidrogenasa (E_1) desactiva al complejo. Mediante la acción de una fosfatasa específica se revierte la desactivación.* La quinasa está asociada al componente transacetilasa (E_2), resaltando nuevamente la importancia estructural y mecánica de este núcleo. Tanto la quinasa como la fosfatasa están reguladas. Para ver cómo trabaja esta regulación en condiciones fisiológicas consideremos el músculo que entra en actividad después de un periodo de reposo (figura 17.18). Durante el reposo el músculo no tendrá demandas significativas de energía. En consecuencia, las relaciones entre NADH/NAD^+ , acetil-CoA/CoA y ATP/ADP serán elevadas. Estas relaciones altas promueven la fosforilación y por consiguiente la desactivación del complejo. En otras palabras, altas concentraciones de los productos intermedios (acetil-CoA, NADH) y del producto final (ATP) inhiben la actividad. Por tanto, *la piruvato deshidrogenasa se desactiva cuando la carga energética es elevada y los intermediarios biosintéticos son abundantes*.

Cuando empieza el ejercicio las concentraciones de ADP y piruvato aumentarán a medida que la contracción muscular consume ATP y la glucosa se convierte en pi-



Figura 17.16 De la glucosa al acetil-CoA. La síntesis de acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa es una etapa clave e irreversible en el metabolismo de la glucosa.

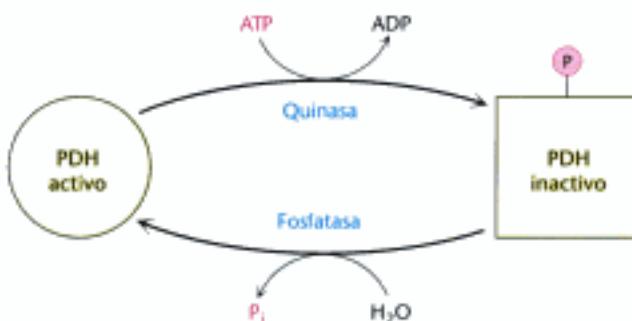


Figura 17.17 Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa. Una quinasa específica fosforila y desactiva a la piruvato deshidrogenasa (PDH) y una fosfatasa la activa al eliminar el grupo fosfato. La quinasa y la fosfatasa son también enzimas muy regulados.

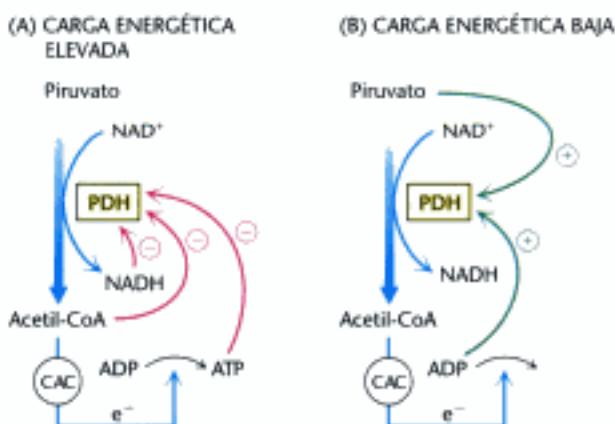


Figura 17.18 Respuesta del complejo piruvato deshidrogenasa a la carga energética. El complejo piruvato deshidrogenasa responde a la carga energética celular. (A) El complejo resulta inhibido por sus productos intermedios, NADH y acetil-CoA, así como por el ATP, el producto final de la respiración celular. (B) El complejo es activado por el piruvato y el ADP, los cuales inhiben a la quinasa que fosforila al PDH.

ruvato para satisfacer las necesidades energéticas. Tanto el ADP como el piruvato activan a la deshidrogenasa al inhibir a la quinasa. Además, la fosfatasa resulta estimulada por el Ca^{2+} , la misma señal que inicia la contracción muscular. Una elevación del nivel de Ca^{2+} citoplasmático (p. 355) eleva el nivel de Ca^{2+} mitocondrial. El aumento de Ca^{2+} mitocondrial activa a la fosfatasa, potenciando la actividad de la piruvato deshidrogenasa.

En algunos tejidos, la fosfatasa es regulada por hormonas. En el hígado, la adrenalina se une al receptor α -adrenérgico para iniciar la vía del fosfatidilinositol (p. 388), lo que provoca un aumento en la concentración de Ca^{2+} que activa a la fosfatasa. En los tejidos capaces de sintetizar ácidos grasos, tales como el hígado y el tejido adiposo, la insulina, la hormona que significa "estado alimentado", estimula a la fosfatasa, aumentando la conversión del piruvato en acetil-CoA. El acetil-CoA es el precursor de la síntesis de ácidos grasos (p. 635). En esos tejidos, el complejo piruvato deshidrogenasa se activa para canalizar la glucosa hacia piruvato y después a acetil-CoA, acabando en ácidos grasos.

 En las personas con deficiencia de fosfatasa, la piruvato deshidrogenasa está siempre fosforilada y por tanto inactiva. Por consiguiente, la glucosa se procesa hacia ácido láctico. Este hecho se manifiesta como una acidosis láctica crónica: niveles altos de ácido láctico en sangre. Este síndrome conduce a desarreglos en el funcionamiento de muchos tejidos, muy especialmente del sistema nervioso central.

El ciclo del ácido cítrico está controlado en varios puntos

En las células de animales, la velocidad del ciclo del ácido cítrico se ajusta con precisión para satisfacer las necesidades celulares de ATP (Figura 17.19). Los puntos primarios de control son los enzimas alostéricos isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, los dos primeros enzimas del ciclo que generan electrones de alta energía.

El primer sitio de control es la isocitrato deshidrogenasa. El enzima es estimulado alostéricamente por el ADP, el cual aumenta la afinidad del enzima por sus sustratos. La unión de isocitrato, NAD^+ , Mg^{2+} y ADP es mutuamente cooperativa. Por el contrario, el ATP resulta inhibidor. El producto de la reacción, el NADH, inhibe a la isocitrato deshidrogenasa desplazando directamente al NAD^+ . El ATP también actúa como inhibidor. Es importante anotar que varias etapas del ciclo requieren NAD^+ o FAD, que sólo son abundantes cuando la carga energética es baja.

Un segundo punto de control del ciclo del ácido cítrico es la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Algunos aspectos de su control son análogos a los del complejo piruvato deshidrogenasa, tal como podría esperarse dada la homología de los dos enzimas. La α -cetoglutarato deshidrogenasa se inhibe mediante el succinil-CoA y el NADH, los productos de la reacción que cataliza. Además, la α -cetoglutarato deshidrogenasa se inhibe por una carga energética alta. Por tanto, *la velocidad del ciclo se reduce cuando la célula dispone de un alto nivel de ATP*.

El uso de la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa como puntos de control integra el ciclo del ácido cítrico en el metabolismo. Por ejemplo, la inhibición de la isocitrato deshidrogenasa conduce a una acumulación de citrato, debido a que la interconversión del citrato y el isocitrato, en condiciones intracelulares, es fácilmente reversible. El citrato puede transportarse al citoplasma donde actúa sobre la fosfofructoquinasa parando la glicolisis (p. 455) y donde puede servir como fuente de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos (p. 638). El α -cetoglutarato que se acumula cuando se inhibe a la α -cetoglutarato deshidrogenasa puede utilizarse como precursor de varios aminoácidos y de bases púricas (pp. 683 y 714).

En muchas bacterias, también se controla la entrada en el ciclo de los fragmentos de dos carbonos. *En estos organismos la síntesis de citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA es un punto de control importante.* El ATP es un inhibidor alostérico de la citrato sintasa. El efecto del ATP es aumentar la K_m para el acetil-CoA.

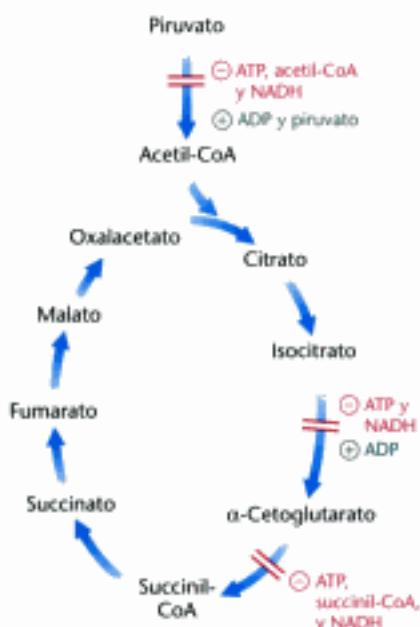


Figura 17.19 Control del ciclo del ácido cítrico. El ciclo del ácido cítrico se regula principalmente por las concentraciones de ATP y NADH. Los enzimas isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa son los puntos cruciales de control.

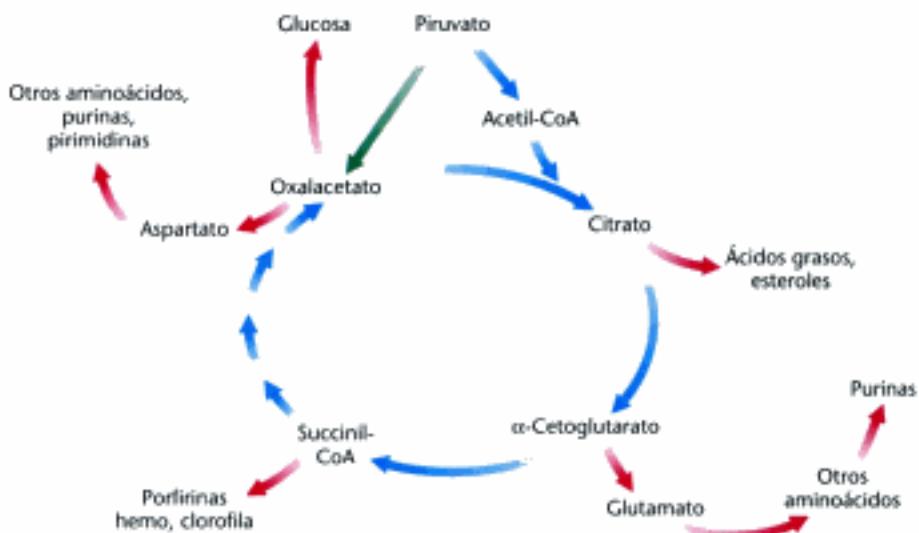


Figura 17.20 Funciones biosintéticas del ciclo del ácido cítrico. Los intermediarios sustraídos para la biosíntesis (representados por flechas rojas) se reponen mediante la formación de oxalacetato a partir del piruvato.

Así, a medida que el nivel de ATP aumenta, una menor proporción del enzima queda saturado con acetil-CoA y por ello se forma menos citrato.

17.4 El ciclo del ácido cítrico es una fuente de precursores biosintéticos

Hasta ahora se ha abordado la función del ciclo del ácido cítrico como la *vía degradativa más importante para la generación de ATP*. Al ser el centro metabólico principal de la célula, el ciclo del ácido cítrico también *suministra intermediarios para la biosíntesis* (Figura 17.20). Por ejemplo, la mayoría de los átomos de carbono de las porfirinas provienen del *succinil-CoA*. Muchos aminoácidos derivan del *α -cetoglutarato* y del *oxalacetato*. En capítulos siguientes estudiaremos estos procesos biosintéticos.

El ciclo del ácido cítrico debe ser capaz de reponerse con rapidez

Es importante advertir ahora que *los intermediarios del ciclo del ácido cítrico deben ser repuestos cuando se utilizan para la biosíntesis*. Supongamos que el oxalacetato se convierte en aminoácidos para la síntesis de proteínas y, en consecuencia, las necesidades energéticas de la célula aumentan. A menos que se forme oxalacetato *de novo*, el ciclo del ácido cítrico funcionará bajo mínimos ya que no podrá entrar acetil-CoA para condensarse con el oxalacetato. Incluso cuando el oxalacetato se utilice para otras vías, se debe mantener una concentración mínima que garantice el funcionamiento del ciclo.

¿Cómo se repone el oxalacetato? Los mamíferos carecen de los enzimas necesarios para convertir directamente el acetil-CoA en oxalacetato u otro intermediario del ciclo. Propiamente, el oxalacetato se forma mediante la carboxilación del piruvato, en una reacción catalizada por el enzima *piruvato carboxilasa* que es dependiente de biotina (Figura 17.21).



Se debe recordar que este enzima juega un papel importante en la gluconeogénesis (p. 460). Sólo está activo en presencia de acetil-CoA, lo cual significa que existe ne-



Figura 17.21 Integración de las vías. Vías activas durante el ejercicio después del descanso nocturno. La velocidad del ciclo del ácido cítrico aumenta durante el ejercicio, lo que requiere la reposición del oxalacetato y el acetil-CoA. El oxalacetato se repone mediante su formación a partir del piruvato. El acetil-CoA puede obtenerse del metabolismo tanto del piruvato como de los ácidos grasos.

cesidad de más oxalacetato. Si la carga energética es alta, el oxalacetato se transforma en glucosa. Si la carga energética es baja, el oxalacetato se incorpora al ciclo del ácido cítrico. La síntesis de oxalacetato por carboxilación del piruvato es un ejemplo de *reacción anaplerótica* (del griego, "rellenar") que conduce hacia una síntesis o hacia una reposición de componentes de vías metabólicas. Obsérvese que, dado que el ciclo del ácido cítrico es, como su nombre indica, un ciclo, sus componentes se pueden regenerar por la formación de cualquiera de sus intermediarios.

La interrupción del metabolismo del piruvato es la causa del beriberi y del envenenamiento por mercurio y arsénico

Beriberi

Enfermedad por carencia de vitaminas descrita por primera vez en 1630 por Jacob Boenius, un médico holandés que trabajaba en Java:

Una cierta aflicción muy penosa, que ataca a los hombres, es la llamada beriberi (que significa cordero). Creo que a aquellos a los que ataca esta enfermedad, con sus rodillas temblando y las piernas levantadas, caminan como corderos. Es una especie de parálisis, o más bien un temblor, puesto que afecta al movimiento y sensibilidad de las manos y pies y a veces del cuerpo entero.

 El *beriberi*, una enfermedad neurológica y cardiovascular, está causado por una deficiencia dietética de tiamina (también llamada *vitamina B₁*). La enfermedad ha sido y continúa siendo un grave problema de salud en el Extremo Oriente, porque el arroz, el alimento principal, tiene un nivel de tiamina muy bajo. Esta deficiencia se disminuye parcialmente si el grano de arroz completo se remoja en agua antes de molerlo. Parte de la tiamina de la cascarrilla se adhiere al grano. El problema se exacerba si el arroz se descascarilla, ya que solamente la capa externa contiene cantidades apreciables de tiamina. También aparece ocasionalmente beriberi en los alcohólicos muy desnutridos y por tanto deficientes en tiamina. La enfermedad se caracteriza por síntomas neurológicos y cardiológicos. El deterioro del sistema nervioso periférico se manifiesta como dolor en las extremidades, debilidad muscular y sensibilidad epidérmica distorsionada. El corazón puede tener mayor tamaño del normal y presentar un bombeo deficiente.

¿Qué procesos pueden estar afectados por la deficiencia de tiamina? La *tiamina pirofosfato* es el grupo prostético de tres enzimas importantes: la *piruvato deshidrogenasa*, la α -*cetoglutarato deshidrogenasa* y la *transacetolasa*. Tal como se verá en el Capítulo 20, la transacetolasa interviene en la vía de las pentosas fosfato. El aspecto común de las reacciones enzimáticas que utilizan TPP es la transferencia de una unidad activada de aldehido. En el beriberi, los niveles sanguíneos de piruvato y α -cetoglutarato son mayores de lo normal. El aumento del nivel de piruvato en sangre es especialmente acusado después de la ingesta de glucosa. Un hecho relacionado es que las actividades *in vivo* de los complejos piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa son anormalmente bajos. En el beriberi la baja actividad transacetolasa de los glóbulos rojos se determina con facilidad y es un indicador útil en el diagnóstico de la enfermedad.

¿Cómo la deficiencia en TPP ocasiona enfermedades neurológicas? En principio el sistema nervioso sólo utiliza glucosa como fuente de energía. El producto de la glicólisis aerobia, piruvato, únicamente puede entrar en el ciclo del ácido cítrico mediante el complejo piruvato deshidrogenasa. Con el enzima desactivado, el sistema nervioso no dispone de fuente de combustible. En cambio, la mayoría de los tejidos restantes pueden utilizar las grasas como fuente de energía para el ciclo del ácido cítrico.

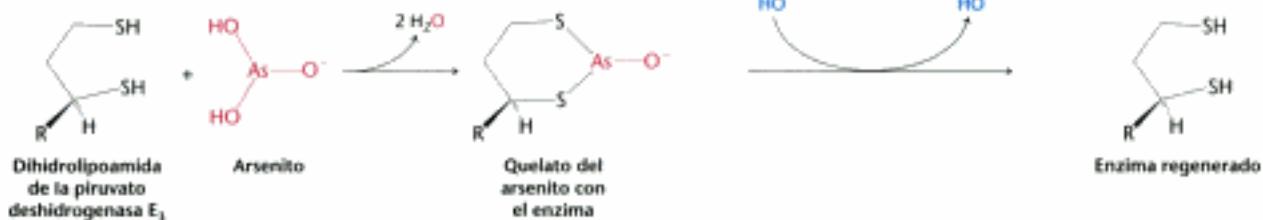
En organismos expuestos al mercurio o al arsenito (AsO_3^{3-}) se presentan síntomas similares al beriberi. Ambos materiales tienen una elevada afinidad por los sulfhidrilos próximos, tales como los que presentan los grupos dihidrolipoilo reducidos del componente dihidrolipoilo deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa (Figura 17.22). La unión del mercurio o del arsenito a los grupos dihidrolipoilo inhibe al complejo y origina procesos patológicos en el sistema nervioso central. La proverbial frase de "loco como un sombrerero" hace referencia al envenenamiento de los sombrereros que utilizan nitrato mercuríco para suavizar y curtir las pieles animales. Esta sal mercuríca se absorbe a través de la piel. Problemas similares presentaban los primeros fotógrafos, porque empleaban vapores de mercurio para obtener los daguerrotipos.

El tratamiento para estos envenenamientos consiste en la administración de reactivos sulfurados con grupos sulfhidrilo adyacentes para que compitan con los residuos de dihidrolipoilo en la unión con el ion metálico, y que puedan excretarse en la orina. Así, durante la Primera Guerra Mundial se utilizó el 2,3-dimercaptopropano-



[The Granger Collection.]

Figura 17.22 Envenenamiento por arsenito. El arsenito inhibe al complejo piruvato deshidrogenasa por inactivación del componente dihidrolipoamida de la transacetilasa. Algunos reactivos sulfurados, tales como el 2,3-dimercaptopropanol, revierten la inhibición al formar un complejo excretable con el arsenito.



nol (ver Figura 17.22) como antídoto contra la lewisita, una arma química basada en el arsénico. A este compuesto inicialmente se le denominó BAL, anti-lewisita británica (*British anti-lewisite*).

El ciclo del ácido cítrico puede haber evolucionado a partir de vías preexistentes

¿Cómo apareció el ciclo del ácido cítrico? Aunque no existan respuestas definitivas, es sin embargo instructivo especular sobre el desarrollo de este complicado núcleo central del metabolismo. Quizás a nivel de las vías metabólicas podemos comenzar a comprender como pudo tener lugar la evolución.

Es muy posible que el ciclo del ácido cítrico proceda del ensamblado de vías preexistentes. Tal como hemos visto, muchos de los intermediarios formados en el ciclo del ácido cítrico se utilizan en las vías biosintéticas que generan aminoácidos y porfirinas. Por tanto, compuestos como el piruvato, α -cetoglutarato y oxalacetato presumiblemente ya estaban presentes con fines biosintéticos en los momentos iniciales de la evolución. La descarboxilación oxidativa de estos α -cetoácidos es termodinámicamente muy favorable y puede utilizarse para conducir a la síntesis de derivados de acil-CoA y NADH. Estas reacciones también con seguridad constituyan los procesos centrales que precedieron a la evolución del ciclo del ácido cítrico. Curiosamente, el α -cetoglutarato puede convertirse directamente en oxalacetato por desaminación de los aminoácidos respectivos mediante la aspartato aminotransferasa, otro enzima clave en la biosíntesis. Por tanto, antes de que el ciclo actual evolucionase para atrapar con mayor eficacia los electrones del piruvato y de otros compuestos pudieron existir otros ciclos con un menor número de intermediarios.

El manuscrito en el que se proponía el ciclo del ácido cítrico fue enviado para su publicación a *Nature* pero fue rechazado. Por tanto fue publicado en *Enzymologia*. A lo largo de su carrera el Dr. Krebs exhibió con orgullo la carta de rechazo para animar a los científicos jóvenes.

"Junio de 1937

El editor de *NATURE* presenta sus respetos al Dr. H. A. Krebs y le comunica que ya dispone de bastantes trabajos para completar las correspondientes columnas de *NATURE* durante siete u ocho semanas; en el momento actual es imposible aceptar nuevos trabajos dado el retraso en el tiempo necesario para su publicación.

Si al Dr. Krebs no le importa mucho el retraso, el editor puede guardar su trabajo hasta que pueda ser publicado en el supuesto de que podamos utilizarlo.

Ahora se le devuelve, por si el Dr. Krebs prefiere enviarlo a otra revista para su pronta publicación."

17.5 El ciclo del glicoxilato permite a las plantas y bacterias crecer en acetato y

Muchas plantas y bacterias son capaces de crecer nutriéndose de acetato o de otros compuestos que produzcan acetil-CoA. El acetil-CoA puede sintetizarse a partir del acetato y el CoA con una reacción impulsada por el ATP y catalizada por la *acetil-CoA sintetasa*.



El pirofosfato se hidroliza después a ortofosfato y por ello se consume el equivalente a dos compuestos con elevado potencial de transferencia de fosforilos en la activación del acetato.

La acetil-CoA sintetasa está presente en muchos organismos, incluidos los seres humanos. ¿Por qué las plantas y determinadas bacterias pueden vivir con acetato como única fuente de energía y el hombre no? El acetil-CoA no puede convertirse en piruvato, un precursor de la gluconeogénesis, porque la reacción de la piruvato deshidrogenasa es irreversible. Sin embargo, las plantas y algunas bacterias utilizan una vía metabólica, ausente en la mayoría de los restantes seres vivos, que transforma unidades acetilo, de dos carbonos, en unidades de cuatro carbonos (succinato) para producir energía y para la biosíntesis incluyendo la síntesis de glucosa. Esta secuencia de reacciones, conocida como *ciclo del glicoxilato*, es semejante al ciclo del ácido cítrico, pero evita sus dos etapas descarboxilativas. Otra diferencia clave es que en cada vuelta del ciclo del glicoxilato entran dos moléculas de acetil-CoA, en tanto que en el ciclo del ácido cítrico sólo entra una.

El ciclo del glicoxilato (Figura 17.23), al igual que el ciclo del ácido cítrico, comienza con la condensación del acetil-CoA y oxalacetato para formar citrato, el cual se isomeriza a isocitrato. Éste, en vez de descarboxilarse, es escindido por la *isocitrato liasa* en succinato y glicoxilato. Las etapas siguientes regeneran el oxalacetato a partir del glicoxilato. Primero, el acetil-CoA se condensa con el glicoxilato para formar malato, en una reacción catalizada por la *malato sintasa*, y entonces el malato se oxida a oxalacetato, igual que en el ciclo del ácido cítrico. La suma de estas reacciones es:



En las plantas estas reacciones tienen lugar en unos orgánulos denominados *glicoxisomas*. Este ciclo es especialmente efectivo en las semillas oleaginosas, tales como las del girasol, pepino y ricino. Combinando el ciclo del ácido cítrico y la glucone-

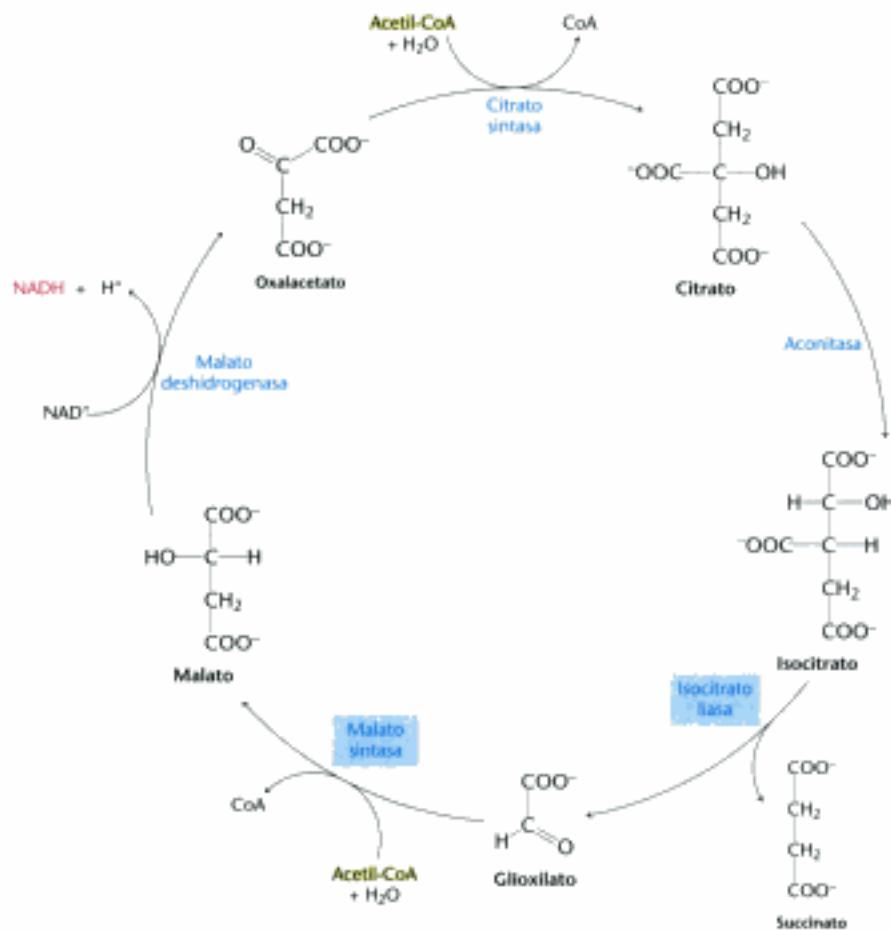


Figura 17.23 Vía del glicoxilato. El ciclo del glicoxilato permite a las plantas y a algunos microorganismos crecer en acetato ya que el ciclo evita las etapas descarboxilativas del ciclo del ácido cítrico. Las reacciones de este ciclo son las mismas que las del ciclo del ácido cítrico, excepto las catalizadas por la isocitrato liasa y la malato sintasa, que están encerradas en azul.

génesis, el succinato, obtenido en la mitad del ciclo, puede ser transformado en carbohidratos. Los carbohidratos potencian el crecimiento de las plántulas hasta que sus células pueden empezar la fotosíntesis. Esto hace que los organismos que poseen el ciclo del glicoxilato ganen en versatilidad metabólica, porque pueden utilizar el acetil-CoA como precursor de la glucosa y de otras biomoléculas.

Resumen

El ciclo del ácido cítrico es la vía final común para la oxidación de las moléculas energéticas. También sirve de fuente de moléculas precursoras para la biosíntesis.

17.1 La piruvato deshidrogenasa conecta la glicolisis con el ciclo del ácido cítrico

La mayoría de las moléculas combustibles entran en el ciclo como acetil-CoA. La descarboxilación oxidativa del piruvato para formar acetil-CoA es el nexo de unión entre la glicolisis y el ciclo del ácido cítrico. En los eucariotas, esta reacción y las del ciclo se producen en el interior de la mitocondria, a diferencia de la glicolisis que tiene lugar en el citoplasma.

17.2 El ciclo del ácido cítrico oxida unidades de dos carbonos

El ciclo comienza con la condensación de oxalacetato (C_4) y acetil-CoA (C_2) para dar citrato (C_6) que se isomeriza a isocitrato (C_6). La descarboxilación oxidativa de este intermediario produce α -cetoglutarato (C_5). La segunda molécula de dióxido de carbono se desprende en la reacción siguiente, en la que el α -cetoglutarato se descarboxila oxidativamente generando succinil-CoA. El enlace tioéster del succinil-CoA se rompe por el ortofosfato para producir succinato, y se genera simultáneamente un enlace fosfato de alta energía en forma de GTP. El succinato se oxida hasta fumarato (C_4), que se hidrata para formar malato (C_4). Finalmente el malato se oxida para regenerar el oxalacetato (C_4). Así pues, dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA entran en el ciclo y dos átomos de carbono dejan el ciclo en la forma de CO_2 en las descarboxilaciones sucesivas catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. En las cuatro reacciones de óxido-reducción del ciclo se transfieren tres pares de electrones al NAD^+ y un par al FAD. Estos transportadores de electrones reducidos son oxidados a continuación por la cadena de transporte de electrones para generar aproximadamente 9 moléculas de ATP. Además, en el ciclo del ácido cítrico se forma directamente un enlace fosforilo de alta energía de transferencia. De aquí que por cada fragmento de dos carbonos oxidado completamente hasta H_2O y CO_2 se generen un total de 10 moléculas de compuestos con enlaces fosforilo de alta energía.

17.3 La entrada en el ciclo del ácido cítrico y sus reacciones están controladas

El ciclo del ácido cítrico opera solamente en condiciones aeróbicas porque requiere el suministro de NAD^+ y FAD. La irreversible formación de acetil-CoA a partir de piruvato es un punto de regulación importante para la entrada en el ciclo del piruvato derivado de la glucosa. La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa está estrechamente controlada mediante fosforilación reversible. Los aceptores de electrones se regeneran cuando el NADH y $FADH_2$ transfieren sus electrones al O_2 en la cadena de transporte de electrones, con la subsiguiente formación de ATP. En consecuencia, la velocidad del ciclo del ácido cítrico depende de las necesidades de ATP. En los eucariotas, otro punto importante de control es la regulación de la actividad de dos enzimas del ciclo. Una carga energética elevada disminuye la actividad de la isocitrato deshidrogenasa y de la

α -cetoglutarato deshidrogenasa. Estos mecanismos se complementan entre sí, reduciendo la velocidad de formación de acetil-CoA cuando la carga energética de las células es alta y cuando los intermediarios biosintéticos son abundantes.

17.4 El ciclo del ácido cítrico es una fuente de precursores biosintéticos

Cuando la célula dispone de energía suficiente, el ciclo del ácido cítrico puede servir como fuente de precursores de biomoléculas importantes, tales como las bases de los nucleótidos, las proteínas, y los grupos hemo. Esta utilización consume los intermediarios del ciclo. Cuando en el ciclo nuevamente se precisa metabolizar moléculas energéticas, las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios que se necesitan.

17.5 El ciclo del glicoxilato permite a las plantas y bacterias crecer en acetato

El ciclo del glicoxilato aumenta la versatilidad metabólica de muchas plantas y bacterias. Este ciclo, que utiliza algunas de las reacciones del ciclo del ácido cítrico, permite a estos organismos sobrevivir a partir del acetato ya que omite las dos etapas descarboxilativas del ciclo del ácido cítrico.

Términos clave

ciclo del ácido cítrico (de los ácidos tricarboxílicos, TCA; de Krebs) (p. 475)
acetil-CoA (p. 475)
fosforilación oxidativa (p. 476)
complejo piruvato deshidrogenasa (p. 477)
flavoproteína (p. 480)

citrato sintasa (p. 482)
ferro-sulfo proteína (proteína hierro-azufre, hierro no hemo) (p. 484)
isocitrato deshidrogenasa (p. 484)
 α -cetoglutarato deshidrogenasa (p. 485)
metabolón (p. 490)

reacción anaplerótica (p. 494)
beriberi (p. 494)
ciclo del glicoxilato (p. 495)
isocitrato liasa (p. 496)
malato sintasa (p. 496)
glicoxisoma (p. 496)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

Sugden, M. C. y Holness, M. J. 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284:E855–E862.
Owen, O. E., Kalhan, S. C. y Hanson, R. W. 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid function. *J. Biol. Chem.* 277:30409–30412.

Complejo piruvato deshidrogenasa

Hiromasa, Y., Fujisawa, T., Aso, Y. y Roche, T. E. 2004. Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding proteins and their capacities to bind the E1 and E3 components. *J. Biol. Chem.* 279:6921–6933.
Izard, T., Åvarsson, A., Allen, M. D., Westphal, A. H., Perham, R. N., De Kok, A. y Hol, W. G. 1999. Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1240–1245.
Åvarsson, A., Seger, K., Turley, S., Sokatch, J. R. y Hol, W. M. J. 1999. Crystal structure of 2-oxoisovalerate dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multiple enzyme complexes. *Nat. Struct. Biol.* 6:785–792.
Domingo, G. J., Chauhan, H. J., Lessard, I. A., Fuller, C. y Perham, R. N. 1999. Self-assembly and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 266:1136–1146.
Jones, D. D., Horne, H. J., Reche, P. A. y Perham, R. N. 2000. Structural determinants of post-translational modification and catalytic specificity for the lipoyl domains of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 295:289–306.

McCartney, R. G., Rice, J. E., Sanderson, S. J., Bunik, V., Lindsay, H. y Lindsay, J. G. 1998. Subunit interactions in the mammalian alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: Evidence for direct association of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and dihydrolipoamide dehydrogenase components. *J. Biol. Chem.* 273:24158–24164.

Estructura de los enzimas del ciclo del ácido cítrico

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tomroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G. y Iwata, S. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700–704.
Chapman, A. D., Cortes, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R. y Brady, R. L. 1999. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: Crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonate and tetrahydNAD. *J. Mol. Biol.* 285:703–712.
Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A. y Woledko, W. T. 1999. A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* 285:1633–1653. [Published erratum appears in May 7, 1999, issue of *J. Mol. Biol.* 288(3):501.]
Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S. y Stout, C. D. 1999. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a/citrate complex. *Protein Sci.* 8:2655–2662.
Remington, S. J. 1992. Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 33:209–229.
Rose, I. A. 1998. How fumarate recycles after the malate → fumarate reaction: Insights into the reaction mechanism. *Biochemistry* 37:17651–17658.
Johnson, J. D., Muñoz, W. W. y Lambeth, D. O. 1998. Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeons: The enzymes incorporate the same subunit. *J. Biol. Chem.* 273:27573–27579.

Karpusas, M., Branchaud, B. y Remington, S. J., 1990. Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate synthase: 1.9-Å structure of the ternary complex with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A. *Biochemistry* 29:2213-2219.

Lamble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. y Stout, C. D., 1992. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* 31:2735-2748.

Organización del ciclo del ácido cítrico

- Lambeth, D. O., Tews, K. N., Adkins, S., Fröhlich, D. y Milavetz, B. I. 2004. Expression of two succinyl-CoA specificities in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 279:36621-36624.
- Velot, C., Mixon, M. B., Teige, M. y Sere, P. A., 1997. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: A model for the metabolism. *Biochemistry* 36:14271-14276.
- Barnes, S. J. y Weitzman, P. D., 1986. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS Lett.* 201:267-270.
- Haggie, P. M. y Beindle, K. M., 1999. Mitochondrial citrate synthase is immobilized in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:3941-3945.
- Morgantow, I. y Sere, P. A., 1998. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase: Substrate channeling of oxaloacetate. *J. Biol. Chem.* 273:29540-29544.

Regulación

- Hiromasa, Y. y Roche, T. E., 2003. Facilitated interaction between the pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 and the dihydrolipoyl acetyltransferases. *J. Biol. Chem.* 278:33681-33693.
- Huang, B., Gudi, R., Wu, P., Harris, R. A., Hamilton, J. y Popov, K. M., 1998. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: DNA-derived

amino acid sequences, expression, and regulation. *J. Biol. Chem.* 273:17680-17688.

Bowker-Kinley, M. y Popov, K. M., 1999. Evidence that pyruvate dehydrogenase kinase belongs to the ATPase/kinase superfamily. *Biochem. J.* 347:53.

Jirapakdee, S. y Wallace, J. C., 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1-16.

Aspectos evolutivos

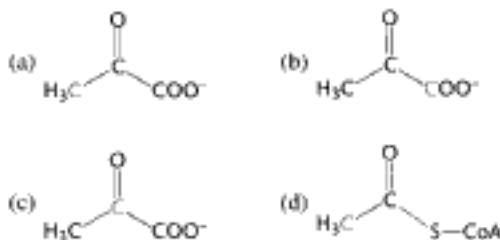
- Meléndez-Hevia, E., Waddell, T. G. y Cascante, M., 1996. The puzzle of the Krebs citric acid cycle: Assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways in evolution. *J. Mol. Evol.* 43:293-303.
- Baldwin, J. E. y Krebs, H., 1981. The evolution of metabolic cycles. *Nature* 291:381-382.
- Gest, H., 1987. Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. *Biochem. Soc. Symp.* 54:3-16.
- Weitzman, P. D. J., 1981. Unity and diversity in some bacterial citric acid cycle enzymes. *Adv. Microbiol. Physiol.* 22:185-244.

Descubrimiento del ciclo del ácido cítrico

- Kornberg, H., 2000. Krebs and his trinity of cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:225-228.
- Krebs, H. A. y Johnson, W. A., 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4:148-156.
- Krebs, H. A., 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154-170.
- Krebs, H. A. y Martin, A., 1981. *Reminiscences and Reflections*. Clarendon Press.

Problemas

1. *Flujo de átomos de carbono.* ¿Cuál es el destino del marcado radiactivo cuando se añade cada uno de los siguientes compuestos a un extracto celular que contiene los enzimas y cofactores de la vía glicolítica, del ciclo del ácido cítrico y el complejo piruvato deshidrogenasa? (El marcado con ^{14}C está indicado en rojo.)



- (e) Glucosa-6-fosfato marcada en el C-1.

2. $\text{C}_2 + \text{C}_2 \rightarrow \text{C}_4$.

- (a) ¿Qué enzimas se requieren para conseguir la síntesis neta del oxalacetato a partir de acetil-CoA?

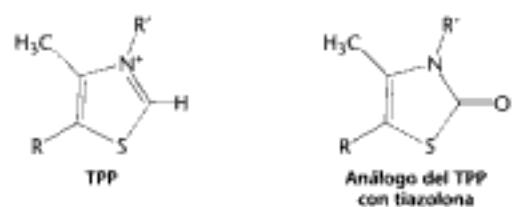
- (b) Escribir la ecuación de balance global para la síntesis neta.

- (c) Las células de los mamíferos, ¿contienen los enzimas necesarios?

3. *Fuerza conductora.* ¿Cuál es el ΔG° para la completa oxidación del fragmento acetilo del acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico?

4. *Actuando catalíticamente.* En sí mismo el ciclo del ácido cítrico, aunque constituido por varias etapas enzimáticas, puede ser básicamente considerado como el producto de un enzima supramolecular. Razonar una explicación.

5. *Un potente inhibidor.* El pirofosfato de tiamina con tiazolona se une a la piruvato deshidrogenasa con una fuerza 20.000 veces mayor que la tiamina pirofosfato e inhibe competitivamente el enzima. ¿Por qué?



6. *Acidosis láctica.* Los pacientes en estado de shock presentan con frecuencia acidosis láctica debido a la falta de O_2 . ¿Por qué la falta de O_2 ocasiona la acumulación de ácido láctico? Uno de los tratamientos para el estado de shock consiste en la administración de dicloroacetato, que inhibe a la quinasa asociada con el complejo piruvato deshidrogenasa. ¿Cuál es la justificación bioquímica de este tratamiento?

7. *Reacciones acopladas.* La oxidación del malato por el NAD^+ para formar oxalacetato es una reacción muy endergónica en condiciones normales [$\Delta G^\circ = +29 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($+7 \text{ kcal mol}^{-1}$)]. En condiciones fisiológicas la reacción transcurre fácilmente.

- (a) ¿Por qué?

- (b) Suponiendo que la relación $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ es de 8 a pH 7, ¿cuál sería la relación mínima [malato]/[oxalacetato] que permitiría formar oxalacetato a partir de malato?

8. *Síntesis de α -cetoglutarato.* Utilizando las reacciones y enzimas estudiados en este capítulo es posible convertir el piruvato en α -cetoglutarato sin agotar ninguno de los componentes del ciclo del ácido cítrico. Escribir el esquema de la ecuación de balance para esta conversión, mostrando los cofactores e identificando los enzimas necesarios.

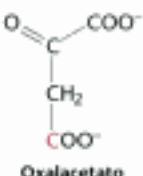
Problema de integración del capítulo

9. *¿Conversión de las grasas en glucosa?* Normalmente las grasas se metabolizan hasta acetil-CoA y posteriormente se procesan en el ciclo del ácido cítrico. En el Capítulo 16, vimos cómo la glucosa puede ser sintetizada a partir del oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. ¿Por qué motivo tras un ejercicio intenso que agota las reservas de carbohidratos, debemos regenerarlas comiendo carbohidratos? ¿Por qué no las regeneramos simplemente convirtiendo las grasas en carbohidratos?

Problemas de mecanismos

10. *Tema y variación.* Proponer un mecanismo de reacción para la condensación de acetil-CoA y glicoxilato en el ciclo del glicoxilato que se da en las plantas y bacterias

11. *Problemas de simetría.* En los experimentos realizados en 1941 para investigar el ciclo del ácido cítrico, a un preparado activo de mitocondrias se le añadía oxalacetato marcado con ^{14}C en el átomo de carbono del grupo carboxilo más alejado del grupo ceto.



El análisis del α -cetoglutarato formado mostró que no se perdía el marcaje radiactivo. Por descarboxilación del α -cetoglutarato se obtenía succinato no radiactivo. Todo el ^{14}C se desprendía como CO_2 . ¿Por qué se sorprendieron los primeros investigadores del ciclo del ácido cítrico al encontrar que todo el ^{14}C se desprendía en forma de CO_2 ?

12. *Moléculas simétricas que reaccionan de modo asimétrico.* La interpretación de los experimentos descritos en el problema 11 fue que el citrato (o cualquier otro compuesto simétrico) no podía ser un intermediario en la formación de α -cetoglutarato, dado el comportamiento asimétrico del marcaje radiactivo. Esta explicación se consideró razonable hasta que en 1948 Alexander Ogston propuso que "es posible que un enzima asimétrico ataque a un compuesto simétrico diferenciando entre sus grupos idénticos". Para simplificar, considérese una molécula en la cual a un carbono tetraédrico, tal como en el modelo del citrato, están unidos dos átomos de hidrógeno, un grupo X y un grupo Y distintos. Explicar cómo una molécula simétrica puede reaccionar asimétricamente con un enzima.

Problemas de interpretación de datos

13. *Un poco hace mucho.* Tal como se verá en el Capítulo 18, la actividad del ciclo del ácido cítrico se puede monitorizar midiendo la cantidad de O_2 consumido. A mayor consumo de O_2 mayor es la velocidad del ciclo. Para investigar el ciclo Hans Krebs, en 1937, utilizó el siguiente experimento. El sistema experimental que utilizó fue

un triturado de músculo pectoral de pichón, que es rico en mitocondrias. En una serie de experimentos, Krebs midió el consumo de O_2 en presencia sólo de carbohidratos y en presencia de carbohidratos más citrato. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Efecto del citrato sobre el consumo de oxígeno en el triturado de músculo pectoral de pichón

Tiempo (min)	Micromoles de oxígeno consumido	
	Sólo carbohidratos	Carbohidratos más 3 μmoles de citrato
10	26	28
60	43	62
90	46	77
150	49	85

(a) ¿Cuánto más oxígeno se consumiría si el citrato añadido se oxidase completamente hasta H_2O y CO_2 ?

(b) Tomando como referencia la respuesta dada en el apartado a, ¿qué sugieren los datos mostrados en la tabla?

14. *Envenenamiento por arsénico.* Posteriormente se estudió el efecto del arsenito en el sistema experimental del problema 13. Los datos experimentales (no mostrados) indicaban que en ausencia de arsenito la cantidad de citrato presente no variaba en el transcurso del experimento. Sin embargo, al añadir arsenito, los resultados obtenidos eran diferentes, tal como se muestran en la tabla siguiente.

Desaparición del ácido cítrico en el músculo pectoral de pichón en presencia de arsenito

Micromoles de citrato añadido	Micromoles de citrato encontrados después de 40 minutos	Micromoles de citrato utilizados
22	00,6	21
44	20,0	24
90	56,0	34

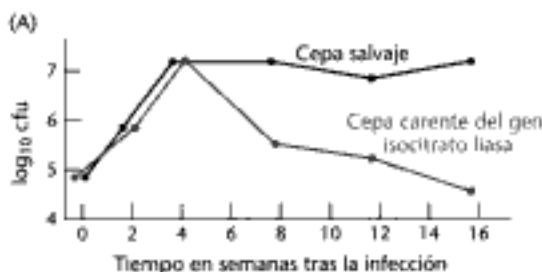
(a) ¿Cuál es el efecto del arsenito sobre la desaparición del citrato?

(b) ¿Cómo varía el efecto del arsenito al añadir más citrato?

(c) ¿Qué sugieren los datos mostrados sobre el sitio de actuación del arsenito?

15. *Isocitrato liasa y tuberculosis.* La bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, agente de la tuberculosis, puede invadir los pulmones y permanecer en un estado latente durante años. Durante este periodo, la bacteria reside en los granulomas, nódulos formados por la bacteria y restos celulares del anfitrión envueltos por células inmunitarias. Los granulomas son entornos ricos en lípidos y pobres en oxígeno. Se desconoce como estas bacterias logran persistir en esas condiciones. Resultados recientes sugieren que para su persistencia es necesario el ciclo del glicoxilato. Los siguientes resultados muestran la cantidad de bacterias [expresada como unidades formadoras de colonias (cfu)] presentes en los pulmones de ratones en función de las semanas posteriores a la infección.

En el gráfico A, los círculos negros representan los resultados para una cepa bacteriana salvaje y los círculos rojos los resultados para una cepa bacteriana en la que se ha eliminado el gen de la isocitrato liasa.



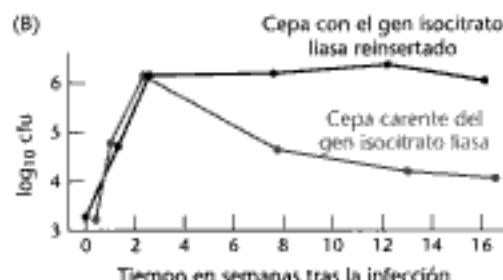
(a) ¿Cuál es el efecto de la carencia de isocitrato liasa?

Utilizando las técnicas estudiadas en el Capítulo 6 se reinsertó el gen que codifica la isocitrato liasa en las bacterias a las cuales previamente se les había eliminado dicho gen.

En el gráfico B, los círculos negros representan las bacterias en las que se ha reinsertado el gen y los círculos rojos a las que todavía carecen de él.

- (b) ¿Respaldan estos resultados a los obtenidos en el apartado a?
 (c) ¿Cuál es la finalidad del experimento del apartado b?

d) ¿Por qué mueren estas bacterias en ausencia del ciclo del glicoxilato?

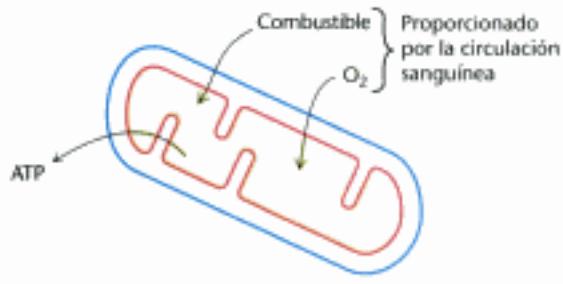
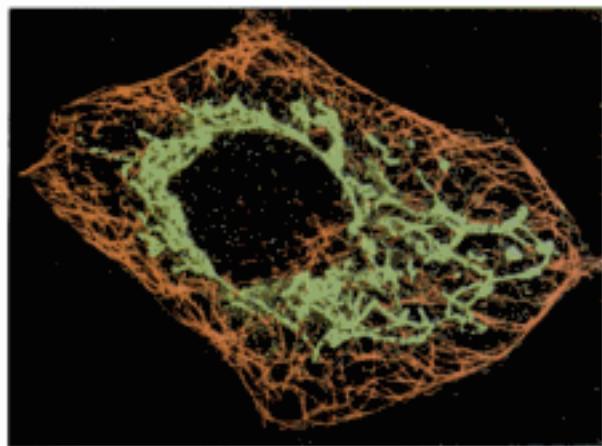


[Tomado de McKinney et al., 2000. *Nature* 406:735-738.]



¿NECESITA MÁS AYUDA? Adquiera en
www.whfreeman.com/stryer los capítulos del Libro del Alumno (Student Companion) con las soluciones completas.

Fosforilación oxidativa



Las mitocondrias, teñidas de verde, forman un entramado en el interior de un fibroblasto (izquierda). Las mitocondrias oxidan combustibles carbonados para generar energía celular en forma de ATP. [(Izquierda) Cortesía de Michael P. Yaffe, Dpto. de Biología, Universidad de California, San Diego.]

Contenido

- 18.1 La fosforilación oxidativa en eucariotas tiene lugar en las mitocondrias
- 18.2 La fosforilación oxidativa depende del transporte electrónico
- 18.3 La cadena respiratoria está formada por cuatro complejos: tres bombas de protones y una conexión física con el ciclo del ácido cítrico
- 18.4 Un gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP
- 18.5 Muchas lanzaderas permiten el movimiento a través de las membranas mitocondriales
- 18.6 La regulación de la respiración celular está gobernada en primera instancia por la necesidad de ATP

La cantidad de ATP que los seres humanos necesitan para afrontar su vida es asombrosa. Un hombre sedentario de 70 kg (154 lbs) requiere aproximadamente 8400 kJ (2000 kcal) para su actividad diaria. Para disponer de toda esta energía necesita 83 kg de ATP. Sin embargo, los seres humanos tienen sólo alrededor de 250 g de ATP. La disparidad entre la cantidad de ATP que tenemos y la que necesitamos se resuelve con el reciclaje del ADP a ATP. Cada molécula de ATP se recicla aproximadamente 300 veces por día. Este proceso tiene lugar principalmente por medio de la **fosforilación oxidativa**. *La fosforilación oxidativa es el proceso en el cual se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o FADH₂ hasta el O₂ por medio de una serie de transportadores electrónicos.* Este proceso, que tiene lugar en la mitocondria, es la principal fuente de ATP en organismos aeróbicos. Por ejemplo, la fosforilación oxidativa genera 26 de las 30 moléculas de ATP que se forman cuando la glucosa se oxida completamente a CO₂ y H₂O.

La fosforilación oxidativa acopla la oxidación de combustibles de carbono a la síntesis de ATP con un gradiente de protones

El NADH y FADH₂ formados durante la glicolisis, la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico son moléculas ricas en energía porque ambas contienen un par de electrones con un elevado potencial de transferencia. Cuando se utilizan estos electrones para reducir el oxígeno molecular a agua se libera una gran cantidad de energía libre que puede utilizarse para producir ATP.

La fosforilación oxidativa es sencilla desde el punto de vista conceptual y compleja desde el punto de vista de su mecanismo. De hecho, uno de los desafíos más estimulantes de la bioquímica ha sido desentrañar el mecanismo de la fosforilación oxidativa. El flujo de electrones desde el NADH o el FADH₂ hacia el O₂ a través de

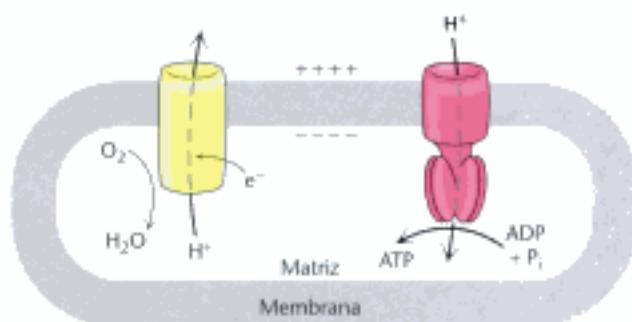


Figura 18.1 Fundamento de la fosforilación oxidativa. La oxidación y la síntesis de ATP se acoplan mediante flujos de protones a través de la membrana.

complejos proteicos localizados en la membrana interna mitocondrial da lugar al bombeo de protones hacia el exterior de la matriz de la mitocondria. La distribución desigual de protones que se produce genera un gradiente de pH y un potencial eléctrico transmembrana que da lugar a una fuerza protón-motriz. El ATP se sintetiza cuando los protones vuelven a la matriz mitocondrial a través de un complejo enzimático. Así pues, *la oxidación de los combustibles y la fosforilación de ADP están acoplados por un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial* (Figura 18.1).

La fosforilación oxidativa es la culminación de una serie de transformaciones energéticas que se conocen como *respiración celular*, o simplemente *respiración*, en su totalidad. Los combustibles de carbono se oxidan primeramente en el ciclo del ácido cítrico para producir electrones con un potencial de transferencia alto. En la fosforilación oxidativa, esta fuerza electrón-motriz se convierte en fuerza protón-motriz y posteriormente en potencial de transferencia de fosforilo. La conversión de la fuerza electrón-motriz en protón-motriz se lleva a cabo por medio de una *cadena respiratoria* consistente en tres bombas de protones impulsadas por electrones: NADH-Q oxidoreductasa, Q-citocromo *c* oxidoreductasa, y citocromo *c* oxidasa. Estos grandes complejos transmembrana contienen múltiples centros de oxidación-reducción, incluyendo quinonas, flavinas, complejos hierro-azufre, hemos e iones cobre. La fase final de la fosforilación oxidativa se lleva a cabo por medio de la *ATP sintasa*, un ensamblaje que sintetiza ATP y que está impulsado por la vuelta del flujo de protones a la matriz mitocondrial. Los componentes de este enzima admirable giran como parte de su mecanismo catalítico. La fosforilación oxidativa demuestra gráficamente que *los gradientes de protones son una divisa interconvertible de energía libre en los sistemas biológicos*.

Respiración

Proceso generador de ATP en el que un compuesto inorgánico (como el oxígeno molecular) actúa como acceptor final de electrones. El dador electrónico puede ser o bien un compuesto orgánico o uno inorgánico.

18.1 La fosforilación oxidativa en eucariotas tiene lugar en las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos de forma oval, típicamente de unos 2 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro, aproximadamente el tamaño de una bacteria. Eugene Kennedy y Albert Lehninger descubrieron hace más de medio siglo que las mitocondrias contienen el ensamblaje respiratorio, los enzimas del ciclo del ácido cítrico y los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos.

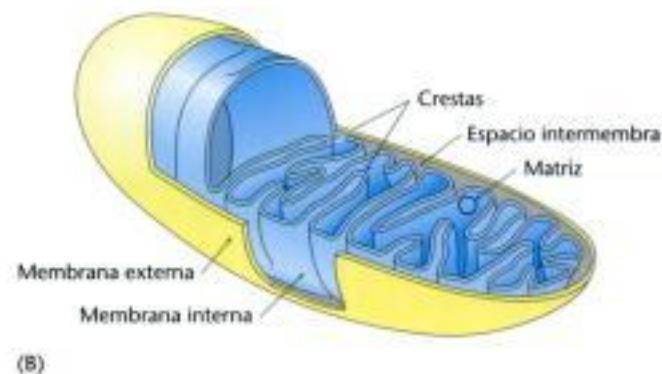
Las mitocondrias están delimitadas por una membrana doble

Los estudios de microscopía electrónica de George Palade y Fritjof Sjöstrand pusieron de manifiesto que las mitocondrias tienen dos sistemas de membrana: una *membrana externa* y una *membrana interna* amplia y muy plegada. La membrana interna se dispone en una serie de plegamientos llamados *crestas*. Por lo tanto, hay dos compartimientos en la mitocondria: (1) el *espacio intermembrana* entre las membranas



(A)

Figura 18.2 Micrografía electrónica (A) y diagrama (B) de una mitocondria. (A) Cortesía de George Palade. (B) Tomado de *Biology of the Cell* de Stephen L. Wolfe. © 1972 por Wadsworth Publishing Company Inc. Belmont California 94002. Adaptado con permiso del editor.



(B)

externa e interna y (2) la *matriz*, que está delimitada por la membrana interna (Figura 18.2). La matriz mitocondrial es donde tienen lugar la mayor parte de las reacciones del ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos. En contraste, la fosforilación oxidativa tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. El incremento en el área superficial de la membrana interna mitocondrial producido por las crestas crea más lugares para la fosforilación oxidativa que si la membrana fuera simple y sin plegar. Se estima que en los humanos existen unos 14 000 m² de membrana mitocondrial interna, que es el equivalente a tres campos de fútbol americano.

La membrana externa es bastante permeable frente a un gran número de iones y moléculas pequeñas ya que contiene muchas copias de la *porina mitocondrial*, una proteína de 30–35 kd, que forma poros y que también es conocida como VDAC, conducto aniónico dependiente del voltaje. VDAC interviene en el flujo regulado de metabolitos (generalmente aniones como el fosfato, cloruro, aniones orgánicos y nucleótidos de adenina) a través de la membrana externa. Por el contrario, la membrana interna es intrínsecamente impermeable a casi todos los iones y moléculas polares. Una amplia familia de transportadores traslada metabolitos como el ATP, piruvato y citrato a través de la membrana mitocondrial interna. Al hacer referencia a las dos caras de esta membrana utilizaremos los términos *cara de la matriz* y *cara citoplasmática* (ya que esta última es totalmente accesible a la mayor parte de las moléculas pequeñas del citoplasma). También reciben el nombre de caras *N* y *P*, respectivamente, porque el potencial de membrana es negativo en el lado de la matriz y positivo en el lado del citoplasma.

En procariotas, las bombas de protones activadas por electrones y el complejo sintetizador de ATP están localizados en la membrana plasmática, la más interna de las dos membranas. La membrana externa de las bacterias, como la de las mitocondrias, es permeable a la mayor parte de los metabolitos pequeños debido a la presencia de porinas.

Las mitocondrias son el resultado de un proceso endosimbiótico

Las mitocondrias son órganulos semiautónomos que mantienen una relación endosimbiótica con la célula hospedadora. Estos órganulos tienen su propio DNA, que codifica una serie de proteínas distintas y RNAs. El DNA mitocondrial se suele representar como circular, pero investigaciones recientes sugieren que el DNA mitocondrial de muchos organismos puede ser lineal. El tamaño del genoma mitocondrial varía mucho según las especies. El genoma mitocondrial del protista *Plasmodium falciparum* tiene menos de 6000 pares de bases, mientras que los de algunas plantas terrestres comprenden más de 200 000 (Figura 18.3). El DNA mitocondrial humano tiene

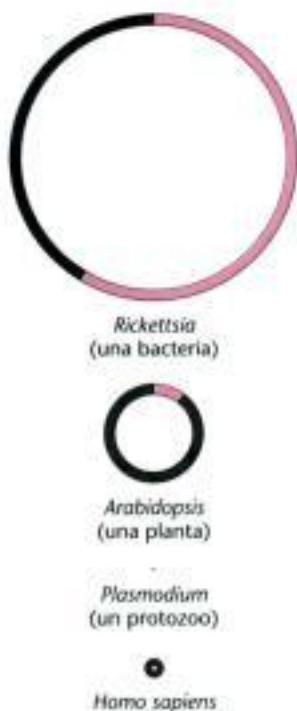


Figura 18.3 Tamaños de genomas mitocondriales. Los tamaños de tres genomas mitocondriales comparados con el genoma de *Rickettsia*, un parente del supuesto antepasado de todas las mitocondrias. En los genomas de más de 60 kpb, la región del DNA que codifica genes con función conocida se muestra en rojo.

Un acontecimiento *endosimbiótico* pudo haber tenido lugar a partir del momento en que un organismo libre capaz de realizar la fosforilación oxidativa fue engullido por otra célula. La doble membrana, el DNA circular (con algunas excepciones) y las maquinarias de transcripción y traducción específicas de las mitocondrias apuntan en este sentido. Gracias a la rápida acumulación de datos sobre las secuencias de genomas mitocondriales y bacterianos podemos hoy especular con cierta autoridad sobre el origen de la mitocondria "primigenia". El genoma bacteriano que más se parece al de las mitocondrias es el de *Rickettsia prowazekii*, el causante del tifus provocado por piojos. El genoma de este organismo tiene un tamaño de más de 1 millón de pares de bases y contiene 834 genes que codifican proteínas. Los estudios sobre su secuencia sugieren que todas las mitocondrias existentes derivan de un antepasado de *R. prowazekii* y son el resultado de un único acontecimiento endosimbiótico.

La evidencia de que las mitocondrias actuales son el resultado de un único acontecimiento proviene del estudio del genoma mitocondrial más parecido al de las bacterias, el del protozoo *Reclinomonas americana*. Su genoma contiene 97 genes, de los cuales 62 son específicos de proteínas. Los genes que codifican estas proteínas incluyen todos los genes codificadores de proteínas encontrados en todos los genomas mitocondriales secuenciados (Figura 18.4). Adn así, este genoma representa menos del 2% de los genes que codifican proteínas de la bacteria *E. coli*. Es muy poco probable que los genomas mitocondriales resultantes de varios acontecimientos endosimbióticos pudieran haberse reducido de forma independiente al mismo conjunto de genes presente en *R. americana*.

Hay que tener en cuenta que en el mundo microbiano no es nada raro que una célula grande engulla de forma transitoria células procariotas. En lo que respecta a las mitocondrias, esta relación transitoria se convirtió en permanente cuando la célula bacteriana perdió su DNA y su capacidad para vivir de forma independiente, y la célula hospedadora pasó a depender del ATP generado por su inquilino.

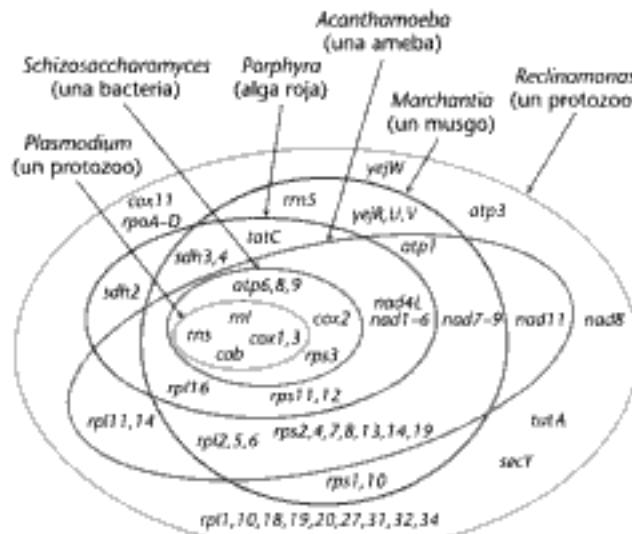


Figura 18.4 Solapamiento de dotaciones génicas de mitocondrias. Los genes presentes en cada óvalo son aquellos que se encuentran en el organismo representado por el óvalo. Sólo se muestran genes que codifican proteínas y rRNAs. El genoma de *Reclinomonas* contiene todos los genes que codifican proteínas encontrados en todos los genomas mitocondriales secuenciados. [Tomado de M. W. Gray, G. Burger y B. E. Lang. *Science* 283 (1999):1476-1481.]

18.2 La fosforilación oxidativa depende de la transferencia de electrones

En el Capítulo 17 se establece que la función principal del ciclo del ácido cítrico es la generación de NADH y FADH₂ mediante la oxidación de acetil-CoA. En la fosforilación oxidativa se utiliza el NADH y el FADH₂ para reducir el oxígeno molecular a agua. La reducción del oxígeno molecular por NADH y FADH₂ es un proceso muy exergónico que tiene lugar a través de una serie de reacciones de transferencia de electrones entre un conjunto de proteínas de membrana y recibe el nombre de *cadena transportadora de electrones*.

El potencial de transferencia electrónica de un electrón se mide como potencial redox

En la fosforilación oxidativa, el *potencial de transferencia de electrones* del NADH o del FADH₂ se convierte en el *potencial de transferencia de grupos fosforilo* del ATP. Es necesario expresar estas formas de energía libre de forma cuantitativa. La medida del potencial de transferencia de fosforilos ya nos resulta familiar: corresponde al ΔG° de la hidrólisis del compuesto fosforilado activado. La expresión análoga para el potencial de transferencia de electrones es E_0' , el *potencial de reducción* (también llamado *potencial redox* o *potencial de óxido-reducción*).

El potencial de reducción es un concepto electroquímico. Consideremos una sustancia que pueda estar en forma oxidada X o en forma reducida X⁻. Se trata de un *par redox*. El potencial de reducción de este par se puede determinar midiendo la fuerza electrón-motriz generada por una *semipila problema* conectada a una *semipila estándar de referencia* (Figura 18.5). La semipila problema está formada por un electrodo sumergido en una disolución 1 M de oxidante (X) y 1 M de reductor (X⁻). La semipila estándar de referencia consta de un electrodo sumergido en una disolución 1 M de H⁺ en equilibrio con gas H₂ a 1 atm. Los electrodos están conectados a un voltímetro y la continuidad eléctrica entre las dos semipilas se establece mediante un puente de agar-agar. Los electrones pueden desplazarse de una semipila a la otra. Si la reacción transcurre en la dirección



las reacciones en cada semipila (también llamadas *semirreacciones* o *pares*) deben ser



Así pues, los electrones se desplazan de la semipila problema a la semipila estándar de referencia, y el electrodo de la semipila problema se considera negativo con respecto al electrodo de la semipila estándar. *El potencial de reducción del par X:X⁻ corresponde al voltaje medido al comienzo del experimento* (cuando las concentraciones de X, X⁻ y H⁺ son 1 M). *El potencial de reducción del par H⁺:H₂ es de cero voltios, por definición.*

El significado del potencial de reducción resulta ahora evidente. Un potencial de reducción negativo indica que la forma reducida de una sustancia tiene menos afinidad hacia los electrones que el H₂, como en el ejemplo anterior. Un potencial de reducción positivo indica que la forma reducida de una sustancia tiene más afinidad hacia los electrones que el H₂. Estas comparaciones hacen referencia a condiciones estándar, es decir, 1 M de oxidante, 1 M de reductor, 1 M de H⁺ y una atmósfera de H₂. Por tanto, *un agente fuertemente reductor (como el NADH) está obligado a ceder electrones y tiene un potencial de reducción negativo, mientras que un agente fuertemente oxidante (como el O₂) está dispuesto a aceptar electrones y tiene un potencial de reducción positivo*.

Se conocen los potenciales de reducción de muchos pares redox biológicamente importantes (Tabla 18.1). La tabla 18.1 es parecida a las que se pueden ver en los



Figura 18.5 Medida del potencial redox. Dispositivo para medir el potencial de óxido-reducción estándar de un par redox. Los electrones y no X o X⁻ pueden desplazarse a través del puente de agar-agar.

TABLA 18.1 Potenciales de reducción estándar de algunas reacciones

Oxidante	Reductor	n	E'_0 (V)
Succinato + CO ₂	α-Cetoglutarato	2	-0,67
Acetato	Acetaldehido	2	-0,60
Ferredoxina (oxidada)	Ferredoxina (reducida)	1	-0,43
2 H ⁺	H ₂	2	-0,42
NAD ⁺	NADH + H ⁺	2	-0,32
NADP ⁺	NADPH + H ⁺	2	-0,32
Lipoato (oxidado)	Lipoato (reducido)	2	-0,29
Glutatión (oxidado)	Glutatión (reducido)	2	-0,23
FAD	FADH ₂	2	-0,22
Acetaldehido	Etilanol	2	-0,20
Piruvato	Lactato	2	-0,19
Fumarato	Succinato	2	+0,03
Citocromo b (+3)	Citocromo b (+2)	1	+0,07
Deshidroascorbato	Ascorbato	2	+0,08
Ubiquinona (oxidada)	Ubiquinona (reducida)	2	+0,10
Citocromo c (+3)	Citocromo c (+2)	1	+0,22
Fe (+3)	Fe (+2)	1	+0,77
$\frac{1}{2} O_2 + 2 H^+$	H ₂ O	2	+0,82

Nota: E'_0 es el potencial estándar de oxidación-reducción (pH 7; 25 °C) y n es el número de electrones transferidos. E'_0 se refiere a la reacción parcial escrita como:



textos de química, y sólo se diferencia por el hecho de que las condiciones estándar adoptadas por los bioquímicos establecen que la concentración de iones hidrógeno es 10⁻⁷ M (pH 7) en vez de 1 M (pH 0). Esta diferencia se indica mediante el acento (prima) de E'_0 . Recordemos que la prima en $\Delta G^{\circ\prime}$ hace referencia al incremento de energía libre estándar a pH 7.

El incremento de energía libre estándar $\Delta G^{\circ\prime}$ está relacionado con el incremento del potencial de reducción $\Delta E'_0$ mediante la expresión

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E'_0$$

donde n es el número de electrones transferidos, F es una constante de proporcionalidad llamada *constante de Faraday* [96,48 kJ mol⁻¹ V⁻¹ (23,06 kcal mol⁻¹ V⁻¹)], $\Delta E'_0$ se expresa en voltios y $\Delta G^{\circ\prime}$ en kilojulios o kilocalorías por mol.

A partir de los potenciales de reducción de los reactivos se puede calcular de forma inmediata el incremento de energía libre en una reacción de oxidación-reducción. Por ejemplo, consideremos la reducción del piruvato por el NADH catalizada por la lactato deshidrogenasa.



El potencial de reducción, o semirreacción, del par NAD⁺: NADH es de -0,32 V, mientras que el del par piruvato: lactato es de -0,19 V. Por convención, los potenciales de reducción (tal y como se reflejan en la Tabla 18.1) hacen referencia a las reacciones parciales expresadas como reducciones: oxidante + e⁻ → reductor. Por tanto,



Para obtener la reacción A a partir de las reacciones B y C debemos invertir el sentido de la reacción C, de manera que el NADH figure a la izquierda de la flecha. Al hacer esto, el signo de E'_0 debe cambiarse.



En la reacción B, la energía libre se calcula teniendo en cuenta que $n = 2$.

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -2 \times 96,48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times -0,19 \text{ V} \\ &= +36,7 \text{ kJ mol}^{-1} (+8,8 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Análogamente, para la reacción D,

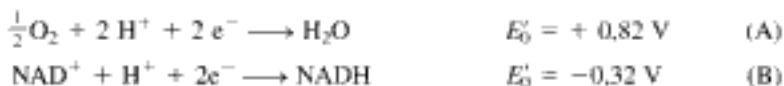
$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -2 \times 96,48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times +0,32 \text{ V} \\ &= -61,8 \text{ kJ mol}^{-1} (-14,8 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Por tanto, la energía libre de la reacción A viene dada por

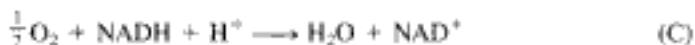
$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= \Delta G^{\circ'} (\text{en la reacción B}) + \Delta G^{\circ'} (\text{en la reacción D}) \\ &= +36,7 \text{ kJ mol}^{-1} + (-61,8 \text{ kJ mol}^{-1}) \\ &= -25,1 \text{ kJ mol}^{-1} (-6,0 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Una diferencia de potencial de 1,14 voltios entre el NADH y el oxígeno molecular impulsa el transporte de electrones a través de la cadena y permite la formación de un gradiente de protones

La fuerza impulsora de la fosforilación oxidativa es el potencial de transferencia de electrones del NADH o del FADH₂ en comparación con el del O₂. ¿Cuánta energía se libera durante la reducción del O₂ por el NADH? Hagamos el cálculo de ΔG°' para esta reacción. Las semirreacciones correspondientes son



Si restamos la reacción B de la reacción A tenemos que



La energía libre estándar de esta reacción será

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -2 \times 96,48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times +0,82 \text{ V} - \\ &\quad (-2 \times 96,48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times -0,32 \text{ V}) \\ &= -158,2 \text{ kJ mol}^{-1} - 61,9 \text{ kJ mol}^{-1} \\ &= -220,1 \text{ kJ mol}^{-1} (-52,6 \text{ kcal mol}^{-1})\end{aligned}$$

Se desprende una considerable cantidad de energía libre. Recordemos que la ΔG°' para la hidrólisis del ATP es -30,5 kJ mol⁻¹ (-7,3 kcal mol⁻¹). La energía liberada se utiliza en primera instancia para generar un gradiente de protones que será utilizado tanto para la síntesis de ATP como para el transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial.

¿Cómo se puede cuantificar la energía asociada a un gradiente de protones? Recordemos que el incremento de energía libre asociado al movimiento de una sustancia de un lado de la membrana donde su concentración es c_1 al otro lado, donde su concentración es c_2 , viene dado por

$$\Delta G = RT \ln(c_2/c_1) + ZF\Delta V = 2,303 RT \log_{10}(c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

donde Z es la carga eléctrica de la sustancia transportada y ΔV es el potencial a través de la membrana, en voltios (p. 353). En las condiciones típicas de la membrana interna mitocondrial el pH externo es 1,4 unidades menor que el interno [lo que corresponde a un valor log₁₀(c_2/c_1) de 1,4] y el potencial de membrana es de 0,14 V.

positivo en el exterior. Como para los protones $Z = +1$, el incremento de energía libre es $(2,303 \times 8,32 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \times 310 \text{ K} \times 1,4) + (+1 \times 96,48 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1} \times 0,14 \text{ V}) = 21,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($5,2 \text{ kcal mol}^{-1}$). Por tanto, cada protón transportado desde la matriz al lado citoplasmático representa una energía libre de $21,8 \text{ kJ mol}^{-1}$.

18.3 La cadena respiratoria está formada por cuatro complejos: tres bombas de protones y una conexión física con el ciclo del ácido cítrico

Los electrones se transfieren del NADH al O_2 a través de una cadena de tres grandes complejos proteicos llamados *NADH-Q oxidoreductasa*, *Q-citocromo c oxidoreductasa* y *citocromo c oxidasa* (Figura 18.6 y Tabla 18.2). El flujo de electrones entre estos complejos transmembrana induce el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Un cuarto gran complejo proteico, llamado *succinato-Q reductasa*, contiene la succinato deshidrogenasa que genera FADH_2 en el ciclo del ácido cítrico. Los electrones del FADH_2 entran la cadena de transporte electrónico en el *Q-citocromo c oxidoreductasa*. La succinato-Q reductasa, en contraste con los otros complejos, no bombea protones. *NADH-Q oxidoreductasa*, succinato-Q reductasa, *Q-citocromo c oxidoreductasa* y *citocromo c oxidasa* también reciben el nombre de *Complejos I, II, III y IV*, respectivamente. Los complejos I, II y III parecen estar asociados en un complejo molecular conocido como *respirosoma*. Como se ha visto antes, tales complejos supramoleculares facilitan la transferencia rápida del sustrato y previenen la liberación de los intermediarios de las reacciones.

Los electrones se trasladan de un complejo hasta el siguiente mediante transportadores electrónicos especiales. Los electrones se transfieren desde la *NADH-Q oxidoreductasa* hacia la *Q-citocromo c oxidoreductasa*, el segundo complejo de la cadena, mediante la forma reducida de la coenzima *Q* (*Q*), también llamada *ubiquinona* porque es una *quinona ubicua*, en los sistemas biológicos. La ubiquinona es una quinona hidrofóbica que difunde con gran rapidez en el interior de la membrana mitocondrial interna. Una proteína pequeña y soluble, el *citocromo c*, traslada electrones desde la *Q-citocromo c oxidoreductasa* a la *citocromo c oxidasa*, el componente final de la cadena y el que cataliza la reducción del O_2 . Los electrones del FADH_2 ge-



Figura 18.6 Secuencia de transportadores electrónicos de la cadena respiratoria. Nótese que la afinidad de los componentes por los electrones aumenta conforme se va descendiendo por la cadena.

TABLA 18.2 Componentes de la cadena transportadora de electrones mitocondrial

Complejo enzimático	Masa (kd)	Subunidades	Grupo prostético	Lado de la matriz	OXIDANTE O REDUCTOR	Interior de la membrana	Lado citoplasmático
NADH-Q oxidoreductasa	>900	46	FMN Fe-S	NADH	Q		
Succinato-Q reductasa	140	4	FAD Fe-S	Succinato	Q		
Q-citocromo c oxidoreductasa	250	11	Hemo b_H Hemo b_L Hemo c_1 Fe-S		Q	Citocromo c	
Citocromo c oxidasa	160	13	Hemo a Hemo a_3 Cu_A y Cu_B			Citocromo c	

Tomado de J. W. DePierre y L. Ernster, *Annu. Rev. Biochem.* 46(1977):215; Y. Hatfield, *Annu. Rev. Biochem.* 54(1985):1015; y J. E. Walker, *Q. Rev. Biophys.* 25(1992):253.

nerados por la succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico se transfieren primero a la ubiquinona y posteriormente al complejo Q-citocromo oxidoreductasa.

El coenzima Q es un derivado de la quinona con una larga cola consistente en unidades isoprenoides de cinco carbonos. El número de unidades de isopreno en la cola depende de la especie. En mamíferos, la forma más común contiene 10 unidades de isopreno (coenzima Q₁₀). Para simplificar, omitiremos el subíndice de la abreviatura ya que todas las variedades funcionan de manera idéntica. Las quinonas pueden existir en tres estados de oxidación. En el estado totalmente oxidado (Q), el coenzima Q presenta dos grupos ceto (Figura 18.7). La adición de un protón y un electrón origina la forma semiquinona (QH⁻). La forma semiquinona puede perder un protón para dar lugar al radical aniónico de la semiquinona (Q^{·-}). La adición de un segundo protón y electrón da lugar al ubiquinol (QH₂), la forma totalmente reducida del coenzima Q, que retiene sus protones con más intensidad. Por tanto, *en las quinonas, las reacciones de transferencia de electrones están acopladas a la unión y liberación de protones*, una propiedad clave a la hora de transportar protones a través de la membrana. Debido a que la ubiquinona es soluble en la membrana, se cree que en la membrana interna mitocondrial existe una reserva de Q y QH₂; la reserva Q.

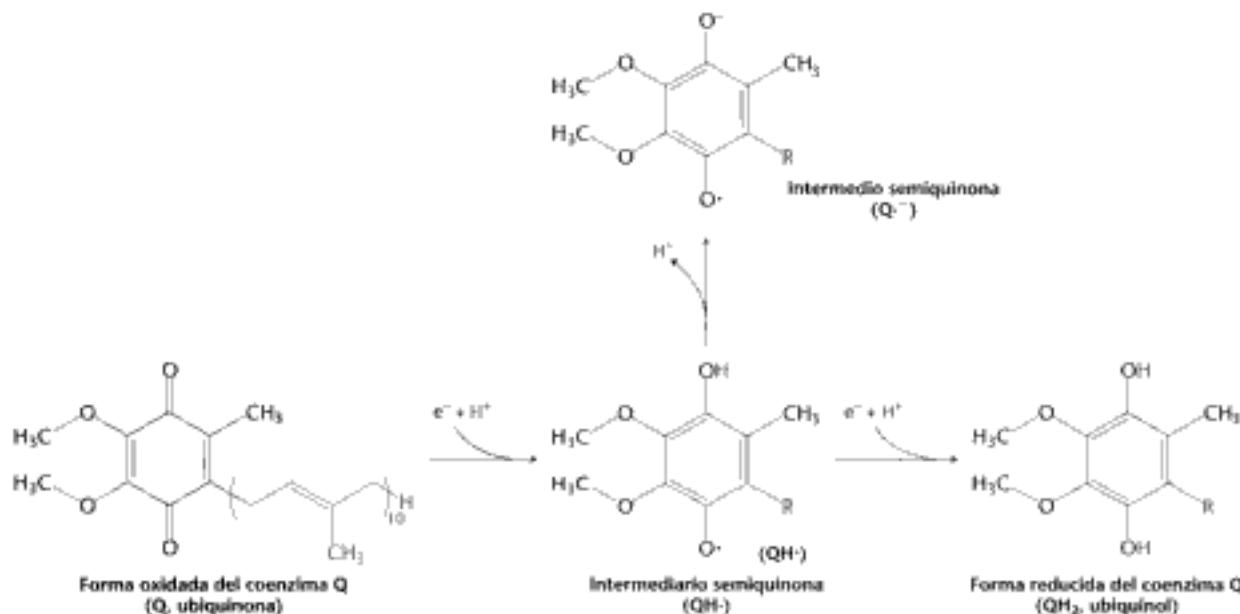


Figura 18.7 Estados de oxidación de las quinonas. La reducción de la ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH₂) se realiza a través de un intermediario semiquinona (QH⁻).

Los electrones de alto potencial del NADH entran en la cadena respiratoria por la NADH-Q oxidoreductasa

Los electrones del NADH entran en la cadena por la *NADH-Q oxidoreductasa* (también llamado *Complejo I* y *NADH deshidrogenasa*), un enzima enorme (>900 kd) formado por aproximadamente unas 46 cadenas polipeptídicas. Esta bomba de protones, como la de las otras dos de la cadena respiratoria, está codificada por genes que residen en la mitocondria y en el núcleo. La NADH-Q oxidoreductasa tiene forma de L, con un brazo horizontal anclado en la membrana y un brazo vertical que se proyecta hacia la matriz.

La reacción catalizada por este enzima parece ser



La etapa inicial consiste en la unión del NADH y la transferencia de sus dos electrones de alto potencial al *flavina mononucleótido* (FMN), que es el grupo prostético.

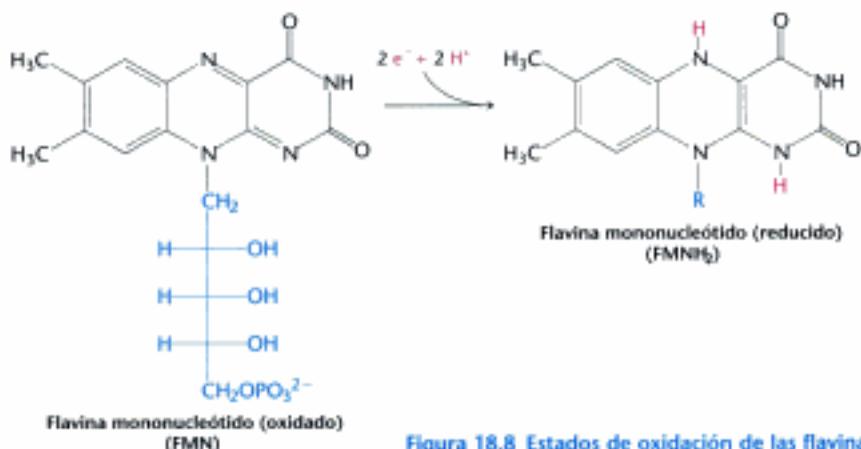


Figura 18.8 Estados de oxidación de las flavinas.

tico de este complejo, para dar lugar a la forma reducida FMNH₂ (Figura 18.8). El acceptor de electrones del FMN, el anillo de isoaloxazina, es idéntico al del FAD.

Los electrones se transfieren posteriormente desde el FMNH₂ a una serie de *complejos hierro–azufre*, el segundo tipo de grupo prostético de la NADH-Q oxidoreductasa. Los complejos Fe-S de las *proteínas hierro–azufre* (también llamadas *proteínas con hierro no hemo*) desempeñan un papel crítico en una amplia gama de reacciones de reducción en los sistemas biológicos. Se conocen varios tipos de complejos Fe-S (Figura 18.9). En el tipo más sencillo, un único ion de hierro está coordinado de forma tetraédrica a los grupos sulfhidrilo de cuatro residuos de cisteína de la proteína. Un segundo tipo, representado como 2Fe-2S, contiene dos iones de hierro, dos sulfuros inorgánicos y generalmente con cuatro residuos de cisteína. Un tercer tipo, denominado 4Fe-4S, contiene cuatro iones de hierro, cuatro sulfuros inorgánicos y cuatro residuos de cisteína. La NADH-Q oxidoreductasa contiene tanto complejos 2Fe-2S como 4Fe-4S. Los iones hierro de estos complejos Fe-S alternan entre los estados Fe²⁺ (reducido) y Fe³⁺ (oxidado). A diferencia de las quinonas y flavinas, los complejos hierro–azufre suelen participar en las reacciones de oxidación–reducción sin aceptar o liberar protones.

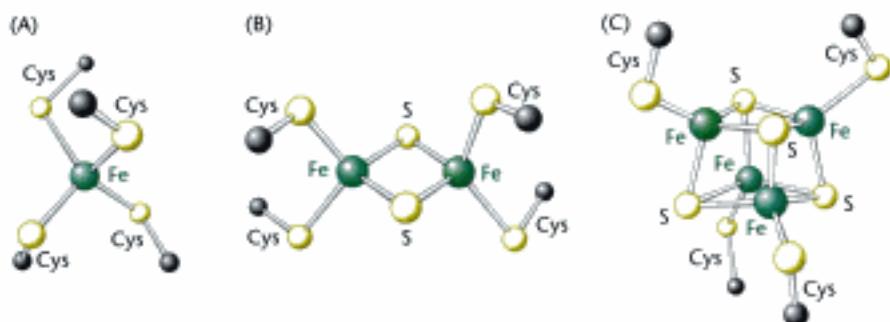
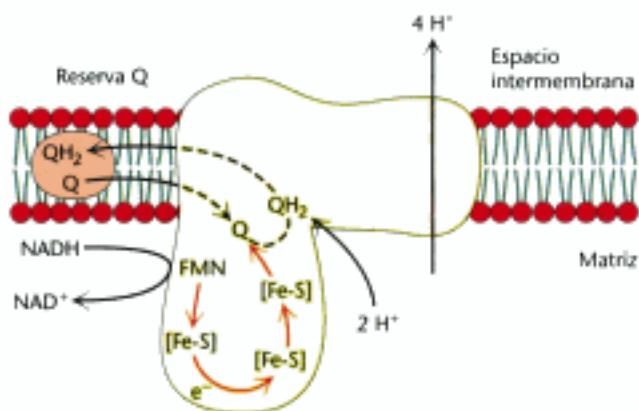


Figura 18.9 Complejos hierro–azufre. (A) Un único ion de hierro se une a cuatro residuos de cisteína. (B) Complejo 2Fe-2S con los iones hierro conectados mediante iones sulfuro. (C) Complejo 4Fe-4S. Cada uno de estos complejos puede llevar a cabo reacciones de oxidación–reducción.

Todas las reacciones redox tienen lugar en el fragmento extramembrana de la NADH-Q oxidoreductasa. Aunque los detalles de la transferencia electrónica a través de este complejo continúan siendo objeto de investigación, el NADH se une de forma clara a un lugar del dominio extramembrana. El NADH transfiere sus dos electrones al FMN. Estos electrones fluyen a través de una serie de centros hierro–azufre hasta el coenzima Q. *El flujo de dos electrones desde el NADH al coenzima Q a través de la NADH-Q oxidoreductasa produce el bombeo de cuatro iones hidrógeno*

Figura 18.10 Reacciones de transferencia acopladas electrón–protón a través de la NADH-Q oxidoreductasa. Los electrones fluyen en el Complejo I desde el NADH a través del FMN y una serie de complejos hierro–azufre hasta la ubiqüinona. El flujo electrónico produce el bombeo de cuatro protones y la toma de dos protones de la matriz mitocondrial. [Basado en U. Brandt et al. FEBS Letters 545 (2003) 9–17, Figura 2.]



hacia el exterior de la matriz de la mitocondria. Al aceptar dos electrones, Q capta dos protones de la matriz cuando se reduce a QH₂ (Figura 18.10). El QH₂ abandona el enzima por el interior hidrofóbico de la membrana.

El ubiqüinol es el punto de entrada para los electrones procedentes del FADH₂ de las flavoproteínas

Recordemos que el FADH₂ se genera en el ciclo del ácido cítrico, en la oxidación del succinato a fumarato por la succinato deshidrogenasa (p. 487). Este enzima forma parte del *complejo succinato-Q reductasa (Complejo II)*, una proteína integral de la membrana interna mitocondrial. El FADH₂ no abandona el complejo. En vez de ello, sus electrones se transfieren a complejos Fe-S y de allí a Q, donde se incorporan a la cadena transportadora de electrones. El complejo succinato-Q reductasa, a diferencia de la NADH-Q oxidoreductasa, no transporta protones. Consecuentemente, se forma menos ATP a partir de la oxidación del FADH₂ que a partir del NADH.

Otros dos enzimas que veremos más adelante, la *glicerol fosfato deshidrogenasa* (p. 528) y la *acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos* (p. 624), transfieren de forma similar sus electrones de alto potencial desde el FADH₂ a Q para formar ubiqüinol (QH₂), la forma reducida de la ubiqüinona. Estos enzimas oxidan respectivamente glicerol y grasas, suministrando electrones para la fosforilación oxidativa. Estos enzimas tampoco bombean protones.

Los electrones fluyen desde el ubiqüinol al citocromo c a través de la Q-citocromo c oxidoreductasa

La segunda de las tres bombas de la cadena respiratoria es la *Q-citocromo c oxidoreductasa* (también conocida como *Complejo III* y como *citocromo c oxidoreductasa*). La función de Q-citocromo c oxidoreductasa es catalizar la transferencia de electrones desde QH₂ al citocromo c oxidado (*cit c*), una proteína soluble en agua, al tiempo que bombea protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. El flujo de un par de electrones a través de este complejo produce el transporte neto efectivo de 2 H⁺ al lado citoplasmático, la mitad del rendimiento obtenido con la NADH-Q reductasa debido a una menor fuerza de empuje termodinámico.



Q-citocromo c oxidoreductasa contiene dos tipos de citocromos llamados *b* y *c* (Figura 18.11). Un citocromo es una proteína transportadora de electrones que contiene un grupo prostético hemo. Durante el transporte de electrones, el ion hierro de un citocromo alterna entre un estado reducido ferroso (+2) y un estado oxidado férrico (+3). Las dos subunidades de citocromo de Q-citocromo c oxidoreductasa contienen un total de tres hemos: dos hemos, denominados respectivamente hemo

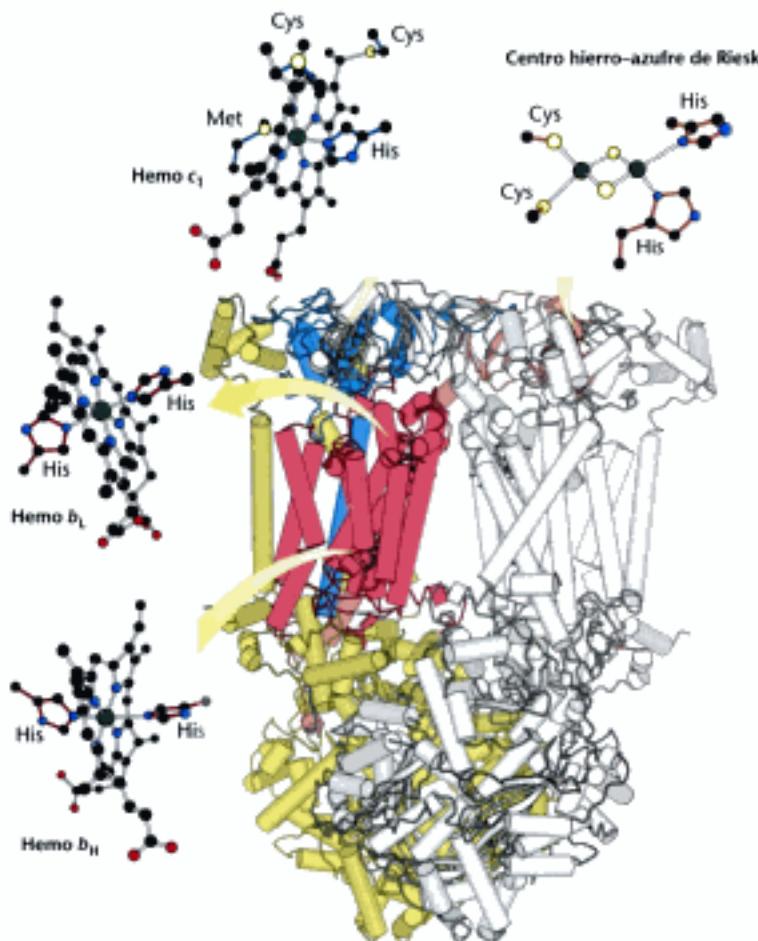


Figura 18.11 Estructura de Q-citocromo *c* oxidoreductasa [Citocromo *bc*₁].

Este enzima es un homodímero con 11 cadenas polipeptídicas distintas. Nótese que los grupos prostéticos principales, tres hemos y un complejo 2Fe-2S, están localizados o bien cerca del extremo citoplasmático del complejo contiguo al espacio intermembrana (arriba) o en la región insertada en la membrana (α -hélices representadas por cilindros verticales). Están bien posicionados para mediar en las reacciones de transferencia electrónica entre las quinonas en la membrana y el citocromo *c* en el espacio intermembrana. [Tomado de 1BCC.pdb.]

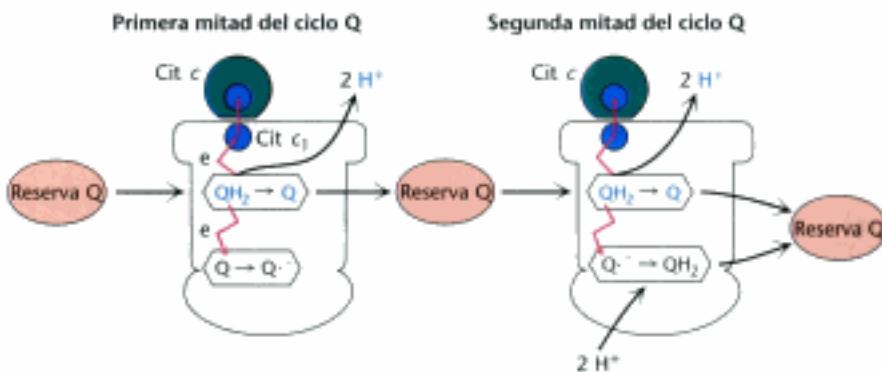
b_L (L indica baja afinidad) y hemo *b_H* (H indica alta afinidad), localizados en el citocromo *b* y un grupo hemo localizado en el citocromo *c₁*. El grupo prostético del hemo de los citocromos *b*, *c₁* y *c* es la ferro-protoporfirina IX, el mismo hemo presente en la mioglobina y en la hemoglobina (p. 184). Estos hemos idénticos tienen diferentes afinidades electrónicas porque están en diferentes entornos polipeptídicos. Por ejemplo, el hemo *b_L*, que está localizado cerca de la cara citoplasmática de la membrana, tiene menor afinidad por un electrón que el hemo *b_H* que está cerca del lado de la matriz. Este enzima se conoce también como citocromo *bc₁* debido a sus citocromos.

Además de los grupos hemo, el enzima también contiene una proteína hierro-azufre con un complejo 2Fe-2S. Este complejo, denominado el *centro de Rieske*, es atípico debido a que uno de los iones de hierro está coordinado con dos residuos de histidina en vez de estarlo con dos residuos de cisteína. Este tipo de coordinación estabiliza al complejo en su forma reducida aumentando su potencial de reducción por lo que puede aceptar fácilmente electrones del QH₂.

El ciclo Q canaliza los electrones desde un transportador de dos electrones a uno de un electrón y bombea protones

El mecanismo que acopla la transferencia de electrones desde Q hasta el citocromo *c* con el transporte de protones a través de la membrana se denomina *ciclo Q* (Figura 18.12). Dos moléculas de QH₂ se unen de forma consecutiva al complejo, cada una cediendo dos electrones y dos H⁺. *Estos protones se liberan en el lado citoplasmático de la membrana.* Los dos electrones viajan a través del complejo a diferentes destinos. Un electrón fluye primero al complejo 2Fe-2S del centro Rieske, des-

Figura 18.12 Ciclo Q. En la primera parte del ciclo dos electrones de una QH_2 unida se transfieren, uno al citocromo *c* y el otro a una *Q* unida en un segundo centro de unión para formar el radical aniónico semiquinona $\text{Q}^{\cdot-}$. La *Q* recién formada se disocia y entra la reserva *Q*. En la segunda mitad del ciclo, un segundo QH_2 también cede sus electrones, uno a una segunda molécula de citocromo *c* y el otro para reducir el $\text{Q}^{\cdot-}$ a QH_2 . Esta segunda transferencia electrónica produce la toma de dos protones de la matriz. La vía de transferencia electrónica se muestra en rojo.



pués al citocromo *c₁*, y finalmente a una molécula de citocromo *c* oxidado convirtiéndolo en su forma reducida. La molécula de citocromo *c* reducida puede difundir libremente y alejarse del enzima para continuar por la cadena respiratoria.

El segundo electrón atraviesa los dos grupos hemo del citocromo *b* hasta una ubiquinona oxidada unida a un segundo centro de unión. Esta molécula de quinona (*Q*) se reduce a un anión radical semiquinona ($\text{Q}^{\cdot-}$) por medio del electrón de la primera molécula de QH_2 .

Tras la unión del electrón de la segunda molécula de QH_2 , este anión radical quinona incorpora dos protones del lado de la matriz para formar QH_2 . *La captura de estos dos protones de la matriz contribuye a la formación del gradiente de protones.* En resumen, cuatro protones se liberan en el lado citoplasmático, y dos protones se capturan de la matriz mitocondrial.

En un ciclo *Q*, dos moléculas de QH_2 se oxidan para formar dos moléculas de *Q* y, posteriormente, una molécula de *Q* se reduce a QH_2 . ¿Por qué esta complejidad? El formidable problema que se resuelve aquí es canalizar de modo eficiente electrones desde un transportador de dos electrones (QH_2) a un transportador de un electrón (citocromo *c*). El citocromo *b* de la reductasa es en esencia un mecanismo de reciclado que permite que los dos electrones de QH_2 se usen de modo eficiente.

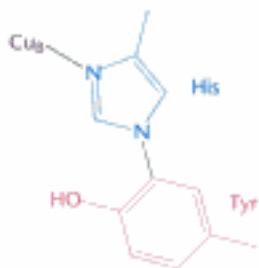
La citocromo *c* oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua

El último de los tres ensamblajes bombeadores de protones de la cadena transportadora de electrones es la *citocromo c oxidasa* (*Complejo IV*). La citocromo oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde la forma reducida del citocromo *c* al oxígeno molecular, el acceptor final.



La necesidad de oxígeno para esta reacción es lo que hace “aeróbicos” a los organismos aeróbicos. Obtener oxígeno para esta reacción es la razón por la que los seres humanos deben respirar. Cuatro electrones se dirigen al O_2 para reducirlo completamente a H_2O , y a la vez, los protones se bombean desde la matriz al lado citoplasmático de la membrana interna mitocondrial. Esta reacción es muy favorable termodinámicamente. A partir de los potenciales de reducción de la Tabla 18.1, el incremento de energía libre estándar para esta reacción es $\Delta G^\circ = -231.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-55.4 \text{ kcal mol}^{-1}$). La mayor cantidad posible de esta energía libre debe retenerse en forma de gradiente de protones para la posterior síntesis de ATP.

La citocromo *c* oxidasa bovina se conoce bastante bien a nivel estructural (Figura 18.13). Está formada por 13 subunidades, 3 de las cuales están codificadas por el propio genoma mitocondrial. La citocromo *c* oxidasa contiene dos grupos *hemo* de tipo A y tres *iones de cobre* distribuidos en dos centros de cobre, llamados A y B. Uno de los centros, Cu_A/Cu_B contiene dos iones de cobre conectados mediante dos residuos de histidina. Este centro es quien acepta en primera instancia los electrones del



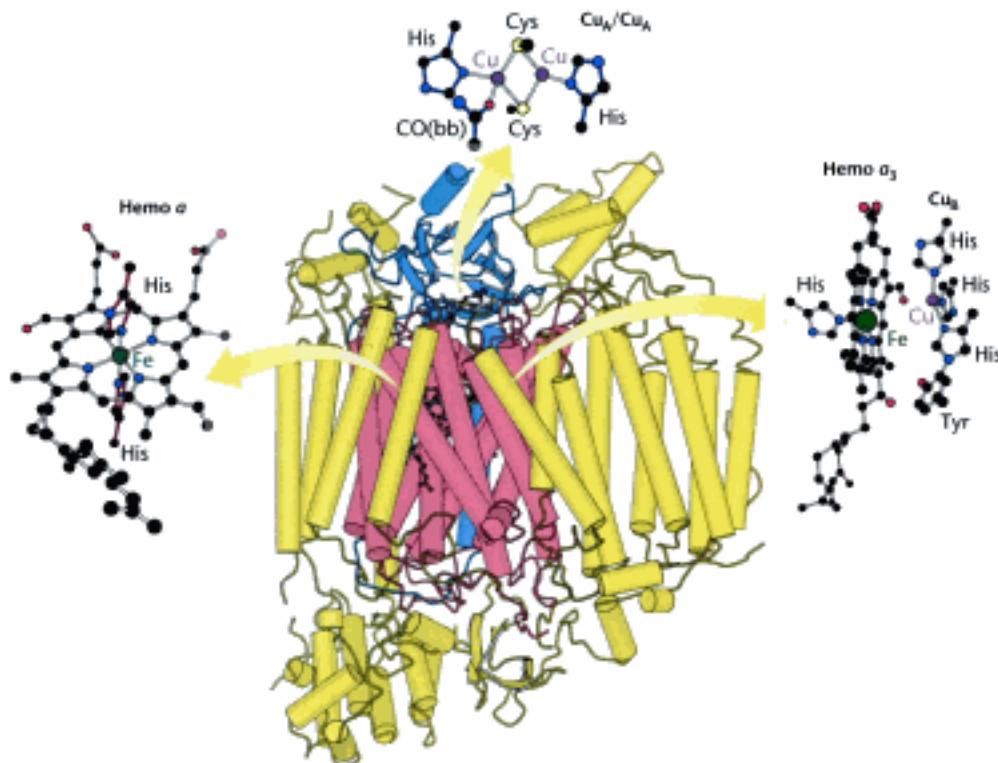
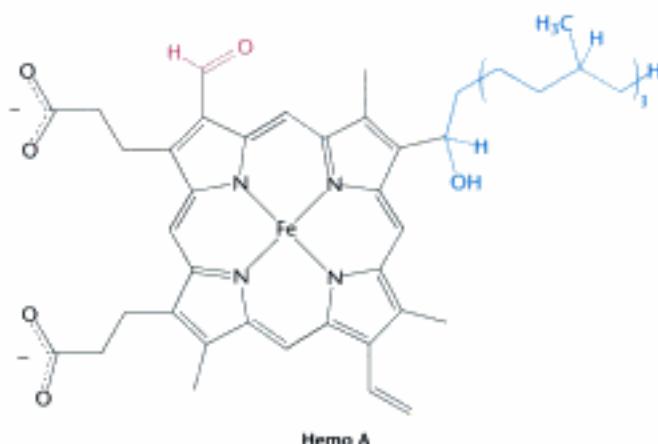


Figura 18.13 Estructura de la citocromo *c* oxidasa. El enzima consiste en 13 cadenas polipeptídicas. Nótese que la mayor parte del complejo, así como los dos grupos prostéticos principales (hemo *a* y hemo *a*₃-Cu_B) están insertados en la membrana (las α -hélices se representan como cilindros verticales). El hemo *a*₃-Cu_B es el centro de reducción del oxígeno a agua. El grupo prostético Cu_A/Cu_A está localizado cerca del espacio intermembrana para aceptar mejor los electrones del citocromo *c*. CO(bb) es un grupo carbonilo del esqueleto peptídico. [Tomado de 2OCC.pdb.]

citocromo *c* reducido. El otro centro de cobre, Cu_B, está coordinado con tres residuos de histidina, uno de los cuales está modificado por la formación de un enlace covalente con un residuo de tirosina. Los centros de cobre varían entre las formas Cu⁺ reducido (cuproso) y la Cu²⁺ oxidado (cúprico) según aceptan o donan electrones.

Hay dos moléculas hemo de tipo A, denominadas *hemo a* y *hemo a*₃ en la citocromo oxidasa. El grupo hemo de tipo A se diferencia de los grupos hemo de los citocromos *c* y *c*₁ en tres aspectos: (1) un grupo formilo reemplaza a un grupo metilo, (2) una cadena hidrocarbonada de C₁₇ sustituye a uno de los grupos vinilo, y (3) el hemo no está unido covalentemente a la proteína.



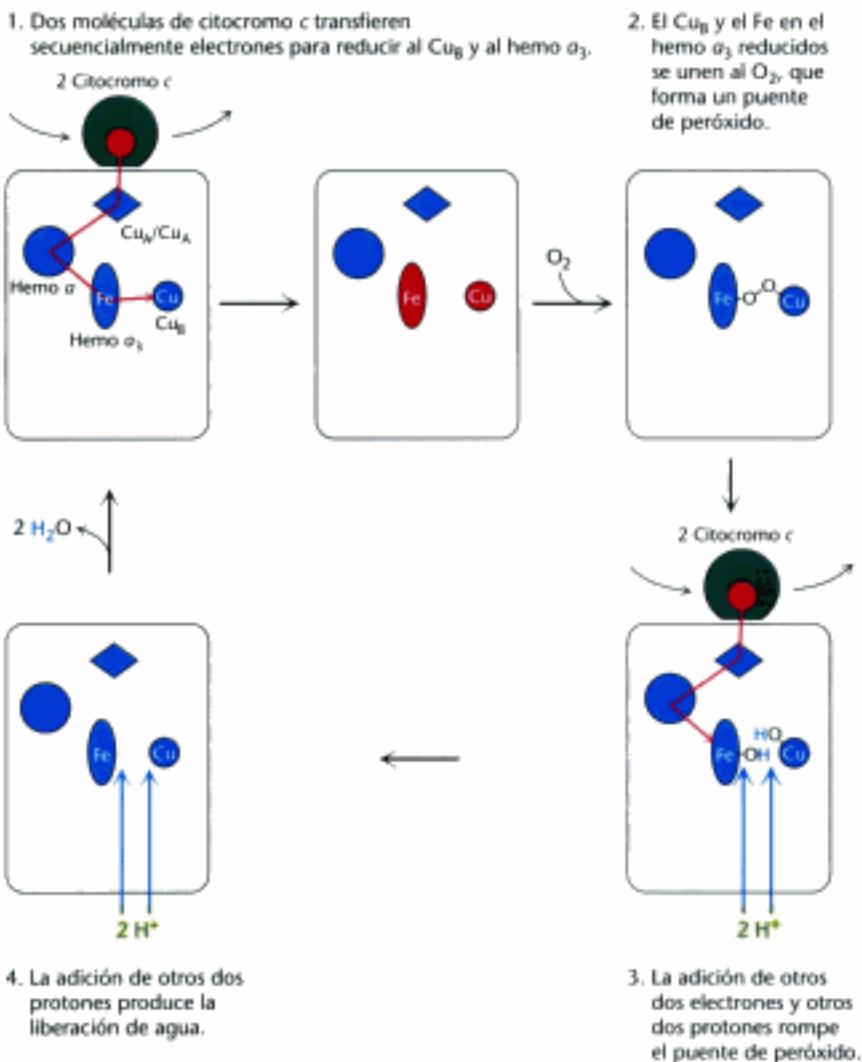


Figura 18.14 Mecanismo de la citocromo c oxidasa. El ciclo comienza y termina con todos los grupos prostéticos en su forma oxidada (mostrada en azul). Las formas reducidas se presentan en rojo. Cuatro moléculas de citocromo c donan cuatro electrones, que permitiendo la unión y ruptura de una molécula de O₂ hacen posible el importar cuatro H⁺ de la matriz para formar dos moléculas de H₂O, que son liberadas desde el enzima para regenerar el estado inicial.

El hemo *a* y el *a*₃ tienen distintos potenciales redox porque se encuentran localizados en distintos entornos dentro de la citocromo *c* oxidasa. Un electrón fluye desde el citocromo *c* al Cu_{A/Cu_A}, al hemo *a*, al hemo *a*₃, al Cu_B y finalmente al oxígeno. El hemo *a*₃ y el Cu_B están directamente adyacentes. En conjunto, el *hemo a*₃ y Cu_B forman el centro activo donde el O₂ se reduce a H₂O.

Cuatro moléculas de citocromo *c* se unen consecutivamente al enzima y transfieren un electrón para reducir una molécula de O₂ a H₂O (Figura 18.14).

- Los electrones de dos moléculas de citocromo *c* reducido fluyen por la vía de transporte electrónico, uno parando en el Cu_B y el otro en el hemo *a*₃. Con ambos centros en estado reducido, pueden unir juntos una molécula de oxígeno.
- Cuando se une el oxígeno molecular, extrae un electrón de cada uno de los iones cercanos para formar un puente peróxido (O₂²⁻) entre ellos (Figura 18.15)
- Dos moléculas más de citocromo *c* se unen y liberan electrones que se dirigen al centro activo. La adición de un electrón así como un H⁺ a cada átomo de oxígeno reduce los dos conjuntos de oxígeno–ión a Cu_B²⁺–OH y Fe³⁺–OH.
- La reacción con otros dos iones H⁺ permite la liberación de dos moléculas de H₂O y restaura el enzima a su forma inicial, completamente oxidado.

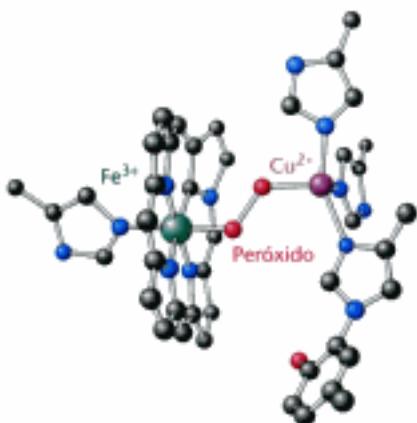


Figura 18.15 Puente de peróxido. El oxígeno unido al hemo α₃ se reduce a peróxido por la presencia de Cu_B.



Los cuatro protones de esta reacción proceden exclusivamente de la matriz. Por tanto, el consumo de estos cuatro protones contribuye directamente al gradiente de protones. Recordemos que cada protón aporta $21,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($5,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) a la energía libre asociada al gradiente de protones, de manera que estos cuatro protones aportan $87,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($20,8 \text{ kcal mol}^{-1}$), una cantidad sustancialmente menor que la energía libre disponible a partir de la reducción del oxígeno a agua. ¿Cuál es el destino de esta energía perdida? Sorprendentemente, la citocromo c oxidasa usa esta energía para bombear cuatro protones adicionales desde el lado de la matriz hacia el lado citoplasmático de la membrana, en el transcurso de cada ciclo de reacción dando un total de ocho protones que desaparecen de la matriz (Figura 18.16). Los detalles sobre cómo se transportan estos protones a través de la proteína todavía se están investigando. Sin embargo, dos factores contribuyen al mecanismo. En primer lugar, existe una tendencia a mantener la neutralidad de cargas en el interior de las proteínas. Por tanto, la unión de un electrón a algún lugar del interior de la proteína favorece la unión de un protón en algún lugar cercano. En segundo lugar, durante el transcurso del ciclo de reacciones se producen cambios conformatacionales, particularmente en torno al centro hemo $\alpha_3\text{-Cu}_b$. Presumiblemente, en una conformación los protones pueden entrar la proteína exclusivamente del lado de la matriz, mientras que en la otra, pueden salir exclusivamente al lado citoplasmático. Así pues, el proceso general catalizado por la citocromo c oxidasa es



La Figura 18.17 resume el flujo de electrones desde el NADH y el FADH₂ a través de la cadena respiratoria. Esta serie de reacciones exergónicas está acoplada al bombeo de protones desde la matriz. Como se verá en breve, la energía inherente al gradiente de protones se usará para sintetizar ATP.

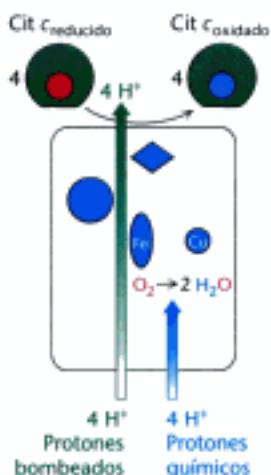


Figura 18.16 Transporte de protones por la citocromo c oxidasa. Cuatro protones se incorporan del lado de la matriz para reducir una molécula de O_2 a dos moléculas de H_2O . Estos protones se conocen como "protones químicos" porque participan en una reacción con el O_2 claramente definida. Cuatro protones adicionales bombeados se conducen al exterior de la matriz y se liberan en el lado citoplasmático durante la reacción. Los protones bombeados duplican la eficiencia del almacenamiento de energía libre en forma de un gradiente de protones en este paso final de la cadena transportadora de electrones.

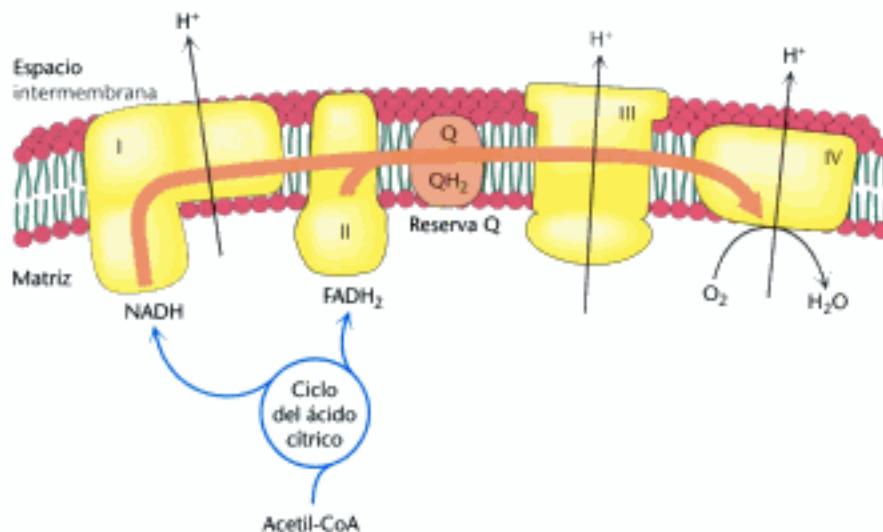


Figura 18.17 La cadena transportadora de electrones. Los electrones de alta energía en forma de NADH y FADH₂ se generan en el ciclo del ácido cítrico. Estos electrones fluyen a través de la cadena respiratoria, que potencia el bombeo de protones y produce la reducción de O_2 .

Los derivados tóxicos del oxígeno molecular como el radical superóxido se neutralizan mediante enzimas protectores

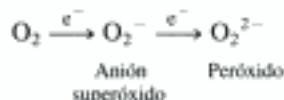
Como ya hemos indicado anteriormente, el oxígeno molecular es un acceptor final de electrones ideal, porque su elevada afinidad hacia los electrones proporciona una gran fuerza impulsora termodinámica. Sin embargo, la reducción del O_2 no está exenta de riesgos. La transferencia de cuatro electrones da lugar a productos inocuos (dos moléculas de H_2O), pero la reducción parcial origina compuestos peligrosos. Con-

TABLA 18.3 Condiciones patológicas y de otro tipo que pueden implicar daños por radicales libres

- Aterogénesis
Bronquitis enfisémica
Enfermedad de Parkinson
Distrofia muscular de Duchenne
Cáncer cervical
Enfermedad alcohólica del hígado
Diabetes
Fallo renal agudo
Síndrome de Down
Fibroplasia retroental (conversión de la retina en una masa fibrosa en recién nacidos prematuros)
Alteraciones cerebrovasculares
Isquemia: daños de reperfusión

Fuente: Tomado de D. B. Marks, A. D. Marks y C. M. Smith, *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach* (Williams & Wilkins, 1996), p. 331.

cretamente, la transferencia de un único electrón al O_2 genera el anión superóxido y la transferencia de dos electrones origina peróxido.



Ambos compuestos son potencialmente destructivos. La estrategia para la reducción segura del O_2 es clara: *el catalizador no libera intermediarios parcialmente reducidos*. La citocromo c oxidasa cumple este requisito fundamental reteniendo fuertemente al O_2 entre los iones Fe y Cu.

Aunque la citocromo c oxidasa y otras proteínas que reducen O_2 son particularmente eficientes para no liberar intermediarios, resulta inevitable que se generen pequeñas cantidades de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno. El superóxido, el peróxido de hidrógeno y otros productos que se pueden generar a partir de ellos, como el OH⁻, se incluyen colectivamente bajo el término *especies reactivas del oxígeno*, o ROS ("reactive oxygen species"). El daño oxidativo causado por ROS se ha implicado en el proceso de envejecimiento así como en una lista creciente de enfermedades (Tabla 18.3).

¿Qué estrategias defensivas adopta la célula para evitar el daño oxidativo provocado por los ROS? La más importante es el enzima *superóxido dismutasa*. Este enzima neutraliza los radicales superóxido catalizando la conversión de dos de estos radicales en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

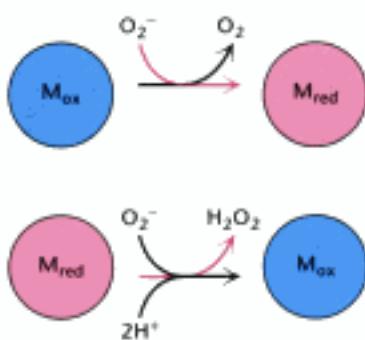
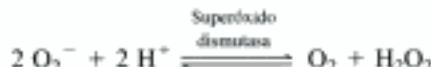


Figura 18.18 Mecanismo de la superóxido dismutasa. La forma oxidada de la superóxido dismutasa (M_{ox}) reacciona con un ion superóxido para formar O_2 y la forma reducida del enzima (M_{red}). Posteriormente, la forma reducida reacciona con un segundo superóxido y dos protones para formar peróxido de hidrógeno y regenerar la forma oxidada del enzima.



Los eucariotas poseen dos formas de este enzima, una variante que contiene manganeso localizada en las mitocondrias y una variante citoplasmática dependiente de cobre y zinc. Estos dos enzimas llevan a cabo la reacción de dismutación mediante mecanismos parecidos (Figura 18.18). La forma oxidada del enzima se reduce por el superóxido para formar oxígeno. La forma reducida del enzima, producida en esta reacción, reacciona con un segundo ion superóxido originando peróxido, que durante el transcurso de la reacción acepta dos protones y genera peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa y por otros enzimas es neutralizado por la *catalasa*, una proteína ubicua que contiene un grupo hemo y que cataliza la disociación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.



La superóxido dismutasa y la catalasa son extraordinariamente eficientes, llevando a cabo sus reacciones a una velocidad igual o cercana a la velocidad de difusión (p. 221). La glutatión peroxidasa también desempeña un papel neutralizando H_2O_2 (p. 587).

Otras defensas celulares frente al daño oxidativo incluyen las vitaminas antioxidantes, vitaminas E y C. Al ser lipofílica, la vitamina E es particularmente eficaz a la hora de evitar la peroxidación de lípidos en las membranas.

Uno de los beneficios a largo plazo del ejercicio puede ser el incrementar la cantidad de superóxido dismutasa en la célula. El elevado metabolismo aeróbico durante el ejercicio causa que se generen más ROS. En respuesta, la célula sintetiza más enzimas protectores. El efecto neto es de protección, porque el incremento en superóxido dismutasa protege más eficazmente a la célula durante los períodos de descanso.

Los electrones se pueden transferir entre grupos que no están en contacto

¿Cómo se transfieren los electrones entre los grupos transportadores de electrones de la cadena respiratoria? Esta pregunta es fascinante porque estos grupos están a menudo inmersos en el interior de la proteína ocupando posiciones fijas y que por tanto no establecen un contacto directo entre ellos. Los electrones se pueden desplazar en el espacio, incluso en condiciones de vacío. Sin embargo, la velocidad de transferencia de electrones a través del espacio disminuye rápidamente a medida que aumenta la distancia entre el dador y el aceptor de electrones, haciéndose 10 veces menor cada vez que su separación aumente en 0,8 Å. El entorno de las proteínas proporciona vías más eficaces para el transporte de electrones: generalmente, la velocidad de transferencia de electrones disminuye en un factor de 10 por cada 1,7 Å de separación (Figura 18.19). Cuando los grupos están en contacto las reacciones de transferencia de electrones pueden ser muy rápidas, alcanzando velocidades de hasta 10^{13} s^{-1} . En las proteínas de la cadena transportadora de electrones, la distancia media entre los grupos transportadores de electrones es de unos 15 Å, superior a la distancia de contacto de van der Waals. A estas distancias, la velocidad de transferencia de electrones estimada es de unos 10^4 s^{-1} (es decir, cada electrón se transfiere en menos de 1 ms), suponiendo que todos los demás factores estén optimizados. Sin la intervención de las proteínas, un electrón tardaría aproximadamente 1 día en atravesar esta distancia.

El caso es más complicado cuando los electrones se deben transferir entre dos proteínas distintas, como cuando el citocromo *c* acepta electrones del complejo III o se los pasa al complejo IV. Una serie de interacciones hidrofóbicas llevan a los grupos hemo de los citocromos *c* y *c₁* a unos 4,5 Å de distancia, con los átomos de hierro separados por 17,4 Å. Esta distancia podría permitir la reducción del citocromo *c* a una velocidad de $8,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$.

Otro factor importante a la hora de determinar la velocidad de transferencia de electrones es la fuerza impulsora, el incremento de energía libre asociado a la reacción (Figura 18.20). Al igual que en la mayoría de las reacciones, la velocidad de las

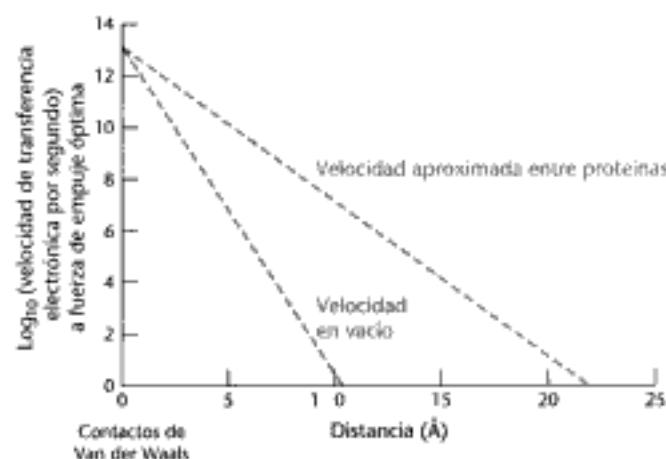


Figura 18.19 Dependencia de la distancia en la velocidad de transferencia electrónica. La velocidad de transferencia electrónica disminuye cuando el dador electrónico y el aceptor electrónico se separan. En el vacío, la velocidad disminuye por un factor de 10 por cada 0,8 Å de aumento. En proteínas, la velocidad disminuye de una forma más gradual, por un factor de 10 a cada incremento de 1,7 Å. Esta velocidad es solamente aproximada porque las variaciones en la estructura en el medio de la proteína pueden afectar a la velocidad.

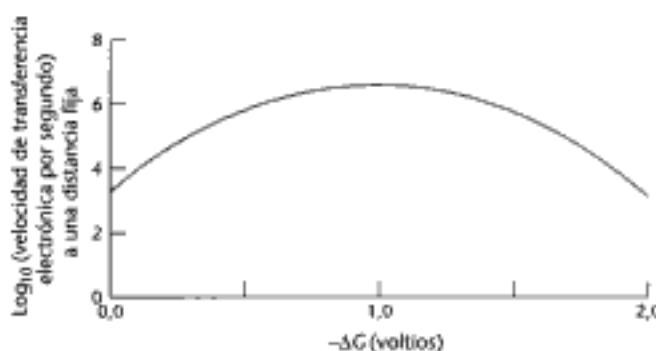


Figura 18.20 Dependencia de la energía libre en la velocidad de transferencia electrónica. La velocidad de una reacción de transferencia electrónica incrementa al principio conforme la fuerza de empuje para la reacción se incrementa. La velocidad alcanza un máximo y luego disminuye a fuerzas de empuje mayores.

reacciones de transferencia de electrones aumenta a medida que el incremento de energía libre de la reacción es más favorable. Sin embargo, curiosamente cada reacción de transferencia de electrones tiene una fuerza impulsora óptima, y por encima de este valor la reacción resulta más favorable, pero la velocidad del proceso de transferencia de electrones disminuye. Como veremos en el Capítulo 19, esta *región invertida* es extraordinariamente importante en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis.

La conformación del citocromo c ha permanecido prácticamente constante durante más de mil millones de años

 El citocromo c está presente en todos los organismos que poseen cadenas respiratorias mitocondriales: plantas, animales y microorganismos eucariotas. Este transportador de electrones evolucionó hace más de 1500 millones de años, antes de producirse la separación entre animales y plantas. Su función se ha conservado durante todo este tiempo, tal y como evidencia el hecho de que *el citocromo c de cualquier especie eucariota reacciona in vitro con la citocromo c oxidasa de cualquier otra especie ensayada hasta la fecha*. Por ejemplo, el citocromo c de germen de trigo reacciona con la citocromo oxidasa humana. Además, algunos citocromos de procariotas, como el citocromo c₂ de una bacteria fotosintética y el citocromo c₅₅₀ de una bacteria desnitrificante, son muy parecidos al citocromo c de las mitocondrias de corazón de atún (Figura 18.21). Esta observación atestigua el hecho de que las características estructurales y funcionales del citocromo c representan una solución evolutiva eficiente para la transferencia de electrones.



Figura 18.21 Conservación de la estructura tridimensional del citocromo c.

Se indican las cadenas laterales de los 21 aminoácidos conservados y el grupo hemo. [Tomado de 3CYT.pdb, 3C2C.pdb, y 1SSC.pdb.]

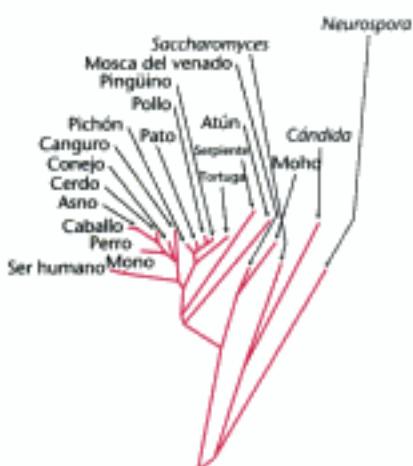
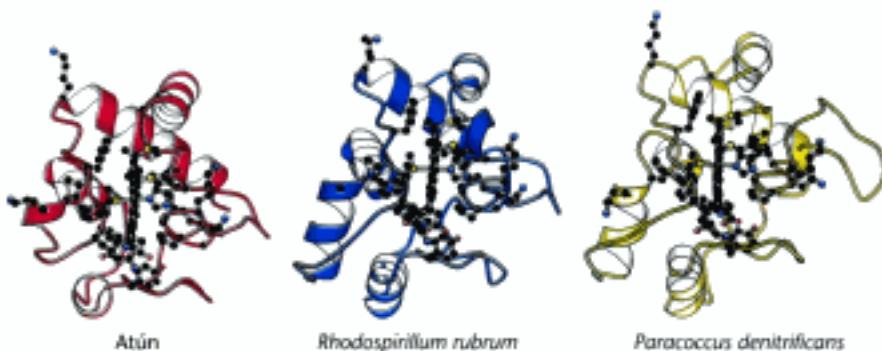


Figura 18.22 Árbol evolutivo elaborado a partir de las secuencias del citocromo c. La longitud de las ramas es proporcional al número de cambios en los aminoácidos que parece haber tenido lugar. Este dibujo es una adaptación del trabajo de Walter M. Fitch y Emmanuel Margoliash.

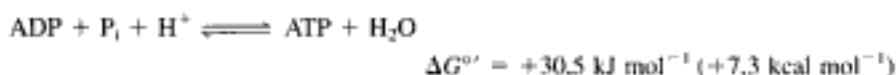
El parecido entre las distintas moléculas de citocromo c se hace extensivo a nivel de sus secuencias de aminoácidos. Debido al relativamente pequeño tamaño de la molécula y a su ubicuidad, Emil Smith, Emanuel Margoliash y otros han podido determinar por secuenciación directa de las proteínas la secuencia de aminoácidos del citocromo c en más de 80 especies muy diversas de eucariotas. El hallazgo sorprendente es que *21 de los 104 residuos han permanecido invariantes durante más de mil quinientos millones de años de evolución*. Un árbol filogenético, elaborado a partir de las secuencias de aminoácidos del citocromo c, nos revela las relaciones evolutivas existentes entre muchas especies animales (Figura 18.22).

18.4 Un gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP

Hasta ahora hemos considerado el flujo de electrones desde el NADH hasta el O₂ como un proceso exergónico.



$$\Delta G^\circ = -220,1 \text{ kJ mol}^{-1} (-52,6 \text{ kcal mol}^{-1})$$



Una maquinaria molecular de la membrana interna mitocondrial lleva a cabo la síntesis de ATP. Este complejo enzimático se llamó originariamente *ATPasa mitocondrial*, o $F_1 F_0$ *ATPasa* ya que fue descubierta gracias a su catálisis en sentido inverso, hidrolizando ATP. Su nombre más aceptado, *ATP sintasa*, recalca su función real en la mitocondria. También recibe el nombre de *Complejo V*.

¿Cómo se acopla la oxidación del NADH a la fosforilación del ADP? En un principio se sugirió que la transferencia de electrones daba lugar a la formación de un intermediario covalente de alta energía que actuaría como un compuesto con un elevado potencial de transferencia de fosforilos, análogo a la generación de ATP por formación de 1,3-bisfosfoglicerato en la glicolisis. Una propuesta alternativa fue que la transferencia electrónica induciría la formación de una conformación proteica activada que posteriormente llevaría a cabo la síntesis de ATP. Después de varias décadas, la búsqueda de tales intermediarios ha resultado infructuosa.

En 1961, Peter Mitchell propuso un mecanismo radicalmente diferente, la *hipótesis quimiosmótica*. Propuso que el transporte electrónico y la síntesis de ATP se acoplan mediante *un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna*. En su modelo, la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria provoca el bombeo de protones desde el lado de la matriz hacia el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna. La concentración de H^+ en la matriz disminuye y se genera un campo eléctrico que es negativo en el lado de la matriz (Figura 18.23). Los protones fluyen de vuelta a la matriz para igualar la distribución. La idea de Mitchell era que este flujo de protones impulsa la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa. La distribución desigual, rica en energía, de protones, se conoce como *fuerza protón-motriz*. Se puede imaginar que la fuerza protón-motriz está compuesta por dos componentes: un gradiente químico y un gradiente de carga. El gradiente químico para los protones se puede representar como un gradiente de pH. El gradiente de carga se crea por la carga positiva de los protones distribuidos desigualmente que forman el gradiente químico. Mitchell propuso que ambos componentes impulsan la síntesis de ATP.

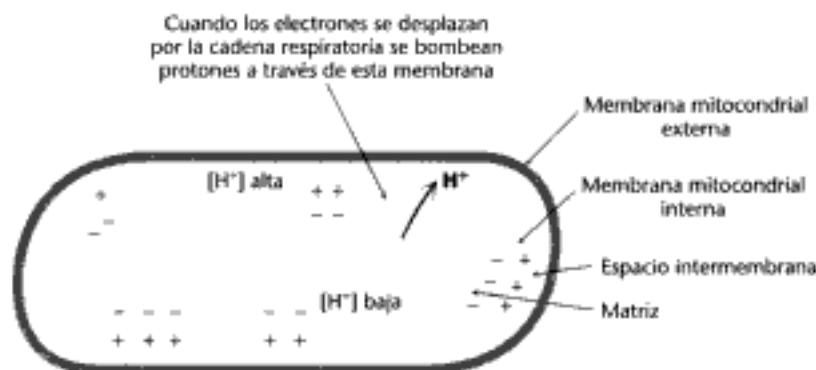


Figura 18.23 Hipótesis quimiosmótica. La transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria provoca el bombeo de protones desde el lado de la matriz hacia el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna. El gradiente de pH y el potencial de membrana constituyen una fuerza protón-motriz que es utilizada para dirigir la síntesis de ATP.

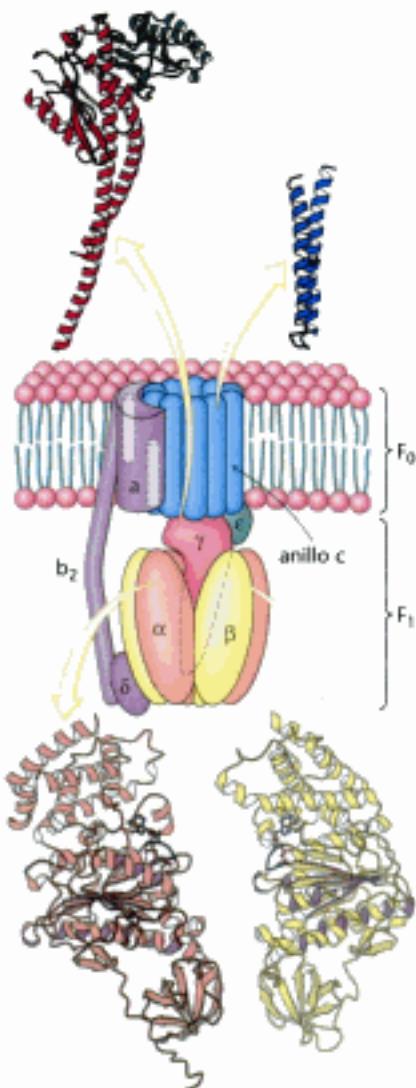
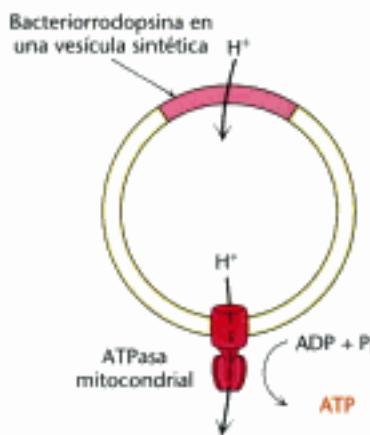


Figura 18.25 Estructura de la ATP sintasa. Se representa una estructura esquemática junto con las estructuras detalladas de aquellos componentes cuyas estructuras se han determinado a alta resolución. El sombreado de color púrpura representa los dominios NTPasa del bucle P de las subunidades α y β . Nótese que parte del complejo enzimático está localizado en la membrana interna mitocondrial, mientras que el resto se encuentra en la matriz. [Tomado de 1E79.pdb y 1COV.pdb.]

Figura 18.24 Probando la hipótesis quimiomotriz. Cuando se iluminan vesículas de membrana reconstituidas que contienen bacteriorrodopsina (una bomba de protones dependiente de la luz) y ATP sintasa, se sintetiza ATP. La orientación de la ATP sintasa en estas membranas reconstituidas es la contraria a la de la mitocondria.



$$\text{Fuerza protón-motriz } (\Delta p) = \text{gradiente químico } (\Delta pH) + \text{gradiente de carga } (\Delta \phi)$$

La hipótesis innovadora de Mitchell de que la oxidación y la fosforilación se acoplan mediante un gradiente de protones está hoy en día respaldada por un gran número de evidencias. De hecho, el transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. El pH externo es 1,4 unidades menor que el interno y el potencial de membrana es de 0,14 V, positivo en el exterior. Como ya se calculó en la página 508, este potencial de membrana se corresponde con una energía libre de 21,8 kJ (5,2 kcal) por mol de protones.

Se diseñó un sistema artificial para demostrar de una manera elegante el principio básico de la hipótesis quimiomotriz. La bacteriorrodopsina se utilizó como cadena respiratoria. Esta proteína de la membrana púrpura de halobacterias bombea protones al ser iluminada. Se desarrollaron vesículas sintéticas que contenían bacteriorrodopsina y ATP sintasa mitocondrial purificada de corazón de buey (Figura 18.24). Cuando las vesículas se exponían a la luz, se formaba ATP. Este experimento clave demostró claramente que *la cadena respiratoria y la ATP sintasa son dos sistemas bioquímicos distintos, conectados únicamente por la fuerza protón-motriz*.

La ATP sintasa está formada por una unidad transportadora de protones y una unidad catalítica

Los estudios bioquímicos, de microscopía electrónica y cristalográficos de la ATP sintasa han puesto de manifiesto muchos detalles de su estructura (Figura 18.25). Es un enzima grande y complejo, que parece una pelota sujetada a un palo. Gran parte del "palito", llamada la subunidad F_0 , está inserta en la membrana interna mitocondrial. La pelota, de 85 Å de diámetro, llamada la subunidad F_1 , se proyecta hacia la matriz mitocondrial. La subunidad F_1 posee la actividad catalítica de la sintasa. De hecho, las subunidades F_1 aisladas exhiben actividad ATPasa.

La subunidad F_1 está formada por cinco tipos de cadenas polipeptídicas (α , β , γ , δ y ϵ) con la estequiometría indicada en los subíndices. Las subunidades a y β , que constituyen el grueso de la F_1 , se disponen de forma alternada en un anillo hexámerico, son homólogas entre sí y son miembros de la familia de NTPasas de bucle P (p. 267). Las dos unen nucleótidos, pero sólo las subunidades β participan directamente en la catálisis. Comenzando justo debajo de las subunidades γ y ϵ hay un tallo central que está formado por las proteínas γ y ϵ . La subunidad γ contiene un superhélicoide de hélices α (p. 45) que llega hasta el centro del hexámero $\alpha_3\beta_3$. La subunidad γ rompe la simetría del hexámero $\alpha_3\beta_3$: cada una de las subunidades β es distinta en virtud de sus interacciones con diferentes caras de γ . Poder distinguir entre las tres subunidades β resulta crucial para entender el mecanismo de síntesis de ATP.

La subunidad F_0 es un segmento hidrofóbico que atraviesa la membrana interna mitocondrial. F_0 contiene el *conducto de protones del complejo*. Este conducto está formado por un anillo que contiene entre 10 y 14 subunidades ϵ , que están insertadas en la membrana. Una única subunidad a se une a la periferia del anillo. Las subunidades F_0 y F_1 están conectadas de dos formas: mediante el tallo central $\gamma\epsilon$ y mediante una columna externa. La columna externa está formada por una subunidad a , dos subunidades b y la subunidad δ . Como veremos más adelante, podemos considerar que el enzima está compuesto por una parte móvil y una parte estacionaria; (1) la unidad móvil o *rotor*, está formada por el anillo ϵ y el tallo $\gamma\epsilon$, y (2) y una unidad estacionaria o *estátor*, formada por el resto de la molécula.

El flujo de protones a través de la ATP sintasa provoca la liberación del ATP fuertemente unido: el mecanismo de cambio de unión

La ATP sintasa cataliza la formación de ATP a partir de ADP y ortofosfato.



Los sustratos reales son complejos de ADP y ATP con Mg^{2+} , como en todas las reacciones de transferencia de fosforilos conocidas para estos dos nucleótidos. Un átomo de oxígeno distal del ADP ataca al átomo de fósforo del P_i para formar un intermediario pentacovalente, que posteriormente se disocia en ATP y H_2O (Figura 18.26). El átomo de oxígeno atacante del ADP y el átomo de oxígeno desplazado del P_i ocupan los vértices de una bipirámide trigonal.



Figura 18.26 Mecanismo de síntesis de ATP. Uno de los átomos de oxígeno del ADP ataca al átomo de fósforo del P_i para formar un intermediario pentacovalente que posteriormente genera ATP y libera una molécula de H_2O .

¿De qué modo el flujo de protones impulsa la síntesis de ATP? Los resultados de experimentos de intercambio isotópico revelaron de forma insospechada que el *complejo enzima-ATP unido se forma fácilmente en ausencia de fuerza protón-motriz*. Al añadir ADP y P_i a la ATP sintasa en H_2^{18}O , el ^{18}O se incorporaba al P_i por la síntesis y posterior hidrólisis del ATP (Figura 18.27). La velocidad de incorporación del ^{18}O al P_i indicaba que cantidades aproximadamente iguales de ATP unido y de ADP están en equilibrio en el centro catalítico, incluso en ausencia de un gradiente de protones. Sin embargo, el ATP no abandona el centro catalítico a menos que exista un

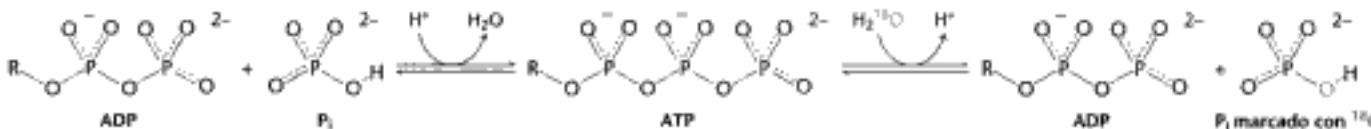


Figura 18.27 El ATP se forma en ausencia de una fuerza protón-motriz, pero no se libera. Los resultados de experimentos de intercambio isotópico indican que el ATP se forma a partir de ADP y P_i en ausencia de una fuerza protón-motriz.

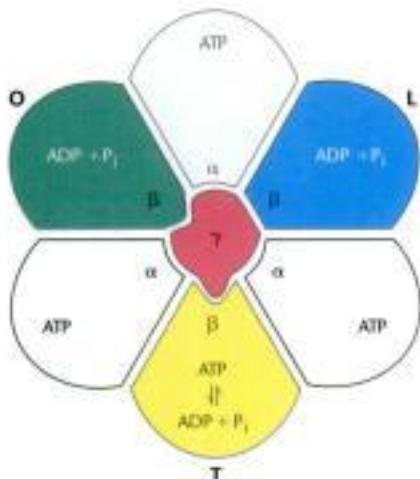


Figura 18.28 Los lugares de unión a nucleótidos de la ATP sintasa no son equivalentes. La subunidad γ atraviesa el centro del hexámero $\alpha_3\beta_3$, haciendo que los lugares de unión a nucleótidos de las subunidades β sean distintos entre sí. Nótese que cada subunidad α contiene ATP unido, pero estas subunidades no participan en ninguna de las reacciones.

Alteraciones progresivas de las formas de los tres centros activos de la ATP sintasa

Subunidad 1 L \rightarrow T \rightarrow O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow O...
 Subunidad 2 O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow O \rightarrow L \rightarrow T...
 Subunidad 3 T \rightarrow O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow O \rightarrow L...

flujo de protones a través del enzima. Por tanto, *el papel del gradiente de protones no es la formación del ATP sino su liberación de la sintasa*.

En base a ésta y otras observaciones, Paul Boyer propuso *el mecanismo de cambio de unión* para la síntesis de ATP impulsada por protones. Su propuesta establece que una subunidad β puede llevar a cabo cada uno de los tres pasos secuenciales en la función de síntesis de ATP cambiando de conformación. Estos pasos son (1) unión de ADP y P_i , (2) síntesis de ATP y (3) liberación de ATP. Los conceptos de esta primera propuesta, refinados mediante datos cristalográficos más recientes y otros datos proporcionan un mecanismo convincente para la síntesis de ATP. Como ya se ha indicado, las interacciones con la subunidad γ hacen que las tres subunidades β no sean equivalentes (Figura 18.28). Una subunidad β puede estar en la conformación L, o relajada ("loose"). Esta conformación une ADP y P_i . Una segunda subunidad puede estar en la conformación T o tensa ("tight"). Esta conformación une ATP con gran avidez, tanta que convertirá el ADP y P_i unidos en ATP. Ambas conformaciones, T y L están lo suficientemente confinadas como para no poder liberar los nucleótidos unidos. La última subunidad se encontrará en la forma O, o abierta ("open"). Esta conformación puede estar unida a un nucleótido con una estructura parecida a la de las formas T y L, pero también se puede convertir en una conformación más abierta y desprenderse del nucleótido unido.

La interconversión entre estas tres formas está promovida por la rotación de la subunidad γ (Figura 18.29). El ADP y el P_i unidos a la subunidad en forma T se combinan transitoriamente para formar ATP. Supongamos que la subunidad γ gira 120 grados en sentido antihorario (mirando desde la parte superior). Esta rotación convierte al centro en conformación T en un centro en conformación O con el nucleótido unido como ATP. Al mismo tiempo, el centro en conformación L se convierte en centro en conformación T, permitiendo la conversión del ADP y P_i unidos en ATP. El ATP en el centro en conformación O puede entonces liberarse del enzima para ser reemplazado por ADP y P_i . Una rotación adicional de 120 grados convierte a este centro en conformación O en uno en conformación L, atrapando estos sustratos. Cada subunidad avanza de la conformación T a la O y a la L sin que dos subunidades puedan estar nunca presentes en la misma conformación. Este mecanismo sugiere que se puede sintetizar y liberar el ATP promoviendo la rotación de la subunidad γ en el sentido apropiado.

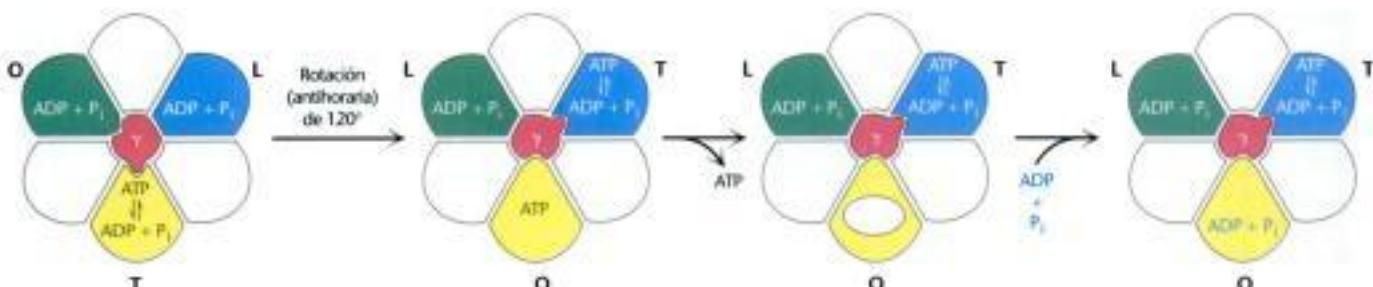


Figura 18.29 Mecanismo de cambio de unión de la ATP sintasa. La rotación de la subunidad γ transforma las tres subunidades β . La subunidad en estado T (tenso), transforma ADP y P_i y contiene ATP, pero este no se puede liberar. Cuando la subunidad γ gira 120° en dirección contraria a las agujas del reloj (CCW), la subunidad en forma T se convierte en la forma O, permitiendo la liberación de ATP. El ADP y P_i pueden unirse entonces a la subunidad en forma O. Una rotación adicional de 120 grados (no mostrada) atrapa a estos sustratos en la subunidad en forma L.

Catálisis rotacional en el motor molecular más pequeño del mundo

¿Es posible observar directamente la rotación propuesta? Experimentos refinados han demostrado la rotación utilizando un sistema experimental sencillo formado únicamente por las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma$ clonadas (Figura 18.30). Las subunidades β fueron diseñadas para que tuviesen en su extremo amino una cola de polihistidina, que presenta gran afinidad hacia los iones níquel. Gracias a esta propiedad, fue posible inmovilizar el complejo $\alpha_3\beta_3$ sobre una superficie de cristal recubierta de iones níquel. La subunidad γ estaba unida a un filamento de actina marcado fluorescentemente, formando un largo segmento que podía ser observado con un microscopio de fluorescencia. Sorprendentemente, la adición de ATP provocaba la rotación unidi-

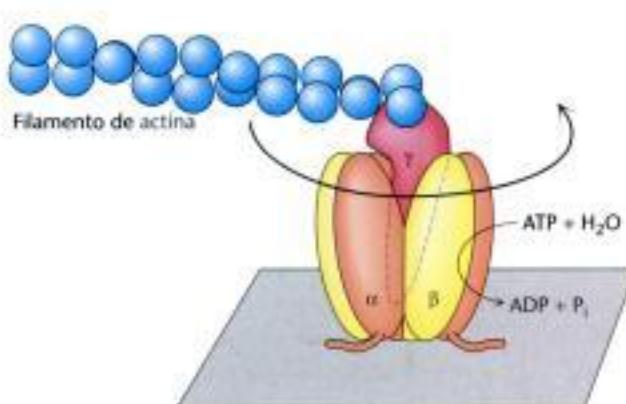


Figura 18.30 Observación directa de la rotación impulsada por ATP en la ATP sintasa. Se fija el hexámero $\alpha_3\beta_3$ de la ATP sintasa sobre una superficie, de manera que la subunidad γ se proyecta hacia arriba y está unida a un filamento de actina marcado fluorescente. La adición y posterior hidrólisis del ATP da lugar a la rotación de la subunidad γ en sentido antihorario, lo que puede observarse directamente con un microscopio de fluorescencia.

reccional del filamento de actina en sentido antihorario. La subunidad γ estaba rotando impulsada por la hidrólisis del ATP. Por tanto, era posible observar la actividad catalítica de una única molécula. La rotación en sentido antihorario es consistente con el mecanismo de hidrólisis propuesto porque la molécula se observaba desde abajo si tomamos como referencia la perspectiva mostrada en la Figura 18.30.

Un análisis más detallado en presencia de concentraciones menores de ATP reveló que la subunidad γ gira en incrementos de 120° . Cada paso corresponde a la hidrólisis de una única molécula de ATP. Además, los resultados obtenidos al medir la velocidad de rotación utilizando filamentos de actina de distinta longitud indican que el enzima trabaja con una eficacia cercana al 100%; es decir, prácticamente toda la energía liberada por la hidrólisis del ATP se convierte en movimiento rotacional.

El flujo de protones alrededor del anillo c impulsa la síntesis de ATP

La observación directa del movimiento rotatorio de la subunidad γ constituye una sólida evidencia en favor del mecanismo rotacional de la síntesis de ATP. La pregunta que queda por responder es: ¿Cómo el flujo de protones a través de F_0 provoca la rotación de la subunidad γ ? Howard Berg y George Oster han propuesto un elegante mecanismo que proporciona una clara respuesta a esta pregunta. El mecanismo se basa en las estructuras de las subunidades a y c de F_0 (Figura 18.31). La subunidad a es contigua directamente al anillo de 10 a 14 subunidades c que atraviesan la membrana. Aunque la estructura de la subunidad a no se ha determinado todavía experimentalmente, existe una amplia evidencia consistente con una estructura que incluye dos semiconductores hidrofílicos que no atraviesan la membrana (ver Figura 18.31). De este modo, los protones pueden entrar en cualquiera de estos conductos, pero no pueden moverse completamente a través de la membrana. La subunidad a está posicionada de tal forma que cada semiconductor interacciona directamente con una subunidad c .

La estructura de la subunidad c se ha determinado tanto por métodos de NMR como por cristalografía de rayos X. Cada cadena polipeptídica forma una pareja de hélices α que atraviesan la membrana. Un residuo de ácido aspártico (Asp 61) está situado en la mitad de una de las hélices. Cuando el residuo Asp 61 de las dos subunidades c están en contacto con el entorno hidrofílico de un semiconductor, pueden ceder sus protones de forma que están en la forma cargada del aspartato (Figura 18.32). La clave del movimiento de protones a través de la membrana es que, en un entorno rico en protones, como el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial, un protón entrará en un conducto y se unirá al residuo de aspartato. La subunidad con el protón unido rotará entonces a través de la membrana hasta que el ácido aspártico se encuentre en un entorno pobre en protones del otro semiconductor, donde el protón es liberado. El movimiento de protones a través de los semiconductores desde la concentración alta de protones del citoplasma a la concentración baja en protones de la matriz impulsa la rotación del anillo c . Su rotación está favorecida por la capacidad del residuo de ácido aspártico recién protonado (neutralizado) para ocu-



Figura 18.31 Componentes de la unidad transportadora de protones de la ATP sintasa. La subunidad c está formada por dos hélices α que atraviesan la membrana. Un residuo de ácido aspártico en una de las hélices está situado en el centro de la membrana. La estructura de la subunidad a todavía no se ha observado directamente, pero parece incluir dos semiconductores que permiten la entrada de los protones y su desplazamiento parcial, pero no completamente a través de la membrana.

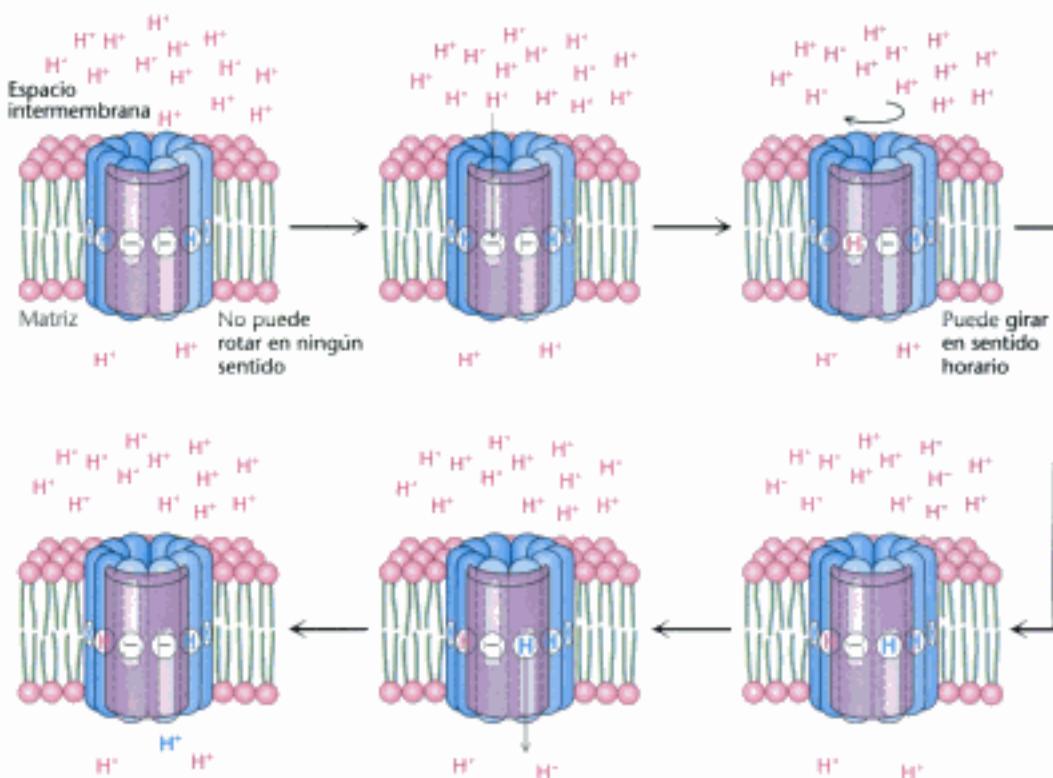


Figura 18.32 El movimiento de protones a través de la membrana provoca la rotación del anillo c. Un protón procedente del espacio intermembrana se introduce en el semiconducto citosólico para neutralizar la carga de un residuo de aspartato de la subunidad c. Con esta carga neutralizada, el anillo c puede girar en sentido horario el equivalente a una subunidad c, desplazando un residuo de ácido aspártico desde la membrana hasta el semiconducto de la matriz. Este protón puede fluir hacia la matriz, reinstaurando las condiciones iniciales del sistema.

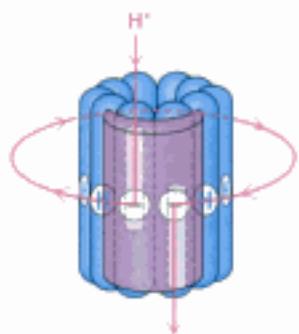


Figura 18.33 Vía de los protones a través de la membrana. Cada protón entra por el semiconducto citoplasmático, da una vuelta completa del anillo c y sale por el otro semiconducto hacia la matriz.

par el entorno hidrofóbico de la membrana. Así, la subunidad c con el ácido aspártico recién protonado se mueve del contacto con el semiconducto citoplasmático hacia la membrana, y las otras subunidades c se mueven a la vez. Cada protón que entra en el semiconducto citoplasmático se mueve a través de la membrana desplazándose en el anillo c rotatorio para salir a través del semiconducto de la matriz al entorno pobre en protones de la matriz (Figura 18.33).

¿Cómo el giro del anillo c produce la síntesis de ATP? El anillo c está unido firmemente a las subunidades γ y ϵ . Por ello, mientras que el anillo c gira, estas subunidades giran en el interior del hexámero $\alpha_3\beta_3$ de la F₁. La rotación de la subunidad γ produce a su vez la síntesis de ATP por medio del mecanismo de cambio conformacional por unión. La columna exterior formada por las dos cadenas b y la subunidad δ evita que el hexámero $\alpha_3\beta_3$ gire. Recuérdese que el número de subunidades c en el anillo c parece estar en el rango de 10 a 14 subunidades. Este número es significante porque determina el número de protones que deben transportarse para generar una molécula de ATP. Cada giro de 360 grados de la subunidad γ lleva a la síntesis y liberación de tres moléculas de ATP. Así, si hay 10 subunidades c en el anillo (como se ha observado en la estructura cristalina de la ATP sintasa mitocondrial de levadura), cada ATP generado necesita el transporte de $10/3 = 3.33$ protones. Por sencillez, se asume que tres protones deben incorporarse a la matriz por cada ATP formado, aun cuando debemos tener en cuenta que el valor real puede ser distinto. Como veremos, los electrones del NADH bombean suficientes protones para generar 2,5 moléculas de ATP, mientras que los del FADH₂ dan 1,5 moléculas de ATP.

Volvamos por un momento al ejemplo con el que se ha comenzado este capítulo. Si un humano en reposo requiere 85 kg de ATP diarios para las funciones corpora-

Lo poco llega a mucho

A pesar de las varias maquinaciones moleculares y la enorme cantidad de ATPs sintetizados y protones bombeados, un ser humano en reposo requiere sorprendentemente poca potencia. Aproximadamente 116 vatios, el gasto energético de una bombilla típica, provee suficiente energía para mantener una persona en reposo.

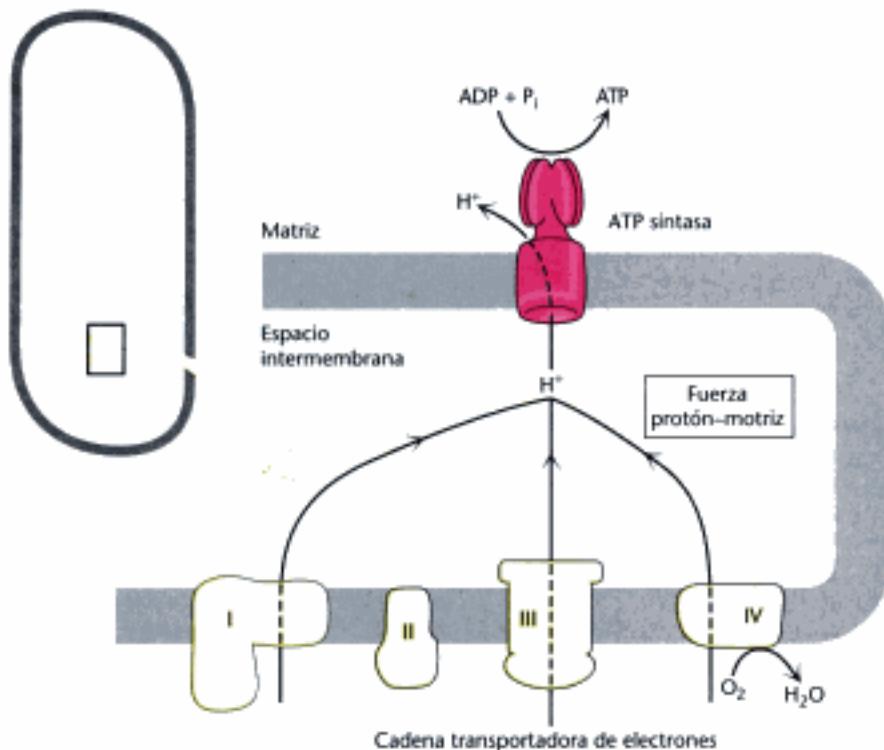


Figura 18.34 Panorama de la fosforilación oxidativa. La cadena transportadora de electrones genera un gradiente de protones que se utiliza para sintetizar ATP.

les, $3,3 \times 10^{25}$ debieran fluir a través de la ATP sintasa cada día, o $3,3 \times 10^{21}$ protones por segundo. La Figura 18.34 resume el proceso de la fosforilación oxidativa.

La ATP sintasa y las proteínas G tienen varias características comunes

Las subunidades α y β de la ATP sintasa pertenecen a la familia de proteínas NTPasas con bucle P. En el Capítulo 14 vimos que las propiedades de señalización de otros miembros de esta familia, las proteínas G, dependen de su capacidad para unirse a nucleótidos trifosfato y difosfato con gran firmeza. No intercambian los nucleótidos a menos que se les induzca a ello mediante la interacción con otras proteínas. El mecanismo de cambio en la unión de la ATP sintasa es una variante de este esquema. Las regiones bucle P de las subunidades β unirán ADP o ATP (o liberarán ATP), dependiendo con cuál de las tres caras diferentes de la subunidad γ interactúan. Los cambios de conformación se suceden de forma ordenada, dirigidos por la rotación de la subunidad γ .

18.5 Muchas lanzaderas permiten el movimiento a través de las membranas mitocondriales

La membrana interna mitocondrial debe ser impermeable a la mayoría de las moléculas a pesar de que deben producirse numerosos intercambios entre el citoplasma y las mitocondrias. Este intercambio está mediado por una serie de proteínas transportadoras transmembrana (Sección 13.4).

Los electrones del NADH citoplasmático entran en las mitocondrias mediante lanzaderas

Una función de la cadena respiratoria es regenerar NAD^+ para su uso en la glicólisis. ¿Cómo se reoxida el NADH citoplasmático a NAD^+ en condiciones aeróbicas? El NADH no puede simplemente introducirse en las mitocondrias para oxidarse me-

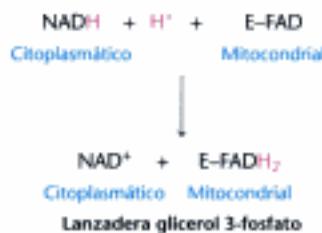
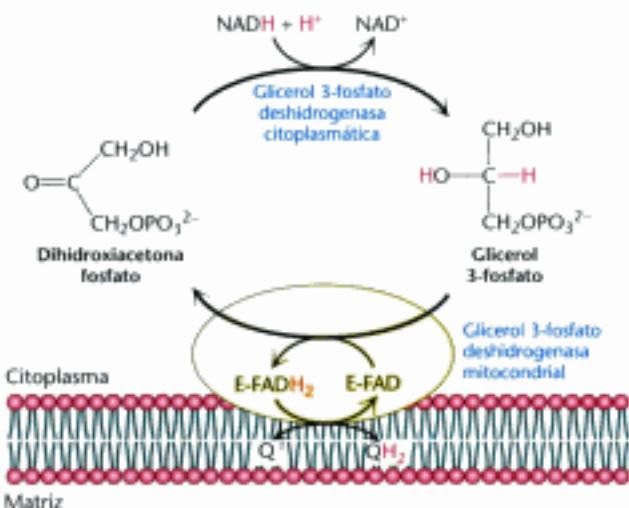


Figura 18.35 Lanzadera de glicerol 3-fosfato. Los electrones del NADH pueden introducirse en la cadena transportadora de electrones mitocondrial una vez que han sido utilizados para reducir la dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato. El glicerol 3-fosfato se reoxida al transferir sus electrones al grupo prostético FAD de una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa unida a la membrana. Posteriormente, la transferencia de los electrones a Q para formar QH₂ permite que estos electrones se introduzcan en la cadena transportadora de electrones.



diante la cadena transportadora de electrones porque la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH y al NAD⁺. La solución consiste en que sean *los electrones del NADH*, y no el propio NADH, quienes atraviesen la membrana mitocondrial. Una de las diversas maneras de conducir los electrones del NADH hacia la cadena transportadora de electrones es la *lanzadera de glicerol 3-fosfato* (Figura 18.35). El primer paso en esta lanzadera consiste en la transferencia de un par de electrones desde el NADH a la dihidroxiacetona fosfato, un intermediario de la glicolisis, para formar glicerol 3-fosfato. Esta reacción está catalizada por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa del citoplasma. El glicerol 3-fosfato se reoxida a dihidroxiacetona fosfato en la cara externa de la membrana interna mitocondrial mediante un isoenzima de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa unido a membrana. Un par de electrones del glicerol 3-fosfato se transfieren al grupo prostético FAD de este enzima para formar FADH₂. Esta reacción también regenera la dihidroxiacetona fosfato.

La flavina reducida transfiere sus electrones al transportador de electrones Q, que se incorpora a la cadena respiratoria en forma de QH₂. *Cuando la cadena respiratoria oxida el NADH citoplasmático transportado por la lanzadera de glicerol 3-fosfato se forman 1.5 ATP, en vez de 2.5.* El rendimiento es menor porque en la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial el aceptor de electrones es el FAD en lugar del NAD⁺. La utilización del FAD permite que los electrones del NADH citosólico sean transportados hacia las mitocondrias en contra de un gradiente de concentración de NADH. El costo de este transporte es de una molécula de ATP por cada dos electrones. La lanzadera de glicerol 3-fosfato es especialmente abundante en músculo, lo que permite que se pueda efectuar la fosforilación oxidativa a una velocidad muy alta. De hecho, algunos insectos carecen de la lactato deshidrogenasa y dependen por completo de la lanzadera de glicerol 3-fosfato para regenerar el NAD⁺ citoplasmático.

En corazón e hígado, los electrones del NADH citosólico entran en las mitocondrias por medio de la *lanzadera malato-aspartato*, en la que intervienen dos transportadores de membrana y cuatro enzimas (Figura 18.36). Los electrones se transfieren desde el NADH del citoplasma al oxalacetato, formando malato, que atraviesa la membrana interna mitocondrial intercambiándose por α-cetoglutarato para posteriormente reoxidarse por el NAD⁺ de la matriz y generar NADH en una reacción catalizada por el enzima del ciclo del ácido cítrico malato deshidrogenasa. El oxalacetato resultante no puede atravesar directamente la membrana interna mitocondrial, por lo que se necesita una reacción de transaminación (p. 656) para formar aspartato, que sí puede ser transportado hacia el lado citoplasmático intercambiándose por glutamato. El glutamato cede un grupo amino al oxalacetato, formando aspartato y α-cetoglutarato. En el citoplasma, el aspartato se desamina y origina oxalacetato, con lo que el ciclo comienza de nuevo.



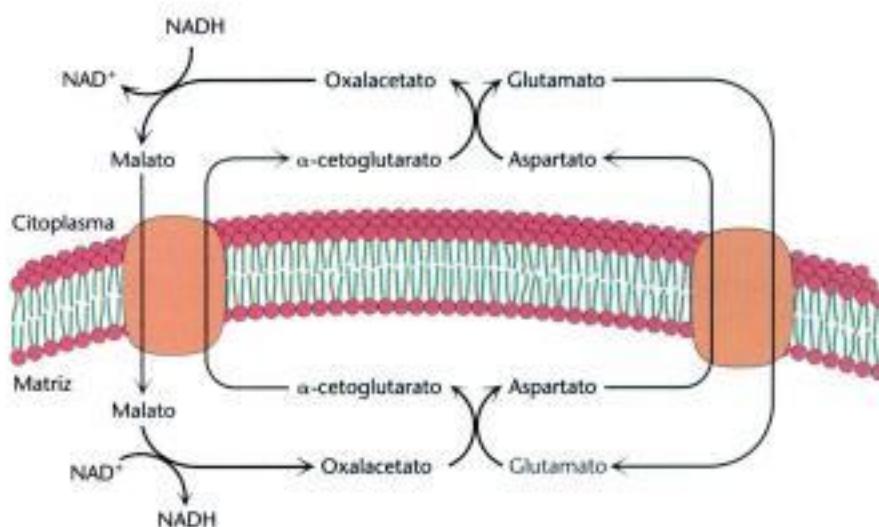


Figura 18.36 Lanzadera malato-aspartato.

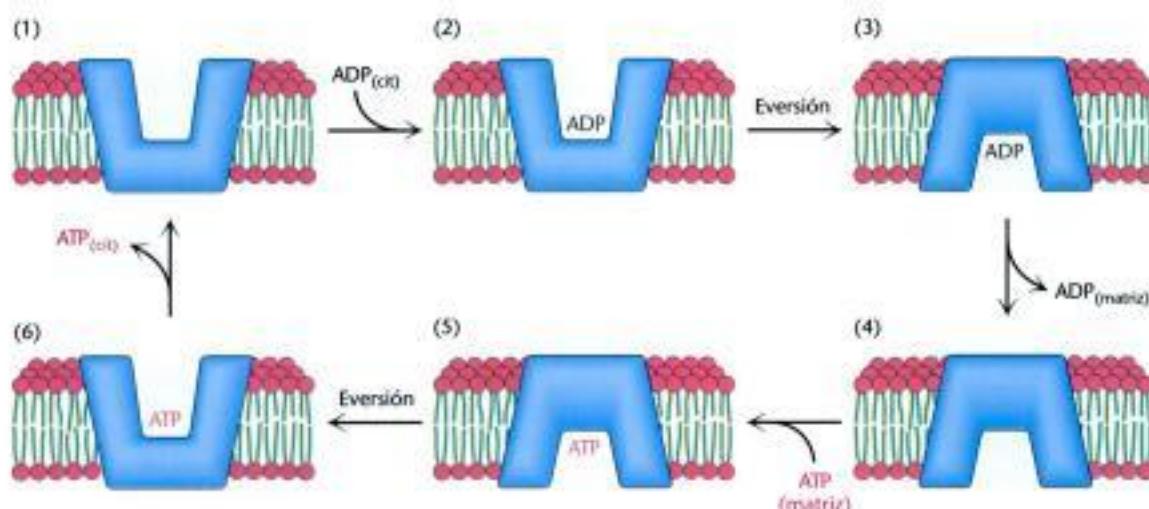
La entrada del ADP en las mitocondrias está acoplada a la salida del ATP por medio de la ATP-ADP translocasa

La principal función de la fosforilación oxidativa es generar ATP a partir de ADP. Sin embargo, el ATP y el ADP no difunden libremente a través de la membrana interna mitocondrial. ¿Cómo atraviesan estas moléculas tan cargadas la membrana interna para llegar al citoplasma? Una proteína transportadora específica, la *ATP-ADP translocasa* permite que estas moléculas atraviesen la barrera de permeabilidad. Y lo que es más importante, los flujos de ATP y ADP están acoplados. *El ADP entra en la matriz mitocondrial sólo si el ATP sale, y viceversa.* La reacción está catalizada por la translocasa, un antiorte:



La ATP-ADP translocasa es muy abundante, representando aproximadamente el 15% del contenido proteico de la membrana interna mitocondrial. La abundancia es una manifestación del hecho de que el ser humano intercambia el equivalente de su peso en ATP cada día. La translocasa, de 30 kd, contiene un único centro de unión a nucleótido que se orienta alternativamente hacia el lado de la matriz y hacia el lado citoplasmático de la membrana (Figura 18.37). El ATP y el ADP se unen a la translocasa sin Mg^{2+} , teniendo el ATP una carga negativa más que el ADP. Así, en una

Figura 18.37 Mecanismo de la ATP-ADP translocasa mitocondrial. La translocasa cataliza la entrada en la matriz del ADP acoplada a la salida del ATP (1) desde el citoplasma favorece la eversión del transportador (2) para liberar el ADP en la matriz (3). La unión siguiente de ATP de la matriz a la forma evertida (4) favorece la re-eversión a la conformación original (5) liberando ATP en el citoplasma (6).



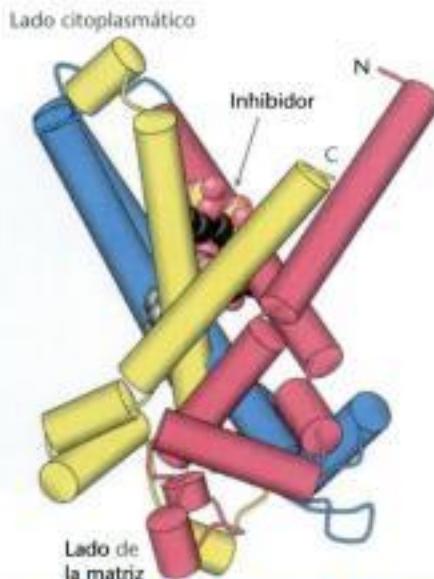


Figura 18.38 Estructura de los transportadores mitocondriales. Se muestra la estructura de la ADP-ATP translocasa. Nótese que esta estructura está compuesta por tres unidades similares (en rojo, azul y amarillo) que se juntan para formar un centro de unión, aquí ocupado por un inhibidor del transportador. Otros miembros de la familia de transportadores mitocondriales adoptan estructuras tripartitas similares. [Tomado de 10KC.pdb.]

mitocondria respirando activamente con un potencial de membrana positivo, están favorecidos el transporte de ATP fuera de la matriz mitocondrial y el transporte de ADP dentro de la matriz. Este intercambio ATP-ADP es energéticamente costoso; aproximadamente una cuarta parte del rendimiento energético de la transferencia electrónica por la cadena respiratoria se consume para regenerar el potencial de membrana que se pierde en este proceso de intercambio. La inhibición de este proceso también provoca la inmediata inhibición de la respiración celular (p. 534).

Los transportadores mitocondriales de metabolitos tienen una estructura tripartita común

El examen de la secuencia de aminoácidos de la ATP-ADP translocasa reveló que esta proteína consiste en tres repeticiones conjuntas de un módulo de 100 aminoácidos, cada uno de los cuales parece tener dos segmentos transmembrana. Esta estructura tripartita se ha confirmado recientemente tras la determinación de la estructura tridimensional de este transportador (Figura 18.38). Las hélices transmembrana forman una estructura como de tienda india con el lugar de unión a nucleótido (marcado por un inhibidor unido) ubicado en el centro. Cada una de las tres repeticiones adopta una estructura similar.

La ATP-ADP translocasa es uno de los muchos transportadores de iones o de metabolitos cargados que se encuentran en las mitocondrias (Figura 18.39). El *transportador de fosfato*, que actúa de manera coordinada con la ATP-ADP translocasa, interviene en el intercambio eléctricamente neutro de $H_2PO_4^-$ por OH^- . La acción conjunta de estos dos transportadores produce el intercambio de ADP y P_i citoplasmáticos por ATP de la matriz, a costa de la entrada de un H^+ (debido al transporte de un OH^- fuera de la matriz). Estos dos transportadores, que proveen a la ATP sintasa con sus sustratos, están asociados con la sintasa para formar un gran complejo llamado *ATP sintatosoma*.

Otros transportadores homólogos están también presentes en la membrana interna mitocondrial. El transportador de compuestos dicarboxílicos posibilita que el malato, el succinato y el fumarato se exporten de la matriz mitocondrial a cambio de P_i . El transportador de tricarboxilatos intercambia citrato y H^+ a cambio de malato. El piruvato del citoplasma entra en la matriz mitocondrial a cambio de OH^- por medio del transportador de piruvato. En total, el genoma humano codifica a más de 40 de estos transportadores.

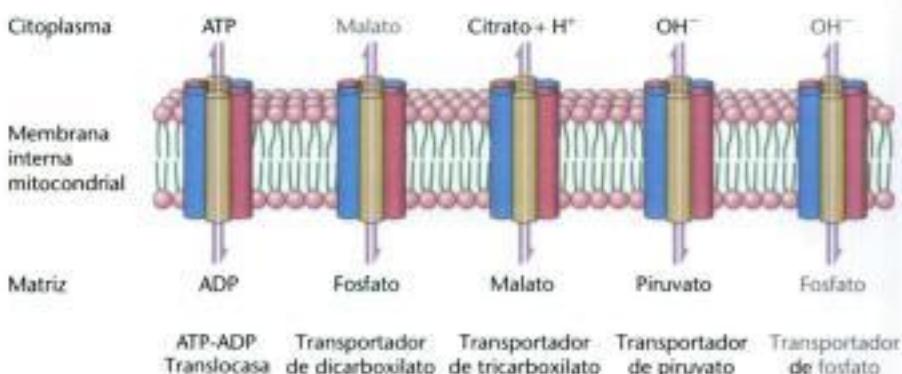


Figura 18.39 Transportadores mitocondriales. Los transportadores (también llamados carriers) son proteínas transmembrana que transportan iones específicos y metabolitos cargados a través de la membrana mitocondrial interna.

18.6 La regulación de la respiración celular está gobernada en primera instancia por la necesidad de ATP

Como el ATP es el producto final de la respiración celular, las necesidades celulares de ATP son el determinante final de la velocidad de las vías respiratorias y sus componentes.

La oxidación completa de la glucosa origina aproximadamente 30 moléculas de ATP

Se puede calcular cuántas moléculas de ATP se forman durante la oxidación completa de la glucosa a CO_2 . El número de moléculas de ATP (o GTP) que se forman durante la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico se conoce con certeza porque está determinado por la estequiometría de las reacciones químicas. Por el contrario, la producción de ATP en la fosforilación oxidativa es más ambigua debido a que las estequiometrías de los procesos de bombeo de protones, síntesis de ATP y transporte de metabolitos no tienen por qué corresponder a números enteros o incluso tener unos valores fijos. Como ya se vio anteriormente, en la actualidad, las mejores estimaciones sobre el número de protones bombeados por par de electrones hacia el exterior de la matriz por la NADH-Q oxidoreductasa, Q-citocromo c oxidoreductasa y citocromo c oxidasa son de cuatro, dos y cuatro respectivamente. La síntesis de una molécula de ATP está impulsada por el flujo de aproximadamente tres protones a través de la ATP sintasa. Un protón adicional se consume en el transporte del ATP de la matriz al citoplasma. Por tanto, como resultado del flujo de un par de electrones del NADH al O_2 se generan unas 2,5 moléculas de ATP citoplasmático. Para los electrones que se incorporan a nivel de la Q-citocromo c oxidoreductasa, como los que provienen de la oxidación del succinato o del NADH citoplasmático, el rendimiento es de aproximadamente 1,5 moléculas de ATP por par electrónico. Por lo tanto, tal y como se indica en la Tabla 18.4, cuando la glucosa se oxida por completo a CO_2 se forman aproximadamente 30 mo-

TABLA 18.4 Rendimiento de ATP a partir de la oxidación completa de la glucosa

Secuencia de reacciones	ATP producido por molécula de glucosa
Glicólisis: Conversión de glucosa en piruvato (en el citoplasma)	
Fosforilación de la glucosa	- 1
Fosforilación de la fructosa 6-fosfato	- 1
Desfosforilación de 2 moléculas de 1,3-BPG	+ 2
Desfosforilación de 2 moléculas de fosfoenolpiruvato	+ 2
Se forman 2 moléculas de NADH durante la oxidación de 2 moléculas de glicerolaldehido 3-fosfato	
Conversión de piruvato en acetil-CoA (en el interior de la mitocondria)	
Se forman 2 moléculas de NADH	
Ciclo del ácido cítrico (en el interior de la mitocondria)	
Se forman 2 moléculas de guanosina trifosfato a partir de 2 moléculas de succinil-CoA	+ 2
Se forman 6 moléculas de NADH durante la oxidación de 2 moléculas de isocitrato, 2 de α -cetoglutarato y 2 de malato	
Se forman 2 moléculas de FADH ₂ durante la oxidación de 2 moléculas de succinato	
Fosforilación oxidativa (en el interior de la mitocondria)	
2 moléculas de NADH formadas en la glicólisis producen, cada una, 1,5 moléculas de ATP (suponiendo que lo haya transportado la lanzadera de glicerol 3-fosfato)	+ 3
2 moléculas de NADH formadas en la descarboxilación oxidativa del piruvato producen, cada una, 2,5 moléculas de ATP	+ 5
2 moléculas de FADH ₂ formadas en el ciclo del ácido cítrico producen, cada una, 1,5 moléculas de ATP	+ 3
6 moléculas de NADH formadas en el ciclo del ácido cítrico producen, cada una, 2,5 moléculas de ATP	+ 15
RENDIMIENTO NETO POR MOLÉCULA DE GLUCOSA	+ 30

Fuente: El rendimiento de ATP en la fosforilación oxidativa está basado en los valores que aparecen en P. C. Hinckley, M. A. Kumar, A. Reshetar y D. L. Harris, *Biochemistry* 30 (1991):3576.

Nota: El valor actual de 30 moléculas de ATP por molécula de glucosa reemplaza al valor anterior de 36 moléculas de ATP. Debemos considerar que las estequiometrías del bombeo de protones, la síntesis de ATP y el transporte de metabolitos son sólo aproximaciones. Cuando se utiliza la lanzadera aspartato-malato en lugar de la lanzadera de glicerol 3-fosfato, se forman, aproximadamente, dos moléculas más de ATP por molécula de glucosa oxidada.

léculas de ATP; este valor reemplaza el cálculo tradicional de 36 ATP. La mayor parte del ATP, 26 de las 30 moléculas que se forman, se generan por la fosforilación oxidativa. Recordemos que el metabolismo anaerobio de la glucosa produce únicamente 2 moléculas de ATP. La eficiencia de la respiración celular se manifiesta en el hecho de que uno de los efectos del ejercicio de resistencia, una práctica que demanda mucho ATP en un periodo de tiempo prolongado, es incrementar el número de mitocondrias y vasos sanguíneos en el músculo y por consiguiente incrementar el límite de generación de ATP por fosforilación oxidativa.

La velocidad de la fosforilación oxidativa está determinada por las necesidades de ATP

¿Cómo se regula la velocidad de la cadena transportadora de electrones? En las condiciones fisiológicas más habituales, el transporte de electrones se encuentra íntimamente ligado a la fosforilación. *Los electrones no suelen desplazarse a lo largo de la cadena transportadora de electrones hasta el O₂ a menos que al mismo tiempo el ADP se fosfore para formar ATP*. Cuando la concentración de ADP aumenta, como ocurre en el músculo activo, la velocidad de la fosforilación oxidativa se incrementa para cubrir las necesidades de ATP del músculo. La regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa por el nivel de ADP se conoce como *control respiratorio* o *control por medio del acceptor*. Experimentos en mitocondrias aisladas demuestran la importancia del nivel de ADP (Figura 18.40). La velocidad de consumo de oxígeno por la mitocondria se incrementa notablemente cuando se añade ADP y vuelve a sus valores iniciales cuando el ADP añadido se ha convertido en ATP.



Figura 18.40 Control respiratorio. Los electrones se transfieren hasta el O₂ sólo si al mismo tiempo el ADP se fosforila a ATP.

El nivel de ADP afecta igualmente a la velocidad del ciclo del ácido cítrico. A concentraciones bajas de ADP, como en un músculo en reposo, el NADH y el FADH₂ no se consumen por la cadena transportadora de electrones. El ciclo del ácido cítrico se hace más lento porque hay menos NAD⁺ y FAD para alimentar el ciclo. Cuando el nivel de ADP sube y la fosforilación oxidativa se acelera, el NADH y el FADH₂ se oxidan y el ciclo se vuelve más activo. *Los electrones no fluyen desde los combustibles hasta el O₂ a menos que se necesite sintetizar ATP*. Aquí se ve otro ejemplo de la importancia reguladora de la carga energética (Figura 18.41).

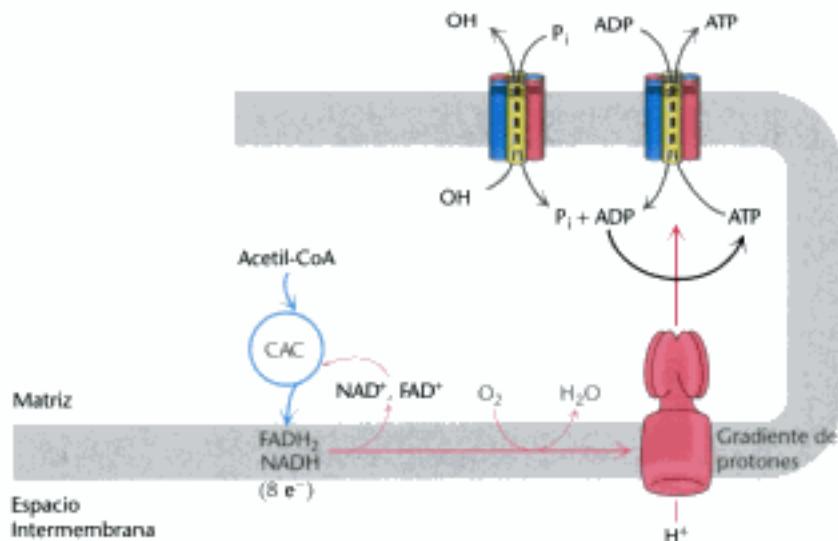


Figura 18.41 La carga energética regula el uso de los combustibles. La síntesis de ATP a partir de ADP y Pi controla el flujo de electrones desde el NADH y el FADH₂ hasta el oxígeno. La disponibilidad de NAD⁺ y FAD a su vez controla la velocidad del ciclo del ácido cítrico (CAC).

El desacoplamiento regulado provoca la generación de calor

Algunos organismos poseen la capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP para generar calor. Este desacoplamiento es una forma de mantener la temperatura corporal en animales que hibernan, en algunos animales recién nacidos (incluyendo a los seres humanos) y en mamíferos adaptados al frío. La col

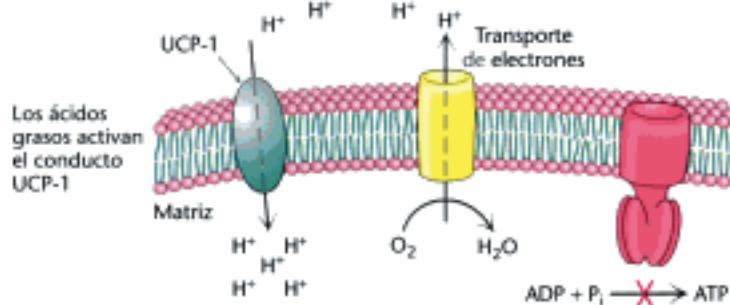


Figura 18.42 Acción de una proteína desacoplante. La proteína desacoplante (UCP-1) genera calor permitiendo la entrada de protones en la mitocondria sin síntesis de ATP.

fétida utiliza un mecanismo análogo para calentar sus brotes florales al principio de la primavera, con lo que aumenta la evaporación de moléculas olorosas que atraen a los insectos para fertilizar sus flores. En animales, la *grasa parda* (tejido adiposo pardo) es un tejido especializado en este proceso de *termogénesis sin tiritar*. El tejido adiposo pardo es muy rico en mitocondrias, a las que a menudo se les conoce como *mitocondrias de la grasa parda*. El tejido aparece pardo por la combinación de los citocromos, de color verdoso, de las numerosas mitocondrias y la hemoglobina, roja, presente en el importante suministro de sangre, que ayuda a distribuir el calor por el cuerpo. La membrana interna mitocondrial de estas mitocondrias contiene una cantidad grande de *proteína desacoplante* (UCP-1), o termogenina, un dímero de subunidades de 33 kd que se parece a la ATP-ADP translocasa. La UCP-1 establece una vía para el flujo de protones desde el citoplasma hacia la matriz. En pocas palabras, *UCP-1 genera calor cortocircuitando la pila protónica de las mitocondrias*. La energía del gradiente de protones, normalmente captada como ATP, se libera como calor cuando los protones fluyen a través de la UCP-1 hacia la matriz mitocondrial. Esta vía disipadora de protones se activa cuando la temperatura corporal empieza a descender. En respuesta a una caída en temperatura, la secreción de hormonas lleva a la liberación de ácidos grasos libres desde los triglicéridos que a su vez activan la termogenina (18.42).

Además de la UCP-1, se han descubierto otras dos proteínas desacoplantes.

La UCP-2, cuya secuencia es idéntica a la de UCP-1 en un 56%, se ha encontrado en una amplia gama de tejidos. La UCP-3 (idéntica en un 57% a UCP-1 y en un 73% a UCP-2) se localiza en el músculo esquelético y en la grasa parda. Esta familia de proteínas desacoplantes, especialmente UCP-2 y UCP-3, pueden desempeñar un papel en la homeostasis energética. De hecho, en ratones y en humanos, los genes de UCP-2 y UCP-3 se encuentran en regiones del cromosoma que se han relacionado con la obesidad, lo que refuerza la idea de que podrían representar una forma de regulación del peso corporal.

La fosforilación oxidativa se puede inhibir en muchos de sus pasos

Muchos potentes y letales venenos actúan inhibiendo la fosforilación oxidativa en uno de los siguientes puntos de acción

1. *Inhibición de la cadena transportadora de electrones.* La *rotenona*, que se usa como un veneno para peces e insectos, y el *amital*, un sedante barbitúrico, bloquean la transferencia de los electrones en la NADH-Q oxidoreductasa y por tanto, impiden la utilización del NADH como sustrato (Figura 18.43). Por el contrario, el flujo de electrones procedentes de la oxidación del succinato no se ve afectado puesto que estos electrones se incorporan en el QH₂, más allá de la zona bloqueada. La *antimicina A* interrumpe el flujo de electrones a la altura del citocromo b_H en la Q-citocromo c oxidoreductasa. Además, el flujo de electrones en la citocromo c oxidasa se puede bloquear por *cianuro* (CN⁻), *azida* (N³⁻) y *monóxido de carbono* (CO). El cianuro y la azida reaccionan con la forma férica del hemo a₃, mientras que el monóxido de carbono inhibe la forma ferrosa. La inhibición de la cadena transportadora de electrones también inhibe la síntesis de ATP porque no puede producirse la fuerza protón-motriz.

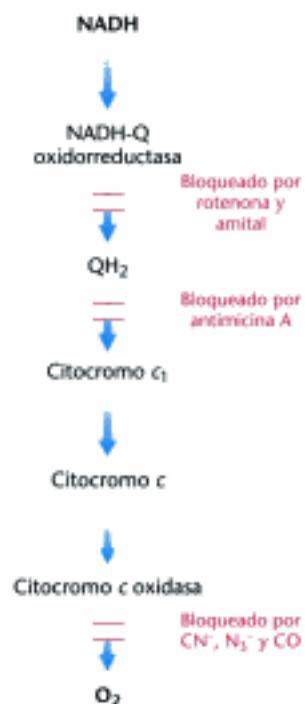
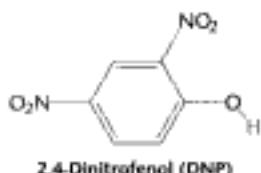


Figura 18.43 Lugares de actuación de algunos inhibidores del transporte electrónico.



2. Inhibición de la ATP sintasa. La oligomicina, un antibiótico utilizado como agente antifúngico y la diciclohexilcarbodiimida (DCCD; p. 91) evitan la entrada de protones a través de la ATP sintasa. Si a las mitocondrias que respiran de forma activa se les pone en presencia de inhibidor de la ATP sintasa, la cadena transportadora de electrones deja de funcionar. Esta observación demuestra con claridad que, normalmente, el transporte de electrones y la síntesis de ATP están íntimamente relacionados.

3. Desacoplamiento del transporte electrónico de la síntesis de ATP. El íntimo acoplamiento entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias se puede desacoplar mediante el 2,4-dinitrofenol y otros compuestos ácidos aromáticos. Estas sustancias transportan protones a través de la membrana interna mitocondrial, a favor de su gradiente de concentración. En presencia de estos desacoplantes, el transporte de electrones desde el NADH al O₂ procede de forma normal, pero no se forma ATP mediante la ATP sintasa mitocondrial porque la fuerza protón-motriz que se establece a través de la membrana mitocondrial interna se disipa continuamente. Esta pérdida del control respiratorio provoca un aumento del consumo de O₂ y de la oxidación del NADH. De hecho, durante la ingestión accidental de desacoplantes se consumen grandes cantidades de combustible metabólico, pero no se almacena energía en forma de ATP. En cambio, la energía se libera en forma de calor. El DNP es el ingrediente activo en algunos herbicidas y fungicidas. Incrediblemente, hay gente que consume DNP como un fármaco para perder peso, a pesar de que el FDA prohibió su uso en 1938. También hay informes de que a los soldados soviéticos se les administró DNP para mantener su temperatura durante los largos inviernos rusos. Los desacoplantes químicos son homólogos, no fisiológicos y no regulados de las proteínas desacoplantes.

4. Inhibición de la exportación del ATP. La ATP-ADP translocasa se inhibe de forma específica por concentraciones muy pequeñas de *actractilósido* (un glicosídeo vegetal) o el *ácido bongréquico* (un antibiótico obtenido de un moho). El atractilósido se une a la translocasa cuando su centro de unión a nucleótidos se orienta hacia el citoplasma, mientras que el ácido bongréquico se une cuando este centro está orientado hacia la matriz mitocondrial. La fosforilación oxidativa se detiene poco después de añadir cualquiera de estos inhibidores, lo que demuestra que la ATP-ADP translocasa es esencial para mantener cantidades adecuadas de ADP que acepten la energía asociada con la fuerza protón-motriz.

Se están descubriendo enfermedades mitocondriales



El número de enfermedades que se pueden atribuir a mutaciones mitocondriales aumenta continuamente, al mismo ritmo que aumentan nuestros conocimientos sobre la bioquímica y la genética de las mitocondrias. La frecuencia de las enfermedades mitocondriales se estima que es de 10 a 15 por 100 000 personas, aproximadamente equivalente a la frecuencia de las distrofias musculares. La primera enfermedad mitocondrial conocida fue la *neuropatía óptica hereditaria de Leber* (LHON, “Leber hereditary optic neuropathy”), un tipo de ceguera que se produce en la madurez como resultado de mutaciones en el Complejo I. Algunas de estas mutaciones impiden la utilización del NADH, mientras que otras bloquean la transferencia de electrones hacia Q. La acumulación de mutaciones en los genes mitocondriales a lo largo de varias décadas puede contribuir al envejecimiento, desórdenes degenerativos y cáncer.

Un óvulo humano alberga varios cientos de miles de moléculas de DNA mitocondrial, mientras que un espermatozoide aporta únicamente unos pocos centenares, de modo que afectan muy poco al genotipo mitocondrial. Dado que el número de mitocondrias heredadas de la madre es muy grande y que no todas las mitocondrias se pueden ver afectadas, las patologías asociadas a mutaciones mitocondriales pueden ser muy complejas. Incluso en una única familia portadora de una misma mutación, fluctuaciones al azar en el porcentaje de mitocondrias mutadas dan lugar a una gran diversidad tanto en la naturaleza y gravedad de los síntomas asociados a la patología como en el periodo de tiempo en el que aparecen. A medida que aumenta el número de mitocon-

drias defectuosas disminuye la capacidad de generar energía hasta llegar a un punto en el cual la célula ya no puede funcionar correctamente. Los fallos en la respiración celular son peligrosos por partida doble. No sólo disminuye la transducción de energía sino que la probabilidad de que se generen especies reactivas del oxígeno aumenta. Los órganos que dependen especialmente de la fosforilación oxidativa, como el sistema nervioso y el corazón, son los más sensibles a mutaciones del DNA mitocondrial.

Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la apoptosis

En el transcurso del desarrollo o en casos de graves daños celulares, células individuales pertenecientes a un organismo multicelular pueden experimentar la muerte celular programada o apoptosis. Las mitocondrias funcionan como centros de control que regulan este proceso. Aunque todavía no se han establecido los detalles, en las mitocondrias dañadas se forma un poro que recibe el nombre de poro de transición de la permeabilidad de las mitocondrias (mtPTP). Aparentemente, este poro está formado por VDAC (el translocador de nucleótidos de adenina) y varias otras proteínas mitocondriales, entre las que se incluyen miembros de una familia (familia Bcl) que fue descubierta, en principio, por su participación en el cáncer. Uno de los activadores más potentes de la apoptosis es el citocromo c. Su presencia en el citoplasma activa toda una cascada de enzimas proteolíticos llamados caspasas, miembros de la familia de las cisteinoproteasas (p. 251). El citocromo c, junto con otras proteínas, inicia la cascada mediante la activación de la procaspasa 9 a caspasa 9, que posteriormente activa otras caspasas. Cada tipo de caspasas destruye una diana particular como las proteínas que mantienen la estructura de la célula. Otra diana es la proteína que inhibe a un enzima que destruye el DNA (DNasea activada por caspasa, CAD) liberando CAD que destruye el material genético. Esta cascada de enzimas proteolíticas recibe el nombre de "muerte por multitud de pequeños cortes".

La transmisión de energía mediante gradientes de protones es un concepto clave en la Bioenergética

El concepto más importante que se ha presentado en este capítulo es que la transferencia mitocondrial de electrones y la síntesis de ATP están relacionadas mediante un gradiente de protones transmembrana. La síntesis de ATP en bacterias y cloroplastos está también impulsada por gradientes de protones. De hecho, los gradientes de protones impulsan diversos procesos que requieren energía tales como el transporte activo de iones calcio en mitocondrias, la entrada de algunos aminoácidos y azúcares en bacterias, la rotación de los flagelos bacterianos y la transferencia de electrones desde el NADP⁺ hasta el NADPH. Los gradientes de protones también pueden utilizarse para generar calor, como durante la hibernación. Resulta evidente que en los sistemas biológicos, los gradientes de protones constituyen la principal divisa interconvertible de energía libre (Figura 18.44). Mitchell se dio cuenta de que la fuerza protón-motriz es una forma maravillosamente sencilla y eficaz de almacenar energía libre porque sólo requiere una fina membrana lipídica cerrada que separe dos fases acuosas.

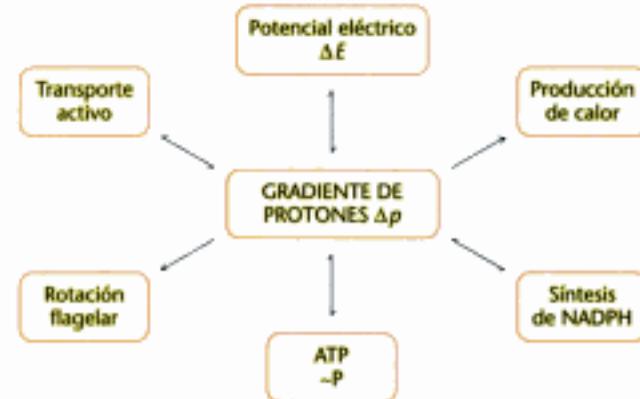


Figura 18.44 El gradiente de protones es una forma interconvertible de energía libre.

Resumen

18.1 La fosforilación oxidativa en eucariotas tiene lugar en las mitocondrias

Las mitocondrias generan la mayor parte del ATP que necesitan las células aeróbicas mediante la acción combinada de las reacciones del ciclo del ácido cítrico, que tienen lugar en la matriz mitocondrial, y la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Las mitocondrias son descendientes de bacterias de vida libre que establecieron una relación de simbiosis con otra célula.

18.2 La fosforilación oxidativa depende del transporte electrónico

En la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP está acoplada al flujo de electrones desde el NADH o el FADH₂ hasta el O₂ mediante un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. El flujo de electrones a través de los tres complejos transmembrana orientados asimétricamente da lugar al bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial y a la generación de un potencial de membrana. El ATP se sintetiza cuando los protones regresan hacia la matriz a través del conducto del complejo sintetizador de ATP, denominado ATP sintasa (también conocido como F₀F₁-ATPasa). La fosforilación oxidativa es un claro exponente de un aspecto fundamental de la bioenergética: la transmisión de energía libre mediante gradientes de protones.

18.3 La cadena respiratoria está formada por cuatro complejos: tres bombas de protones y una conexión física con el ciclo del ácido cítrico

Los transportadores de electrones del entramado respiratorio de la membrana interna mitocondrial son quinonas, flavinas, complejos hierro–azufre, los grupos hemo de los citocromos y los iones cobre. Los electrones del NADH se transfieren al grupo prostético FMN de la NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I), el primero de los cuatro complejos. Esta oxidoreductasa también contiene centros Fe-S. Los electrones van a parar a QH₂, la forma reducida de la ubiquinona (Q). La succinato deshidrogenasa, un enzima del ciclo del ácido cítrico, forma parte del complejo succinato-Q reductasa (Complejo II), que transfiere electrones del FADH₂ a Q para formar QH₂. Este transportador hidrofóbico de gran movilidad cede sus electrones a Q-citocromo *c* oxidoreductasa (Complejo III), un complejo que contiene los citocromos *b* y *c₁* así como un centro Fe-S. Este complejo reduce al citocromo *c*, una proteína periférica de la membrana y soluble en agua. El citocromo *c*, al igual que Q, es un transportador de electrones móvil, que los transfiere posteriormente a la citocromo *c* oxidasa (Complejo IV). Este complejo contiene los citocromos *a* y *a₃*, así como tres iones cobre. Un ion hierro del grupo hemo y un ion cobre de esta oxidasa transfieren electrones al O₂, el acceptor final, para formar H₂O.

18.4 Un gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP

El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV provoca la transferencia de protones desde el lado de la matriz hacia el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna. Se genera una fuerza protón-motriz formada por un gradiente de pH (básico en el lado de la matriz) y un potencial de membrana (negativo en el lado de la matriz). El retorno de los protones hacia el lado de la matriz a través de la ATP sintasa da lugar a la síntesis de ATP. El complejo enzimático es un motor molecular formado por dos unidades operacionales: un componente rotatorio y un componente estático. La rotación de la subunidad γ provoca cambios estructurales en la subunidad β que dan como resultado la síntesis y liberación de ATP por parte del enzima. La entrada de los protones proporciona la fuerza para la rotación.

El flujo de dos electrones a través de NADH-Q oxidoreductasa, Q-citocromo *c* oxidoreductasa y citocromo *c* oxidasa genera un gradiente suficiente como para sintetizar 1, 0,5 y 1 moléculas de ATP, respectivamente. Por lo tanto, se generan 2,5 moléculas de ATP por cada molécula de NADH oxidada en la matriz mitocondrial, mientras que sólo se generan 1,5 moléculas de ATP por cada molécula de FADH₂ oxidada, puesto que sus electrones se incorporan a la cadena en forma de QH₂, después del primer centro de bombeo de protones.

18.5 Muchas lanzaderas permiten el movimiento a través de las membranas mitocondriales

Las mitocondrias utilizan una batería de transportadores para mover moléculas de un lado a otro de la membrana interna mitocondrial. Los electrones del

NADH citoplasmático se introducen en la mitocondria gracias a la lanzadera de glicerol fosfato, que genera FADH₂ a partir de FAD o por la lanzadera del malato-aspartato que forma NADH mitocondrial. La entrada del ADP a la matriz mitocondrial está acoplada a la salida del ATP mediante la ATP-ADP translocasa, un transportador impulsado por el potencial de membrana.

18.6 La regulación de la fosforilación oxidativa está gobernada en primera instancia por la necesidad de ATP

Aproximadamente 30 moléculas de ATP se generan cuando una molécula de glucosa se oxida por completo a CO₂ y H₂O. Por regla general, el transporte de electrones está intimamente relacionado con la fosforilación. El NADH y el FADH₂ solamente se oxidan si al mismo tiempo el ADP se fosforila a ATP, una forma de regulación que recibe el nombre de control respiratorio o control por medio del aceptor. Los desacoplantes como el DNP pueden romper este acoplamiento; disipan el gradiente de protones mediante el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

Términos clave

fosforilación oxidativa (p. 502)	succinato-Q reductasa (Complejo II) (p. 512)	lanzadera glicerol 3-fosfato (p. 528)
fuerza protón-motriz (p. 503)	Q-citocromo c oxidoreductasa (Complejo III) (p. 512)	lanzadera malato-aspartato (p. 528)
respiración celular (p. 503)	citocromo c (cit c) (p. 512)	ATP-ADP translocasa (translocasa de nucleótidos de adenina, ANT) (p. 529)
cadena transportadora de electrones (p. 506)	centro de Rieske (p. 513)	control respiratorio (por medio del aceptor) (p. 532)
potencial de reducción (redox, oxidación-reducción, E'_0) (p. 506)	ciclo Q (p. 513)	proteína desacoplante (UCP) (p. 533)
coenzima Q (Q, ubiqueína) (p. 510)	citocromo c oxidasa (Complejo IV) (p. 514)	muerte celular programada (apoptosis) (p. 535)
reserva Q (p. 510)	superóxido dismutasa (p. 518)	caspasa (p. 535)
NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I) (p. 510)	catalasa (p. 518)	
flavín-mononucleótido (FMN) (p. 510)	región invertida (p. 519)	
proteína hierro-azufre (hierro no hemo) (p. 511)	ATP-sintasa (Complejo V, F ₁ F ₀ -ATPasa) (p. 521)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Gray, M. W., Burger, G. y Lang, B. F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476–1481.
 Wallace, D. C., 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* 277(2):40–47.
 Saraste, M., 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488–1493.
 Shultz, B. E. y Chan, S. I., 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23–65.
 Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. y Dumon, P. L., 1992. Nature of biological electron transfer. *Nature* 355:796–802.

Libros

- Scheffler, I. E., 1999. *Mitochondria*. Wiley.
 Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J., 1997. *Bioenergetics 2*. Academic Press.

Cadena de transporte de electrones

- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. y Ral, Z. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121:1043–1057.
 Crofts, A. R. 2004. The cytochrome bc₁ complex: Function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66:689–733.

Bianchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P. y Lenaz, G. 2004. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supramolecular complex. *J. Biol. Chem.* 279:36562–36569.

Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., van den Heuvel, B., Smeitink, J. y Nijtmans, L., 2004. Human mitochondrial complex I assembles through a combination of evolutionary conserved modules: A framework to interpret complex I deficiencies. *Human Molecular Genetics* 13:2461–2472.

Yagi, T. y Matsumo-Yagi, A. 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: The secret unlocked. *Biochemistry* 42:2266–2274.

Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72:77–109.

Lange, C. y Hunte, C. 2002. Crystal structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with its bond substrate cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:2800–2805.

Zaslavsky, D. y Gennis, R. B., 2000. Proton pumping by cytochrome oxidase: Progress, problems and postulates. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:164–179.

Grigorieff, N., 1999. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:476–483.

Ackrell, B. A., 2000. Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett.* 466:1–5.

Grigorieff, N., 1998. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J. Mol. Biol.* 277:1033–1046.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

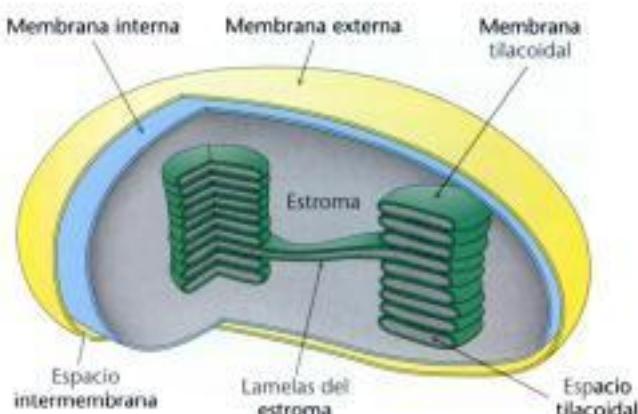


Figura 19.3 Esquema de un cloroplasto. [Tomado de S. L. Wolfe, *Biology of the Cell*, p. 130. © 1972 por Wadsworth Publishing Company, Inc. Adaptado con permiso del editor.]

talizada dentro de la mitocondria. De un modo similar, la fotosíntesis, la forma de transformar la energía luminosa en energía química, se realiza en unos orgánulos denominados *cloroplastos*, que normalmente tienen una longitud de 5 μm . A igual que la mitocondria, el cloroplasto presenta una membrana externa y otra interna, separadas por un espacio intermembrana (Figura 19.3). La membrana interna rodea al *estroma*, que es el lugar donde transcurren las reacciones orgánicas de la fotosíntesis (Sección 20.1). En el estroma se encuentran unas estructuras membranosas denominadas *tilacoides*, que tienen forma de sacos aplastados o discos. Los tilacoides se agrupan apilados formando un *grana*. Los diferentes grana están conectados por regiones de la membrana tilacoidal llamadas *lámicas del estroma*. Las membranas tilacoidales separan el espacio tilacoidal del espacio del estroma. Así pues, los cloroplastos tienen tres membranas diferentes (*externa, interna y tilacoidal*) y tres compartimentos separados (*intermembrana, estroma y espacio tilacoidal*). Se cree que los tilacoides se forman por invaginaciones de la membrana interna durante el desarrollo del cloroplasto, de un modo similar a la formación de las crestas mitocondriales. Al igual que las crestas mitocondriales, los tilacoides son el lugar donde tienen lugar las reacciones acopladas de oxidación-reducción que generan la fuerza protón-motriz.

Los procesos iniciales de la fotosíntesis tienen lugar en las membranas tilacoidales

Las membranas tilacoidales contienen la maquinaria transductora de energía: las proteínas captadoras de luz, los centros de reacción, las cadenas de transporte de electrones y la ATP sintasa. Estas membranas contienen casi igual cantidad de lípidos que de proteínas. La composición lipídica es muy característica: de los lípidos totales alrededor del 40% son *galactolípidos* y un 4% *sulfolípidos*, en tanto que los fosfolípidos son sólo el 10%. La membrana tilacoidal y la membrana interna, al igual que la membrana interna de la mitocondria, son impermeables a la mayoría de las moléculas e iones. En cambio, la membrana externa del cloroplasto, al igual que la externa mitocondrial, es muy permeable a moléculas pequeñas e iones. El estroma contiene los enzimas solubles que utilizan el NADPH y el ATP sintetizados por los tilacoides para transformar el CO₂ en azúcar. Las células de las hojas de las plantas, dependiendo de la especie, tipo de célula y estado de desarrollo, contienen entre 1 y 100 cloroplastos.

Los cloroplastos aparecieron en un proceso endosimbiótico

Los cloroplastos contienen su propio DNA y la maquinaria necesaria para su replicación y expresión. Sin embargo, los cloroplastos no son autónomos: también contienen muchas proteínas codificadas por el DNA nuclear. ¿Cómo se desarrolló la estrecha relación entre la célula y sus cloroplastos? Actualmente se cree que, de un modo similar a la evolución de la mitocondria (p. 504), los cloroplastos son el re-

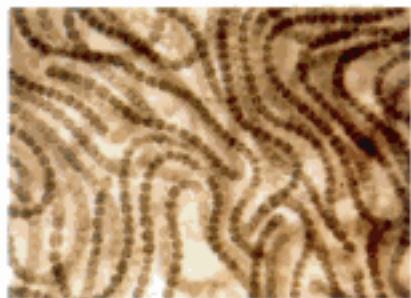


Figura 19.4 Cianobacterias. Una colonia de *Anabaena*, una cianobacteria filamentosa fotosintetizadora, vista con una amplificación de 450x. Los actuales cloroplastos se cree que evolucionaron a partir de los antepasados de esta bacteria. [James W. Richardson/Visuals Unlimited.]

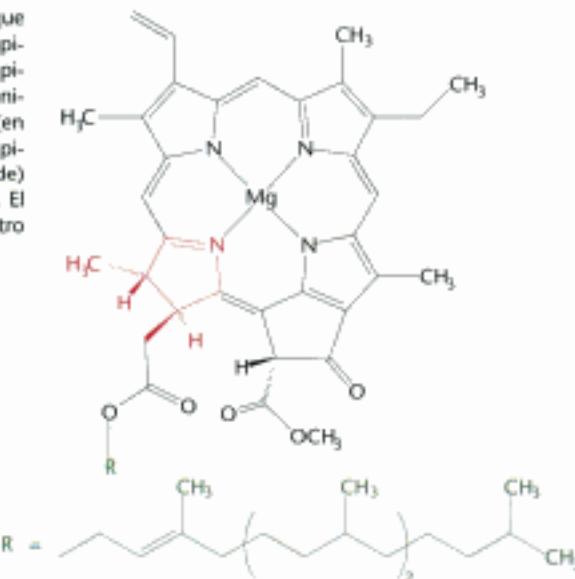
sultado de un proceso de endosimbiosis en el cual un microorganismo fotosintetizador posiblemente un antepasado de las cianobacterias (Figura 19.4), fue captado por un eucariota anfitrión por endocitosis. Las evidencias sugieren que los cloroplastos de las plantas superiores y algas verdes derivan de un único proceso endosimbiótico, en tanto que los cloroplastos de las algas rojas y pardas provienen de al menos otro suceso más.

El genoma del cloroplasto es menor que el de una cianobacteria; sin embargo, al igual que en éstas, es de forma circular con un único punto de iniciación para la replicación del DNA y sus genes están organizados en operones: secuencias de genes relacionados bajo un control común (Capítulo 31). En el transcurso de la evolución, muchos de los genes del predecesor del cloroplasto se han transferido al núcleo de la célula vegetal y, en algunos casos, han desaparecido totalmente, lo cual establece una relación de plena dependencia.

19.2 La absorción de la luz por la clorofila induce la transferencia de electrones

La captura de la energía de la luz es la clave de la fotosíntesis. El primer paso es la absorción de la luz por una molécula fotorreceptora. El principal fotorreceptor en los cloroplastos de la mayoría de las plantas verdes es la *clorofila a*, un tetrapirrol sustituido (Figura 19.5). Los cuatro átomos de nitrógeno de los pirroles están coordinados con un átomo de magnesio. A diferencia de las porfirinas tipo hemo, la clorofila presenta un anillo pirrol reducido y un anillo de 5 carbonos soldado a uno de los anillos pirrólidos. Otra característica diferenciadora de la clorofila es la presencia de *fitol*, un alcohol de 20 átomos de carbono muy hidrofóbico, esterificado en una cadena lateral acídica.

Figura 19.5 Clorofila. Al igual que el hemo, la clorofila a es un tetrapirrol cíclico. Uno de los anillos de pirrol (en rojo) está reducido y un anillo adicional de cinco carbonos (en azul) está soldado a uno de los pirroles. La cadena de fitol (en verde) se une mediante un enlace éster. El ion magnesio se enlaza en el centro de la estructura.



Las clorofilas son unos fotorreceptores muy eficaces porque contienen una red alternante de enlaces dobles y simples. Estos compuestos se denominan *polienos*. Tienen un poder de absorción muy fuerte en la región visible del espectro, en la zona en que la energía solar que llega a la Tierra es máxima (Figura 19.6). El valor máximo del coeficiente de extinción molar (ϵ) de la clorofila *a*, una medida de la capacidad de un compuesto para absorber la luz, es mayor que $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, encontrándose entre los más altos observados para los compuestos orgánicos.

¿Qué sucede cuando una molécula pigmento tal como la clorofila absorbe la luz? La energía de la luz excita un electrón desde su estado fundamental a un nivel ener-

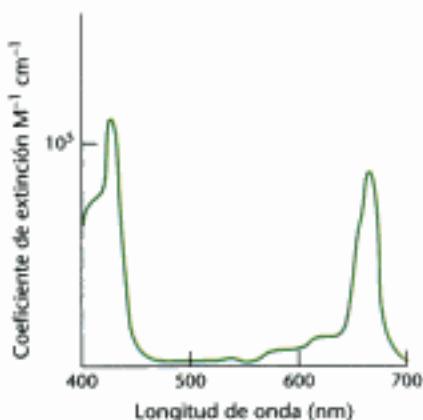


Figura 19.6 Absorción de la luz por la clorofila a. La clorofila a absorbe con eficacia la luz visible tal como se aprecia por su coeficiente de extinción próximo a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

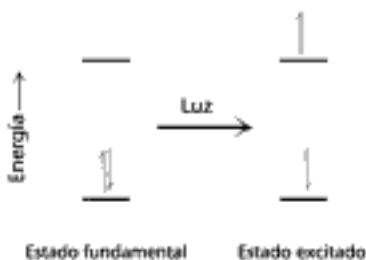


Figura 19.7 Absorción de la luz. La absorción de la luz provoca la excitación de un electrón que pasa de su estado fundamental a un nivel energético superior.

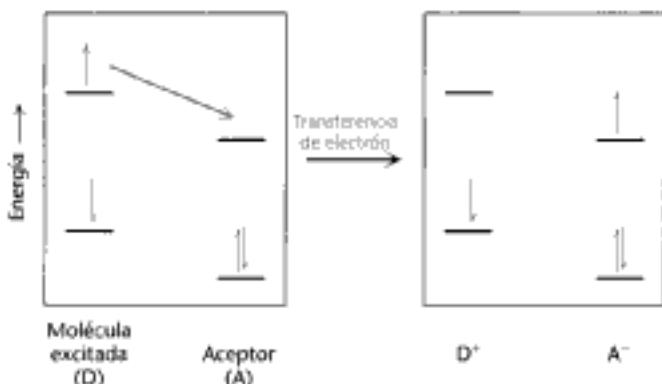


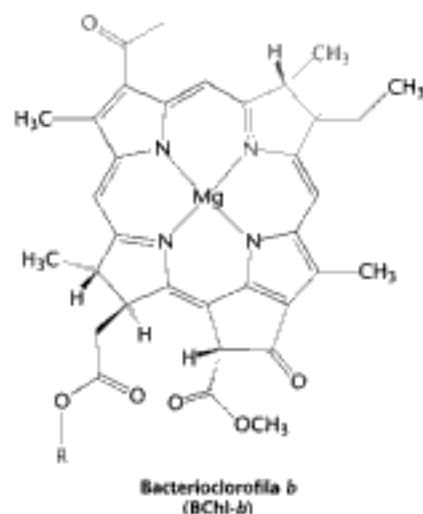
Figura 19.8 Separación de carga fotoinducida. Si está disponible el aceptor de electrones adecuado, un electrón que se encuentra en un nivel energético superior debido a la absorción de la luz puede ser transferido desde la molécula excitada al aceptor.

Un par especial de clorofilas inicia la separación de cargas

Las bacterias fotosintetizadoras tales como la *Rhodopseudomonas viridis* presentan un único centro de reacción fotosintético del que se conoce su estructura a nivel atómico. El centro de reacción bacteriano está formado por cuatro polipéptidos: las subunidades L (31 kd), M (36 kd) y H (28 kd) y C, un tipo de citocromo c con cuatro hemes tipo c (Figura 19.9). Los resultados de la comparación de secuencias obtenidas con los estudios estructurales a baja resolución para los fotosistemas I y II demuestran que el centro de reacción bacteriano es homólogo a los sistemas más complejos de las plantas. Así pues, las observaciones sobre el sistema bacteriano serán aplicables también a los sistemas de las plantas.

Las subunidades L y M constituyen el núcleo estructural y funcional del centro de reacción fotosintético bacteriano (ver Figura 19.9). Cada una de estas subunidades homólogas presenta cinco hélices transmembrana, a diferencia de la subunidad H, que sólo tiene una. La subunidad H se localiza del lado citoplasmático de la membrana y la subunidad citocromo en la cara externa de la membrana celular, llamada cara periplasmática, porque se sitúa en el periplasma, el espacio situado entre la membrana celular y la pared celular. A las subunidades L y M se asocian cuatro moléculas de bacterioclorofila b (BChl-b), dos moléculas de bacteriofotofitina b (BPh), dos quinonas (Q_A y Q_B) y un ion ferroso.

Las bacterioclorofilas son similares a las clorofilas, excepto que presentan un anillo pirrol adicional reducido y algunas otras diferencias menores que desplazan su absorción máxima hacia el infrarrojo cercano, a longitudes de onda próximas a los



Bacterioclorofila b
(BChl-b)

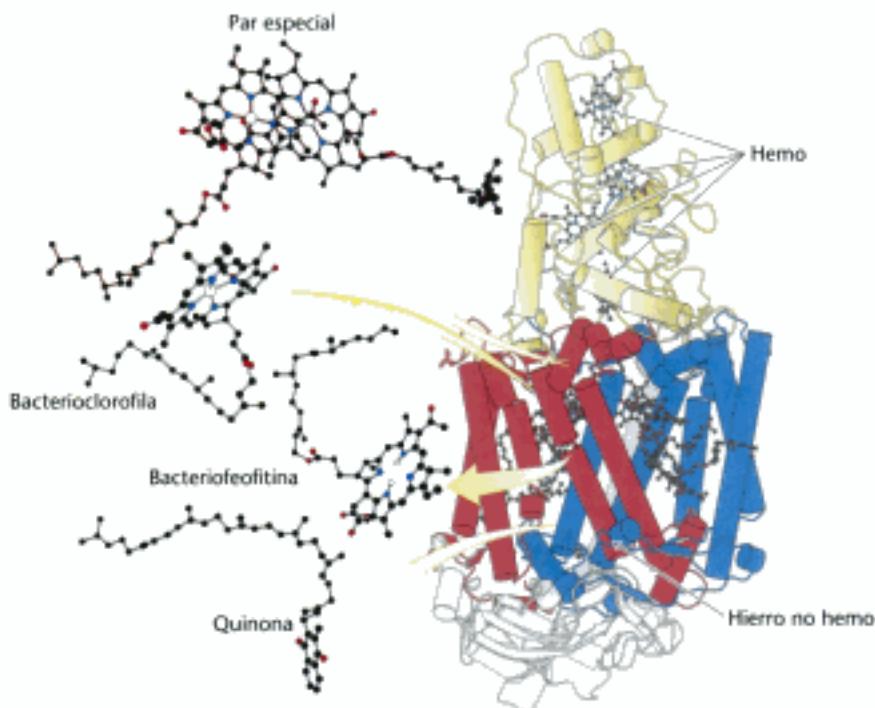
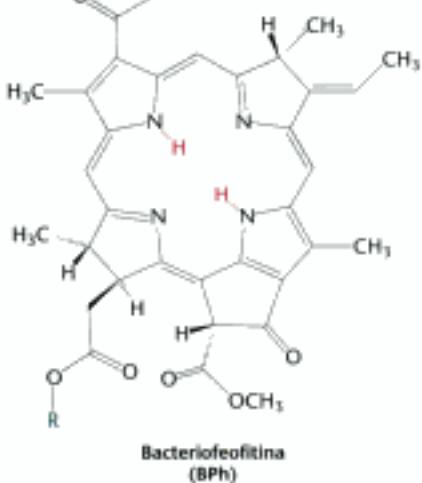


Figura 19.9 Centro de reacción fotosintético bacteriano. El núcleo del centro de reacción de la bacteria *Rhodopseudomonas viridis* está formado por dos cadenas similares: L (en rojo) y M (en azul). Completan la estructura una cadena H (blanco) y una subunidad de citocromo (en amarillo). A través de la estructura y de arriba hacia abajo en la figura discurre una cadena de grupos prostéticos, que comienza con un par especial de bacterioclorofilas y finaliza con una quinona. [Tomado de 1PRC. pdb.]



1000 nm. Se denomina *bacteriofeyofitina* a la bacterioclorofila que presenta en su centro dos protones en vez de un ion magnesio.

La reacción comienza con la absorción de la luz por un dímero de dos moléculas de BChl-*b* que se encuentra próximo al lado periplásmico de la membrana. Este dímero se denomina *par especial* debido a su papel fundamental en la fotosíntesis; presenta un máximo de absorción a los 960 nm, en el extremo del infrarrojo cercano de la región visible. Por este motivo al par especial con frecuencia se le denomina P960 (P indica pigmento). Al absorber la luz, la excitación del par especial permite la salida de un electrón, que se transfiere a través de otra molécula de BChl-*b* a una bacteriofeyofitina. (Figura 19.10, pasos 1 y 2). Esta separación inicial de carga conduce a la aparición de una carga positiva en el par especial ($P960^+$) y a que la BPh se cargue negativamente. La salida del electrón y su transferencia tiene lugar en menos de 10 picosegundos (10^{-11} segundos).

En las proximidades del aceptor de electrones, una quinona fuertemente unida (Q_A) transfiere rápidamente el electrón lejos de BPh^- , antes de que el electrón tenga ocasión de volver al par especial P960. Desde Q_A , el electrón se desplaza a otra quinona no tan estrechamente ligada, Q_B . La reducción completa de Q_B desde Q a QH_2 tiene lugar tras la absorción de un segundo fotón y la transferencia de un segundo electrón desde el par especial. Dado que el punto de unión de la Q_B se encuentra próximo al lado citoplasmático de la membrana, *se capturan dos protones del citoplasma, lo cual contribuye a la formación del gradiente de protones a través de la membrana celular* (Figura 19.10, pasos 5, 6 y 7).

En sus estados de alta energía, $P960^+$ y BPh^- pueden sufrir una recombinación de cargas, esto es que el electrón de BPh^- puede volver hacia atrás para neutralizar la carga positiva del par especial. Su regreso al par especial desperdiciaría un electrón con valiosa energía y simplemente convertiría la energía lumínica

Hidden page

Hidden page

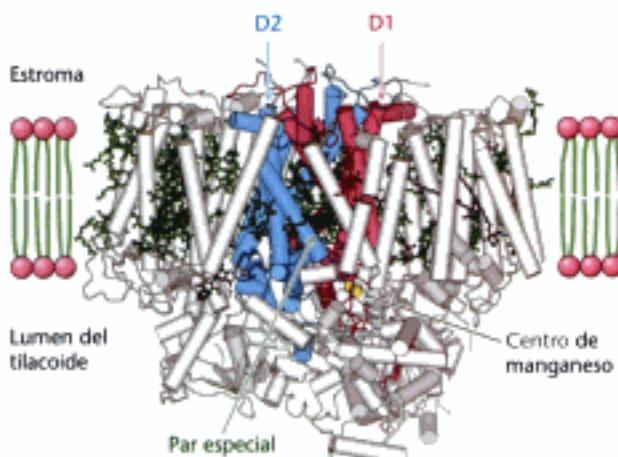


Figura 19.13 Estructura del fotosistema II. Las subunidades D1 y D2 se representan en rojo y en azul y las numerosas moléculas de clorofila unidas, en verde. Nótese que el par especial y el centro de manganeso (el sitio de liberación del oxígeno) están situados hacia el lado luminal de la membrana del tilacoide. [Tomado de 1SSL.pdb.]

cleo del fotosistema II lo constituyen D1 y D2, un par de subunidades semejantes de 32 kd que atraviesan la membrana tilacoidal. Estas subunidades son homólogas a las cadenas L y M del centro de reacción bacteriano. A diferencia del sistema bacteriano, el fotosistema II contiene un gran número de subunidades adicionales que se unen a otras clorofilas e incrementan la eficacia de la absorción de la energía de la luz y su transferencia al centro de reacción (Sección 19.5).

La fotoquímica del fotosistema II comienza con la excitación de un par especial de dos moléculas de clorofila unidas a las subunidades D1 y D2 (Figura 19.14). Debido a que las moléculas de clorofila *a* del par especial absorben la luz a 680 nm, normalmente a este par se le conoce como P680. Al ser excitado, el P680 transfiere rápidamente un electrón a la feofitina que se encuentra en su proximidad. Desde ésta, el electrón se transfiere primero a la plastoquinona unida permanentemente al centro Q_A y de aquí a la plastoquinona desplazable del centro Q_B. Este flujo electrónico es totalmente análogo al que ocurre en el sistema bacteriano. Con la llegada de un nuevo electrón y la captura de dos protones, se reduce a QH₂ la plastoquinona de intercambio. En este momento la energía de dos fotones se ha almacenado con seguridad y eficacia en el potencial reductor de QH₂.

La principal diferencia entre el sistema bacteriano y el fotosistema II radica en el origen de los electrones necesarios para neutralizar la carga positiva que se genera en el par especial. *El P680⁺ es un oxidante muy fuerte que extrae electrones de las moléculas de agua unidas al centro de manganeso.* La estructura de este centro incluye un ion calcio y cuatro iones manganeso. Aparentemente la selección evolutiva del manganeso se debe a su capacidad de presentar múltiples estados de oxidación (Mn²⁺, Mn³⁺, Mn⁴⁺, Mn⁵⁺) y a que forma enlaces fuertes con los compuestos que

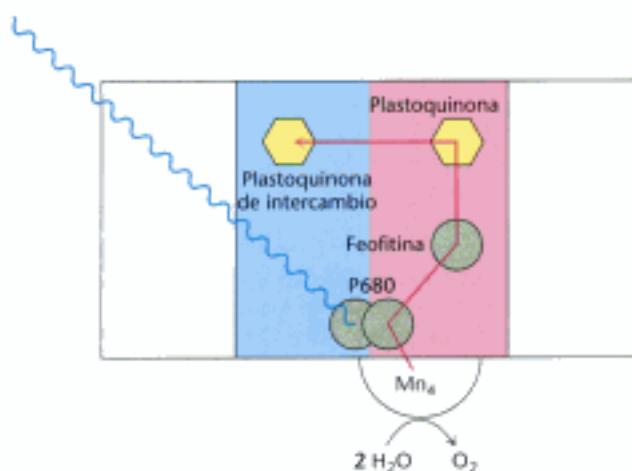


Figura 19.14 Flujo de los electrones a través del fotosistema II. La absorción de la luz induce la transferencia de electrónica desde el P680 hacia la plastoquinona intercambiable por una vía de transferencia de electrones. La carga positiva de P680 queda neutralizada por el flujo electrónico desde las moléculas de agua unidas al centro de manganeso.



La liberación de oxígeno se evidencia por la generación de burbujas en la planta acuática Elodea. [Colin Milkins/Oxford Scientific Films.]

Figura 19.15 Se necesitan cuatro fotones para generar una molécula de oxígeno. Cuando los cloroplastos adaptados a la oscuridad se exponen a un breve pulso de luz, fluye un electrón a través del fotosistema II. Mediante la medida del O_2 liberado tras cada pulso lumínoso se deduce que por cada molécula de O_2 son necesarios cuatro pulsos luminosos. La liberación de O_2 tiene lugar tras los pulsos 3º, 7º y 11º ya que los cloroplastos adaptados a la oscuridad comienzan en el estado S_1 , esto es, el estado reducido con un electrón.



contienen oxígeno. El centro de manganeso, en su estado reducido, oxida dos moléculas de agua para generar una molécula de oxígeno. Cada vez que se absorbe un fotón se desplaza un electrón de P680, y el par especial cargado positivamente extrae un electrón del centro de manganeso (Figura 19.15). Así pues, se precisan cuatro pasos fotoquímicos para extraer los electrones y reducir el centro de manganeso (Figura 19.15). Los cuatro electrones extraídos del agua se utilizan para reducir dos moléculas de Q hasta QH_2 .

El fotosistema II atraviesa la membrana del tilacoide de tal modo que el centro de reducción de la quinona se encuentra del lado del estroma, en tanto que el centro de manganeso y, por consiguiente, el centro de oxidación del agua se encuentra del lado del lumen tilacoidal. Así pues, los dos protones capturados en la reducción de

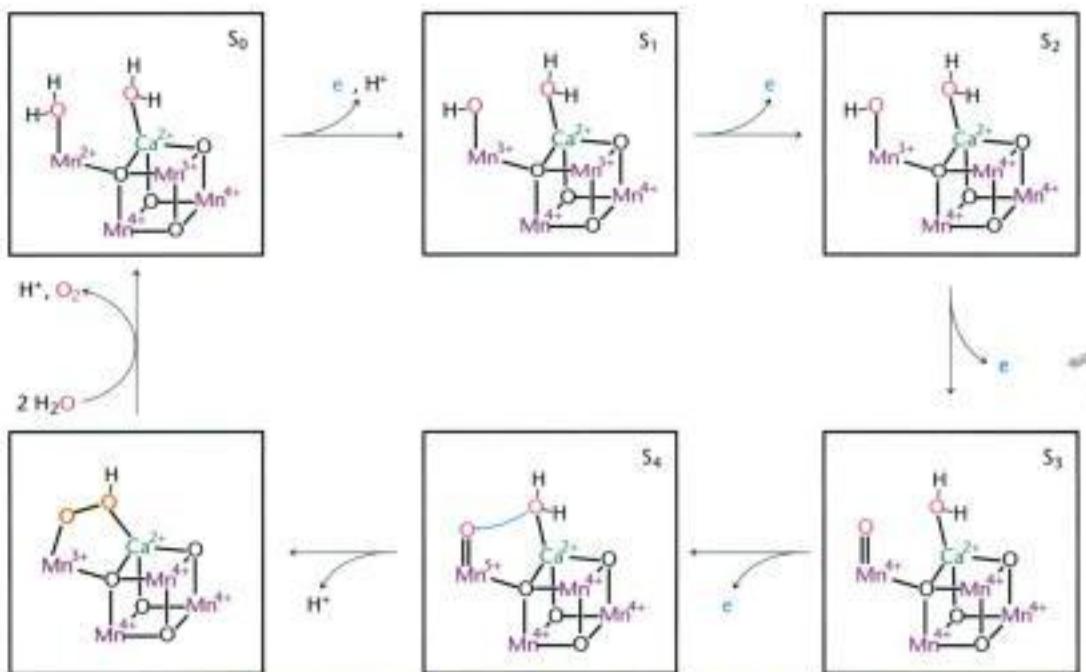


Figura 19.16 Esquema del posible mecanismo para el desprendimiento de oxígeno en el centro de manganeso. La estructura deducida para el núcleo del centro de manganeso tal como se muestra en la figura incluye cuatro iones manganeso y un ion calcio, aunque se omiten muchos ligandos adicionales en aras de la claridad. El centro se oxida, un electrón cada vez, hasta que dos moléculas de agua se unen para formar una molécula de O_2 que entonces se libera del centro. Un residuo de tirosina (no mostrado) participa en los pasos de transferencia acoplada de protón-electrón. Las estructuras se enumeran desde S_0 hasta S_4 para indicar el número de electrones que se han extraído.

cada molécula de plastoquinona proceden del estroma y los cuatro protones generados en la oxidación del agua se liberan en el lumen. Esta distribución de protones ocasiona un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide que se caracteriza por la existencia de más protones en el lumen del tilacoide que en el estroma (Figura 19.17).

El citocromo *bf* conecta el fotosistema II al fotosistema I

Los electrones fluyen del fotosistema I al II a través del complejo citocromo *bf*. Este complejo cataliza la transferencia de electrones del plastoquinol (QH_2) a la plastocianina (Pc) una proteína del lumen tilacoidal pequeña y soluble que contiene cobre.



Los dos protones del plastoquinol se liberan en el lumen del tilacoide. Esta reacción es una reminiscencia de la catalizada por el Complejo III de la fosforilación oxidativa; la mayoría de los componentes del complejo enzimático que cataliza la reacción, el complejo *citocromo bf*, son homólogos a los del Complejo III. El complejo citocromo *bf* está formado por cuatro subunidades: un citocromo de 23 kd con dos hemos de tipo *b*, una proteína Fe-S de 20 kd de tipo Rieske, un citocromo *f* de 33 kd con un citocromo de tipo *c*, y una cadena de 17 kd.

Este complejo cataliza la reacción a través del ciclo Q (p. 513). En la primera mitad del ciclo Q, el plastoquinol se oxida a plastoquinona, un electrón por cada vez. Los electrones del plastoquinol fluyen a través de la proteína Fe-S para convertir a la plastocianina oxidada a su forma reducida.

En la segunda mitad del ciclo Q, el citocromo *bf* reduce una segunda molécula de plastoquinona a partir de la reserva Q a plastoquinol, tomando dos protones de uno de los lados de la membrana, para luego reoxidar el plastoquinol y liberar ambos protones al otro lado de la membrana. El enzima se encuentra orientado de tal forma que los protones se liberan en el lumen del tilacoide y se toman del estroma, lo cual contribuye al aumento del gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide (Figura 19.18).

El fotosistema I utiliza la energía de la luz para generar ferredoxina reducida, un potente reductor

El fotosistema I, un complejo transmembrana constituido por 14 cadenas polipeptídicas, múltiples proteínas asociadas y cofactores, cataliza la etapa final de las reacciones de la fase luminosa (Figura 19.19). El núcleo de este sistema está formado

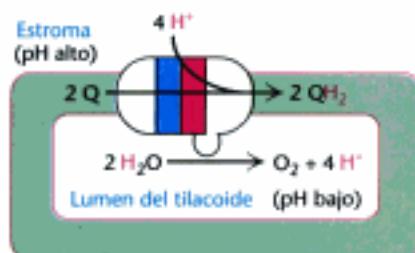


Figura 19.17 Sentido del gradiente de protones. El fotosistema II libera protones en el lumen del tilacoide y los capta del estroma. El resultado es un gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal con un exceso de protones (pH bajo) en el interior.

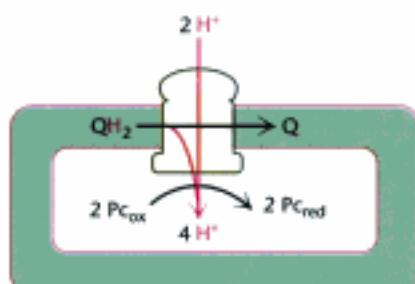


Figura 19.18 Contribución del citocromo *bf* al gradiente de protones. El complejo citocromo *bf* oxida QH_2 a Q a través del ciclo Q. En cada ciclo se liberan cuatro protones en el lumen del tilacoide.

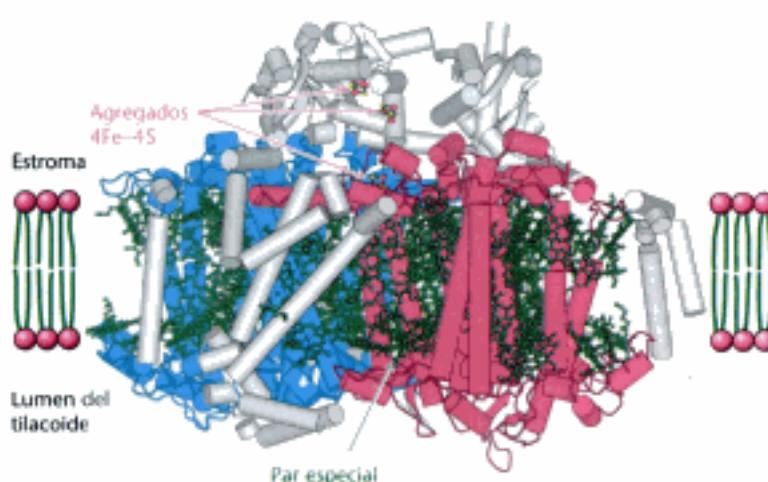


Figura 19.19 Estructura del fotosistema I. Las subunidades psaA y psaB se representan en rojo y azul. Notense las numerosas moléculas de clorofila enlazantes, representadas en verde, incluyendo el par especial, así como las agrupaciones hierro-azufre que facilitan la transferencia de electrones desde el estroma. [Tomado de 1JBO.pdb.]

Hidden page

Hidden page

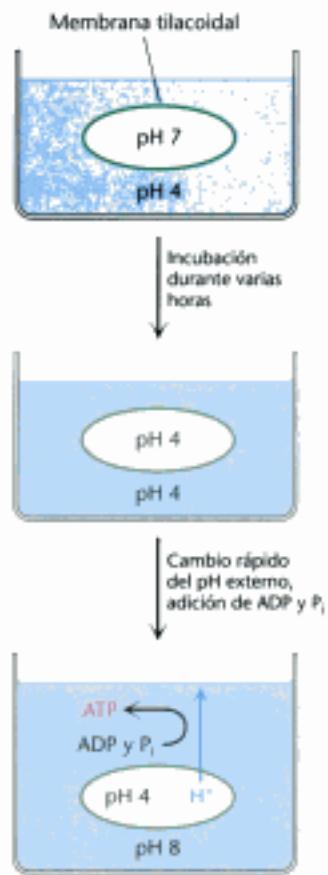


Figura 19.24 Experimento de Jagendorf. Síntesis de ATP por los cloroplastos como consecuencia de un gradiente de pH impuesto.

por la desaparición del gradiente de pH que existía a través de la membrana tilacoidal (Figura 19.24). Este experimento trascendental suministró un fuerte apoyo a la hipótesis de Peter Mitchell según la cual la síntesis de ATP está promovida por una fuerza protón-motriz.

El mecanismo de la síntesis de ATP en los cloroplastos es muy parecido al existente en la mitocondria. La formación de ATP ocurre por una fuerza protón-motriz tanto en la fotofosforilación como en la fosforilación oxidativa. Ya se ha visto cómo la luz induce la transferencia electrónica a través de los fotosistemas II y I y del complejo citocromo *bf*. En varios pasos de estos procesos se liberan protones en el lumen del tilacoide o se captan del estroma, lo cual genera un gradiente de protones. Este gradiente se mantiene ya que la membrana del tilacoide es prácticamente impermeable a los protones. El espacio tilacoidal se hace muy ácido, con un pH cercano a 4. El gradiente de protones transmembrana inducido por la luz es de unas 3,5 unidades de pH. Como ya se vio anteriormente en la Sección 18.4, la energía inherente al gradiente de protones, denominada fuerza protón-motriz (Δp), se describe como la suma de dos componentes: un gradiente de carga y un gradiente químico. En los cloroplastos prácticamente todo el Δp proviene del gradiente de pH, mientras que en la mitocondria es mayor la contribución del potencial de membrana. El motivo de esta diferencia es que la membrana tilacoidal es bastante permeable al Cl^- y al Mg^{2+} . La transferencia de H^+ al espacio tilacoidal inducida por la luz va acompañada por la transferencia tanto de Cl^- en el mismo sentido o de Mg^{2+} (1 Mg^{2+} por cada 2 H^+) en sentido opuesto. En consecuencia, se mantiene la neutralidad eléctrica y no se genera potencial de membrana. Un gradiente de pH de 3,5 unidades a través de la membrana tilacoidal corresponde a una fuerza protón-motriz de 0,20 V o a un ΔG de $-20,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-4,8 \text{ kcal mol}^{-1}$).

La ATP sintasa de los cloroplastos se parece mucho a la mitocondrial y a la procariótica

La fuerza protón-motriz generada por las reacciones de la fase luminosa se transforma en ATP mediante la *ATP sintasa* de los cloroplastos, también llamada *complejo CF_I-CF₀* (C indica cloroplasma y F factor). La CF_I-CF₀ ATP sintasa se parece mucho al complejo F_I-F₀ de la mitocondria (p. 522). El CF₀ conduce los protones a través de la membrana tilacoidal, en tanto que CF_I cataliza la formación de ATP partiendo de ADP y P_i.

El CF₀ está incrustado en la membrana tilacoidal. Está formado por cuatro cadenas polipeptídicas diferentes, conocidas como I (17 kd), II (16,5 kd), III (8 kd) y IV (27 kd) con una estequiometría estimada de 1:2:12:1. Las subunidades I y II, tienen una secuencia semejante a la subunidad b de la subunidad F₀ mitocondrial, la subunidad III corresponde a la subunidad c del complejo mitocondrial y la subunidad IV tiene una secuencia similar a la subunidad a. El CF_I, centro de la síntesis de ATP, se compone de las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. La subunidad β contiene los centros catalíticos, al igual que la subunidad F_I de la ATP sintasa mitocondrial. Curiosamente, la secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la ATP sintasa del cloroplasma del maíz es idéntica en más del 60% con la ATP sintasa humana, a pesar de haber transcurrido más de 1000 millones de años desde la separación evolutiva de los reinos vegetal y animal.

Es importante tener en cuenta que la orientación de CF_I-CF₀ en la membrana del tilacoide es la inversa en relación a la ATP sintasa mitocondrial (Figura 19.25). Sin embargo, la orientación funcional de las dos sintasas resulta idéntica: los protones fluyen del lumen a través del enzima hacia el estroma o la matriz donde se sintetiza el ATP. Dado que la CF_I se encuentra en la membrana tilacoidal del lado del estroma, el ATP recién sintetizado se libera directamente en el estroma. Se debe recordar que también se libera en el estroma el NADPH generado por la acción del fotosistema I. De este modo, los productos de las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis, ATP y NADPH, se encuentran en lugar correcto para que ocurran las posteriores reacciones de la fase oscura, por las que el CO₂ se transforma en carbohidratos.

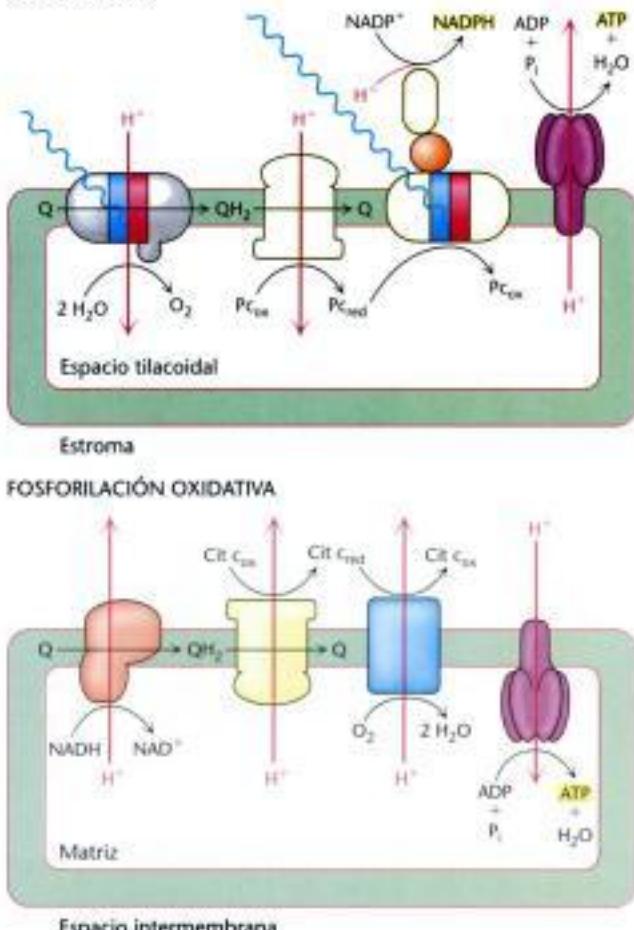


Figura 19.25 Comparación de la fotosíntesis con la fosforilación oxidativa. La transferencia electrónica inducida por la luz hace penetrar a los protones en el lumen del tilacoide. El exceso de protones fluye al exterior del lumen a través de la ATP sintasa generando ATP en el estroma. En la fosforilación oxidativa, el flujo de los electrones por la cadena de transporte electrónico bombea los protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial. El exceso de protones que se acumula en el espacio entre las membranas regresa a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa generando ATP en la matriz.

El flujo cíclico de electrones a través del fotosistema I da lugar a la producción de ATP en vez de NADPH

Cuando la relación de NADPH respecto a NADP⁺ es muy elevada, el NADP⁺ puede resultar inapropiado para aceptar los electrones de la ferredoxina reducida. En este caso, los electrones procedentes del P700, el centro de reacción del fotosistema I, pueden seguir una vía alternativa que no termina en NADPH. El electrón de la ferredoxina reducida puede transferirse al complejo citocromo *bf* en vez de al NADP⁺. Posteriormente, este electrón regresa a través del complejo citocromo *bf* para reducir a la plastocianina, la cual puede ser reoxidada por el P700⁺ completando el ciclo. El resultado global de este flujo cíclico de electrones realizado por el complejo citocromo *bf* es un bombeo de protones. El gradiente de protones resultante posibilita la síntesis de ATP. En este proceso, denominado *fotofosforilación cíclica*, se genera ATP sin la formación concomitante de NADPH (Figura 19.26). El fotosistema II no participa en la fotofosforilación cíclica, y por tanto, no se forma O₂ a partir del H₂O.

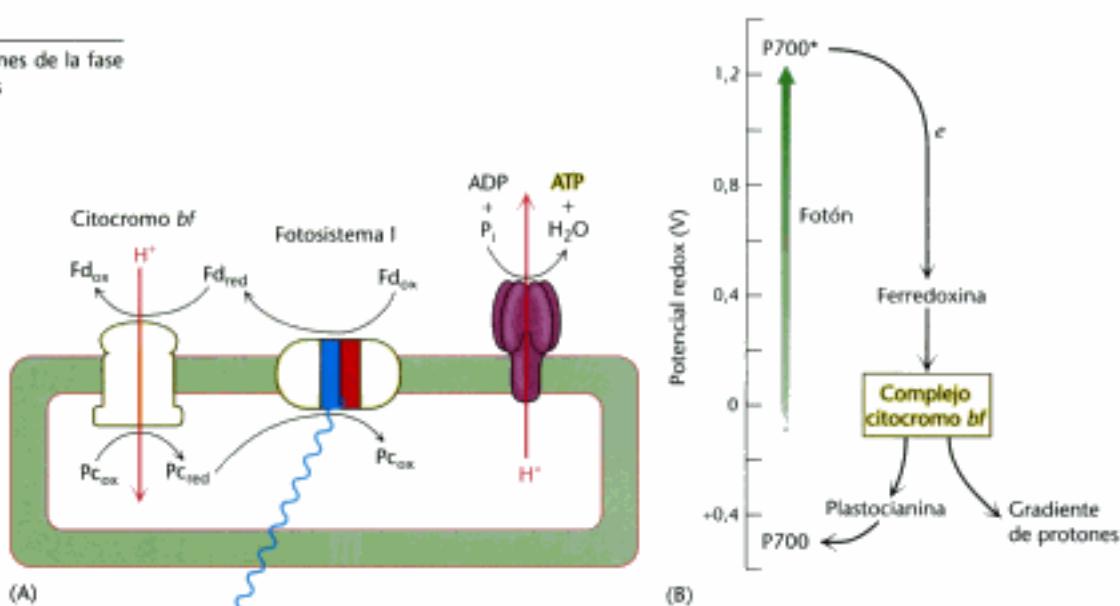


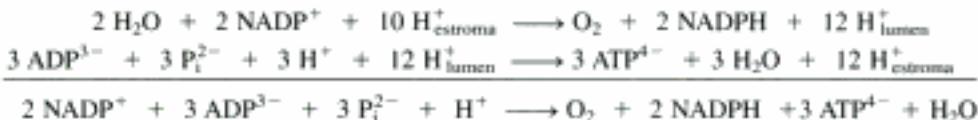
Figura 19.26 Fotofosforilación cíclica. (A) En esta vía, los electrones de la ferredoxina reducida se transfieren al complejo citocromo bf en lugar de a la ferredoxina-NADP $^+$ reductasa. El flujo de electrones a través del complejo citocromo bf bombea protones al lumen del tilacoide. Estos protones fluyen a través de la ATP sintasa para generar ATP. En esta vía no se forman NADPH ni O $_2$. (B) El esquema presenta las bases energéticas para la fotofosforilación cíclica. Abreviaturas: Fd, ferredoxina; Pc, plastocianina.

La absorción de ocho fotones produce una molécula de O $_2$, dos moléculas de NADPH y tres de ATP

En este momento se puede realizar una estimación global de la estequiometría de las reacciones de la fase luminosa. La absorción de 4 fotones por el fotosistema II genera una molécula de O $_2$ y la liberación de 4 protones en el lumen del tilacoide. Mediante el ciclo Q del complejo citocromo bf se oxidan 2 moléculas de plastocianina y se liberan 8 protones en el lumen. Por último, mediante la absorción de 4 fotones más, los electrones de 4 moléculas de plastocianina reducida se conducen a la ferredoxina. Las 4 moléculas de ferredoxina reducida generan 2 moléculas de NADPH. Así pues, la reacción neta es:



Los 12 protones liberados en el lumen pueden fluir entonces a través de la ATP sintasa. Dada la estequiometría aparente de los componentes de la CF $_0$ con 12 subunidades III, es de esperar que por cada ciclo completo de CF $_1$ pasen 12 protones a través de CF $_0$ y por tanto, se generen y liberen 3 moléculas de ATP. Así pues, teniendo en cuenta estas proporciones, la reacción neta es:



Por tanto, se requieren 8 fotones para generar 3 moléculas de ATP (2,7 fotones/ATP).

El rendimiento en la generación de ATP para la fotofosforilación cíclica es aún mayor. La absorción de 4 fotones por el fotosistema I conduce a la liberación por el complejo citocromo bf de 8 protones en el lumen. Estos protones fluyen a través de la ATP sintasa generando 2 moléculas de ATP. Así pues, por cada 2 fotones absorbidos se genera una molécula de ATP. No se produce NADPH.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

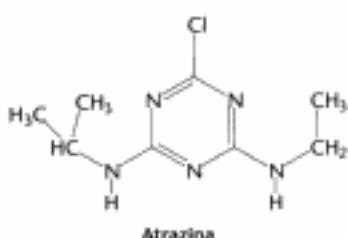
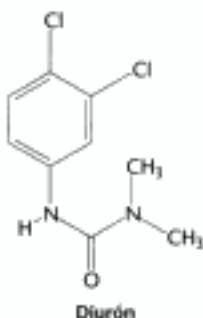
giones de la membrana tilacoidal. Un espacio interno tilacoidal común permite que los protones liberados por el fotosistema II en las membranas superpuestas puedan ser utilizados por las moléculas de la ATP sintasa que están situadas en una zona alejada en las membranas sin superponer.

¿Cuál es el significado funcional de esta diferenciación lateral del sistema membranoso de los tilacoides? La situación del fotosistema I en las membranas sin superponer le proporciona también acceso directo al estroma para la reducción del NADP^+ . Así mismo, la ATP sintasa está situada en la región sin superponer para que el gran glóbulo de CF_1 tenga espacio y pueda permitir el acceso del ADP. Por el contrario, las zonas apretadas de las regiones apiladas no suponen problemas para el fotosistema II, que interactúa con un pequeño dador polar de electrones (H_2O) y un transportador de electrones muy soluble en lípidos (plastoquinona).

Muchos herbicidas inhiben las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis

Muchos de los herbicidas comercializados matan la maleza porque interfieren con las funciones del fotosistema II o del fotosistema I. Los inhibidores del fotosistema II bloquean el flujo de electrones, en tanto que los inhibidores de fotosistema I desvían los electrones de su destino final en este fotosistema. Los inhibidores del fotosistema II suelen ser derivados de la urea, tales como el *diurón*, y de la triazina, como la *atrazina*. Estos compuestos químicos se unen al Q_B de la subunidad D1 del fotosistema II y bloquean la formación del plastoquinol (QH_2).

El paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio) es un inhibidor del fotosistema I. El paraquat, un dicatión, puede aceptar los electrones del fotosistema I transformándose en un radical. Este radical reacciona con el O_2^- generando especies reactivas de oxígeno, tales como superóxidos O_2^- y radicales hidroxilo (OH^\cdot). Estas especies reactivas del oxígeno reaccionan con los dobles enlaces de los lípidos de membrana dañándola (p. 517).



19.6 La capacidad de transformar la energía luminosa en energía química es muy antigua

 La capacidad de transformar la energía luminosa en energía química es una ventaja evolutiva importante. Las evidencias geológicas sugieren que la fotosíntesis productora de oxígeno comenzó a ser importante hace unos 2000 millones de años. Los sistemas fotosintéticos no productores de oxígeno son todavía más antiguos hace unos 3500 millones de años (Tabla 19.1). El sistema fotosintetizador de la bacteria purpúrea no sulfúrea *Rhodospseudomonas viridis* presenta la mayoría de las características de los sistemas fotosintetizadores productores de oxígeno y claramente los antecede. Las bacterias sulfúreas verdes, tales como *Chlorobium thiosulfatophilum* realizan una reacción que parece también haber aparecido antes que la fotosíntesis productora de oxígeno y que se parece a ella mucho más que la reacción realizada por *R. viridis*. Moléculas con azufre reducido, como el H_2S , son los dadores de electrones en la ecuación fotosintética neta:



TABLA 19.1 Grupos principales de procariotas fotosintetizadores

Bacterias	Dador de electrones en la fotosíntesis	Produce O_2
Sulfúreas verdes	H_2 , H_2S , S	No
No-sulfúreas verdes	Diversos aminoácidos y ácidos orgánicos	No
Púrpureas sulfúreas	H_2 , H_2S , S	No
Púrpureas no-sulfúreas	Habitualmente moléculas orgánicas	No
Cianobacterias	H_2O	Si

Sin embargo, la fotosíntesis no apareció inmediatamente junto con el origen de la vida. El fracaso en descubrir fotosíntesis en el dominio de las Archea implica que la fotosíntesis evolucionó exclusivamente en el dominio Bacteria. Las bacterias y las arqueas divergen de un antepasado común. Todos los reinos de los seres vivos tienen en común cadenas de transporte de electrones. Tal como hemos visto, componentes tales como la ubiquinona–citocromo *c* oxidoreductasa y la familia del citocromo *bf* están presentes tanto en la cadena de transporte de electrones respiratoria como en la fotosintética. Estos componentes fueron los cimientos sobre los cuales evolucionaron los sistemas de captura de la energía luminosa.

Resumen

19.1 La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos

Las proteínas que participan en las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis se localizan en las membranas tilacoidiales de los cloroplastos. Los resultados de las reacciones de la fase luminosa son: (1) obtención de poder reductor para la producción de NADPH, (2) generación de un gradiente de protones transmembrana para la formación de ATP, y (3) producción de O₂.

19.2 La absorción de la luz por la clorofila induce la transferencia de electrones

Las moléculas de clorofila, tetrapirroles con un ion de magnesio central, absorben la luz con bastante eficacia ya que son polienos. La absorción de un fotón provoca el salto de un electrón a un nivel energético superior; este electrón excitado se puede desplazar a los aceptores de electrones adyacentes. En la fotosíntesis, el electrón excitado abandona un par de moléculas de clorofila asociadas denominado par especial. Se ha estudiado en profundidad el núcleo funcional de la fotosíntesis, el centro de reacción, de las bacterias fotosintetizadoras. En este sistema, el electrón excitado se desplaza del par especial (que contiene bacterioclorofila) a la bacteriofEOFITINA (una bacterioclorofila carente del ion magnesio central) y por último va a las quinonas. La reducción de las quinonas ocasiona la generación del gradiente de protones, el cual conduce a la síntesis de ATP de un modo análogo a lo que ocurre en la fosforilación oxidativa.

19.3 En la fotosíntesis productora de oxígeno, dos fotosistemas generan un gradiente de protones y NADPH

En la fotosíntesis de las plantas verdes intervienen dos fotosistemas interrelacionados entre sí. En el fotosistema II, la excitación de un par especial de moléculas de clorofila, llamado P680, provoca la transferencia electrónica hacia la plastoquinona, de un modo análogo a lo que ocurre en el centro de reacción bacteriano. Los electrones son repuestos mediante su extracción del agua en el centro que contiene cuatro iones manganeso. Por cada cuatro electrones transferidos en este centro se genera una molécula de O₂. El plastoquinol producido en el fotosistema II se reoxida mediante el complejo citocromo *bf*, que transfiere electrones a la plastocianina, una proteína soluble que contiene cobre. Los electrones llegan al fotosistema I desde la plastocianina. En el fotosistema I, la excitación del par especial P700 libera electrones que fluyen hacia la ferredoxina, un reductor potente. Entonces, la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, una flavoproteína situada en el lado del estroma de la membrana, cataliza la formación de NADPH. Con el flujo de los electrones a través del fotosistema II, complejo citocromo *bf* y ferredoxina-NADP⁺ reductasa se genera un gradiente de protones.

19.4 El gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide conduce la síntesis de ATP

El gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide genera una fuerza protón-motriz, que utiliza la ATP sintasa para producir ATP. La ATP sintasa de

los cloroplastos (también conocida como CF_0-CF_1) se parece mucho a los agregados sintetizadores de ATP de las bacterias y de la mitocondria (F_0-F_1). Si la razón NADPH:NADP⁺ es alta, los electrones transferidos a la ferredoxina por el fotosistema I pueden regresar al complejo citocromo *bf*. Este proceso, denominado fotofosforilación cíclica, conduce a la generación de un gradiente de protones por el complejo citocromo *bf* sin la producción de NADPH ni de O₂.

19.5 Los pigmentos auxiliares canalizan la energía hacia los centros de reacción

Los complejos captadores de luz que rodean a los centros de reacción contienen moléculas auxiliares de clorofila *a* y también contienen moléculas de carotenoides y de clorofila *b*, que absorben la luz de la región central del espectro visible. Estos pigmentos auxiliares aumentan la eficacia de la captación de luz y transfieren la energía a los centros de reacción mediante resonancia.

19.6 La capacidad de transformar la energía luminosa en energía química es muy antigua

Los fotosistemas presentan características estructurales comunes que sugieren un origen evolutivo común. Las similitudes en la organización y estructura molecular con los componentes de la fosforilación oxidativa sugieren que el aparato fotosintético evolucionó a partir de un sistema ancestral de transducción de energía.

Términos clave

reacciones de la fase luminosa (p. 541)	par especial (p. 546)	esquema en Z de la fotosíntesis (p. 553)
cloroplasto (p. 542)	P960 (p. 546)	fuerza protón-motriz ($\Delta\mu$) (p. 554)
estroma (p. 543)	fotosistema I (PS I) (p. 548)	ATP sintasa (complejo CF_0-CF_1) (p. 554)
tilacoide (p. 543)	fotosistema II (PS II) (p. 548)	fotofosforilación cíclica (p. 555)
granum (p. 543)	P680 (p. 549)	carotenoides (p. 558)
clorofila <i>a</i> (p. 543)	centro de manganeso (p. 549)	complejo captador de luz (p. 558)
separación de carga fotoinducida (p. 545)	citocromo <i>bf</i> (p. 551)	
centro de reacción (p. 545)	P700 (p. 552)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Huber, R., 1989. A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *EMBO J.* 8:2125–2147.
 Deisenhofer, J. y Michel, H., 1989. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. *EMBO J.* 8:2149–2170.
 Barber, J. y Andersson, B., 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370:31–34.

Libros y revisiones

- Raghavendra, A. S., 1998. *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. 1998. Cambridge University Press.
 Cramer, W. A. y Knaff, D. B., 1991. *Energy Transduction in Biological Membranes: A Textbook of Bioenergetics*. Springer Verlag.
 Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J., 1997. *Bioenergetics* (2d ed.). Academic Press.
 Harold, F. M., 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W. H. Freeman and Company.

Mecanismos de transferencia electrónica

- Beratan, D. y Skourtis, S., 1998. Electron transfer mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:235–243.

Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. y Dutton, P. L., 1992. Nature of biological electron transfer. *Nature* 355: 796–802.

Boxer, S. G., 1990. Mechanisms of long-distance electron transfer in proteins: Lessons from photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Chem.* 19:267–299.

Fotosistema II

- Kirchhoff, H., Tremmel, I., Haase, W. y Kubitscheck, U., 2004. Supermolecular photosystem II organization in grana of thylakoid membranes: Evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* 43:9204–9213.
 Diner, B. A. y Rappaport, F., 2002. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:551–580.
 Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. y Orth, P., 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409:739–743.
 Rhee, K. H., Morris, E. P., Barber, J. y Kuhlbrandt, W., 1998. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396:283–286.

Hidden page

bargo, no bloquea la liberación de O_2 en presencia de un aceptor de electrones artificial como el ferrocianuro. Proponer el punto en el que el DCMU ejerce la acción inhibidora.

4. *Herbicida 2.* Predecir el efecto del herbicida diclorofenildimetilurea (DCMU) sobre la capacidad de una planta para realizar la fotofosforilación cíclica.

5. *Captación de luz infrarroja.* Considerar la relación entre la energía de un fotón y su longitud de onda.

(a) Algunas bacterias son capaces de captar luz de 1000 nm. ¿Cuál es la energía (en kilojulios o en kilocalorías) de un mol de fotones (también llamado einstein) de 1000 nm?

(b) ¿Cuál es el incremento máximo en potencial redox que puede inducir un fotón de 1000 nm?

(c) ¿Cuál es el número mínimo de fotones de 1000 nm necesarios para formar ATP a partir de ADP y P_i ? Suponer un ΔG de 50 kJ mol $^{-1}$ (12 kcal mol $^{-1}$) para la reacción de fosforilación.

6. *Aceptores perdidos.* Supongamos que se prepara un centro de reacción bacteriano que sólo contiene el par especial y las quinonas. Teniendo en cuenta que la separación entre el par especial y la quinona más próxima es de 22 Å, hacer una estimación de la velocidad de transferencia electrónica entre el par especial excitado y esta quinona.

7. *Distancia.* Supongamos que la transferencia de energía entre dos moléculas de clorofila *a* distantes entre sí 10 Å ocurre en 10 picosegundos. Supongamos que la distancia se incrementa hasta 20 Å manteniendo constantes el resto de factores. ¿Cuánto tardará en ocurrir la transferencia de energía?

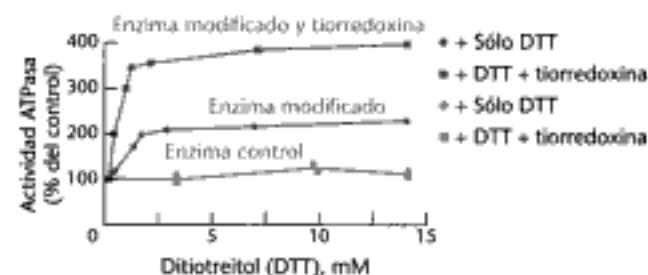
Problema de mecanismos

8. *Reacción de Hill.* En 1939, Robert Hill descubrió que los cloroplastos iluminados en presencia de un aceptor artificial de electrones, como el ferrocianuro $[Fe^{3+}(CN)_6]^{4-}$, desprendían O_2 . En este proceso el ferrocianuro se reduce hasta ferrocianuro $[Fe^{2+}(CN)_6]^{4-}$. No existe producción de NADPH o de plastocianina reducida. Proponer un mecanismo para la reacción de Hill.

Problema de interpretación de datos y de integración del capítulo

9. *Parecido, pero distinto.* El complejo mitocondrial $\alpha\beta\gamma$ o la ATP sintasa del cloroplasto se comportan *in vitro* como una ATPasa. La actividad sintasa y ATPasa del enzima del cloroplasto es sensible al control redox, en tanto que la actividad del enzima mitocondrial no lo es. Para determinar en qué se diferencian estos enzimas, se sustituye un segmento de la subunidad γ del enzima mitocondrial por el segmento γ equivalente del enzima del cloroplasto. Se determina, entonces, la actividad ATPasa del enzima modificado en función de las condiciones redox.

(a) ¿Cuál es el regulador redox de la ATP sintasa *in vivo*? El gráfico adjunto muestra la actividad ATPasa de los enzimas modificado y control en varias condiciones redox.



[Datos tomados de O. Bald, et al., 2000. *J. Biol. Chem.*, 275: 12757-12762.]

(b) ¿Cuál es el efecto de incrementar el poder reductor en la mezcla de reacción para los enzimas control y modificado?

(c) ¿Cuál fue el efecto al añadir tioredoxina? ¿En qué se diferencian estos resultados de los obtenidos en presencia de sólo DTT? Sugerir una posible explicación para esta diferencia.

(d) ¿Tuvieron éxito los investigadores al identificar la región de la subunidad γ como responsable de la regulación redox?

(e) ¿Cuál es la explicación racional para la regulación biológica por altas concentraciones de agentes reductores?

(f) ¿Qué aminoácidos de la subunidad γ son posiblemente los más afectados por las condiciones reductoras?

(g) ¿Qué experimentos pueden confirmar su respuesta a la pregunta e?

Hidden page

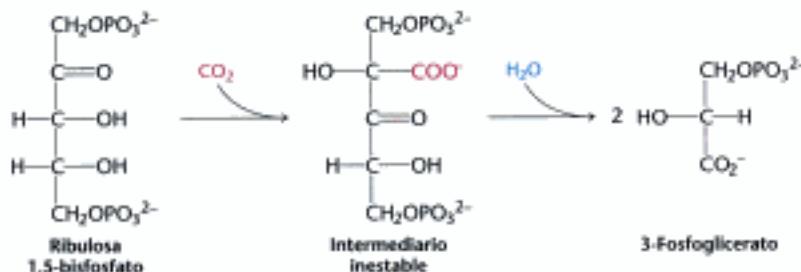
Hidden page

- La fijación del CO₂ sobre la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato.
- La reducción del 3-fosfoglicerato para formar hexosas.
- La regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato de tal modo que se pueda fijar más CO₂.

Esta serie de reacciones tiene lugar en el estroma de los cloroplastos, los orgánulos fotosintetizadores.

El dióxido de carbono reacciona con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato

El primer paso del ciclo de Calvin es la fijación del CO₂. La molécula de CO₂ se condensa con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar un compuesto inestable de seis carbonos que se hidroliza rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato.



La incorporación inicial del CO₂ en el 3-fosfoglicerato se demostró utilizando un trazador radiactivo marcado con el carbono 14 (Figura 20.2). Esta reacción es muy exergónica [$\Delta G^\circ = -51,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-12,4 \text{ kcal mol}^{-1}$)] y está catalizada por la *ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxygenasa* (también llamada *rubisco*), un enzima localizado en la superficie de las membranas tilacoidales que mira hacia el estroma de los cloroplastos. Esta importante reacción es la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de hexosas. La rubisco de los cloroplastos consta de ocho grandes subunidades (L, de 55 kd) y ocho pequeñas (S, de 13 kd) (Figura 20.3). Cada cadena L contiene un centro catalítico y un centro regulador. La cadena S estimula la acción catalítica de la cadena L. Este enzima es muy abundante en los cloroplastos y comprende en algunas plantas aproximadamente el 30% de las proteínas totales de sus hojas. De hecho, la rubisco es probablemente la proteína más abundante de la biosfera. Su presencia en grandes cantidades se debe a que es un enzima lento que tiene una velocidad de catálisis máxima de solamente 3 s^{-1} .

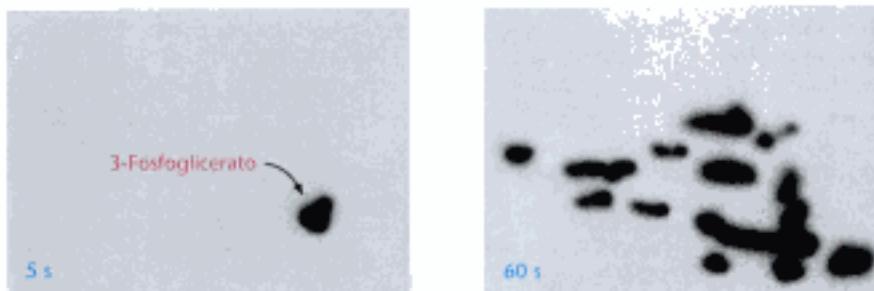


Figura 20.2 Seguimiento del destino del dióxido de carbono. En cultivos iluminados de algas, a los 5 segundos, la radioactividad del $^{14}\text{CO}_2$ se incorpora al 3-fosfoglicerato. Después de 60 segundos, la radioactividad está presente en muchos compuestos intermedios del ciclo de Calvin. [Cortesía del Dr. J. A. Bassham.]

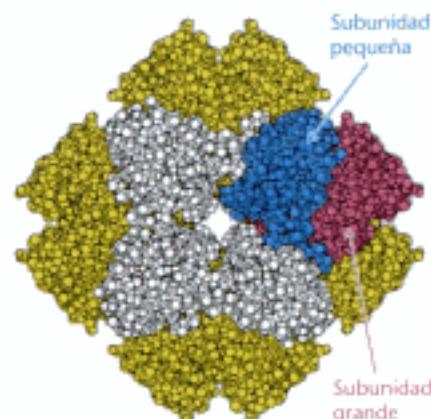
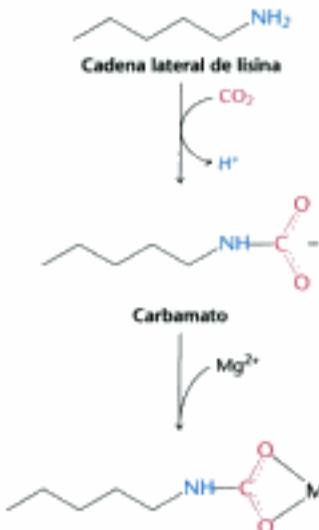


Figura 20.3 Estructura de la rubisco. El enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxygenasa (rubisco) está formado por ocho subunidades grandes (una se muestra en rojo y las restantes en amarillo) y por ocho subunidades pequeñas (una en azul y las demás en blanco). Los centros activos se encuentran en las subunidades grandes. [Tomado de 1PXO.pdb.]



La actividad de la rubisco depende del magnesio y el carbamato

Para su actividad la rubisco precisa estar unida a un metal divalente, normalmente un ion magnesio. De modo similar al ion zinc del centro activo de la anhidrasa carbónica (p. 256), el ion magnesio sirve para activar a la molécula sustrato unida, estabilizando la carga negativa. Curiosamente, para completar el ensamblado del centro de unión con el Mg^{2+} se precisa de otra molécula de CO_2 activadora distinta de la que actúa como sustrato. Esta molécula de CO_2 se añade al grupo no cargado e-amino de la lisina 201 para formar un *carbamato*. Este aducto cargado negativamente se une más tarde al ion Mg^{2+} . La formación del carbamato está catalizada por la *rubisco activasa*, aunque la reacción también tiene lugar espontáneamente pero a velocidad menor.

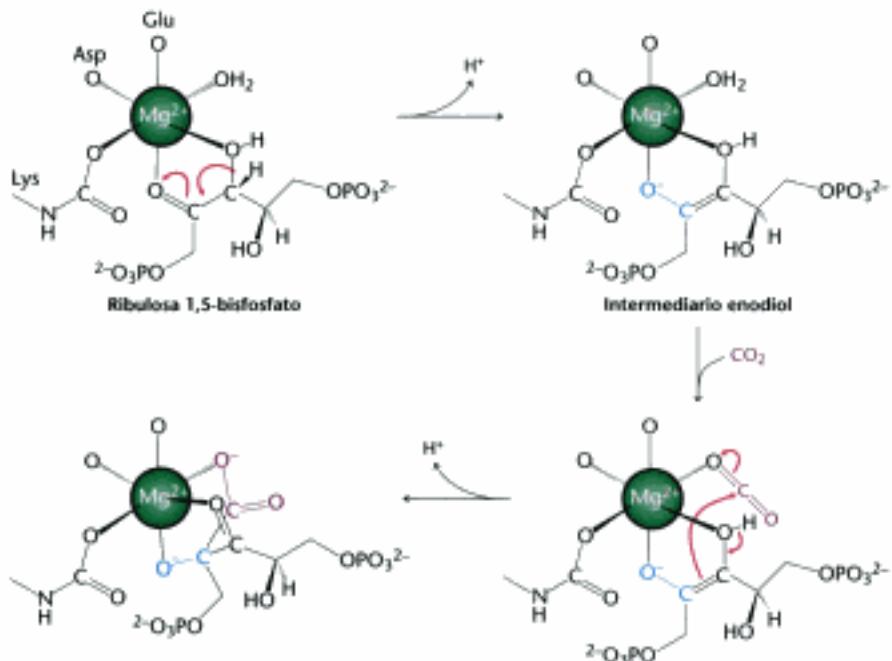
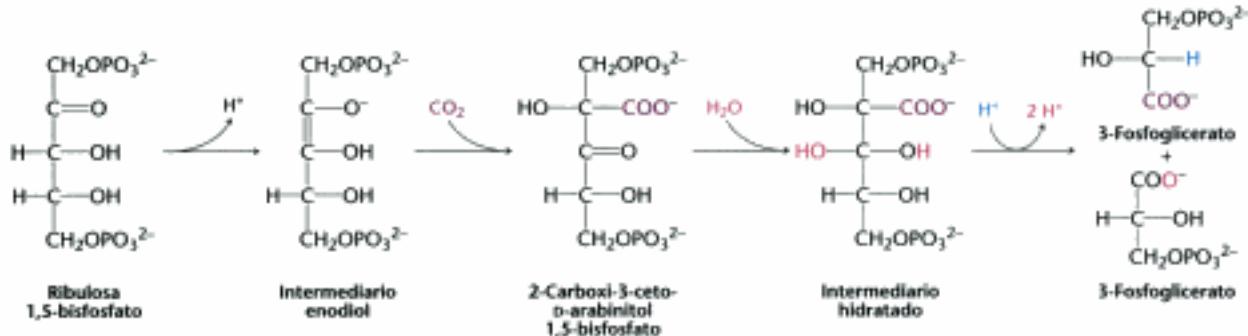


Figura 20.4 Función del ion magnesio en el mecanismo de la rubisco. La ribulosa 1,5-bisfosfato se une al ion magnesio que está enlazado con la rubisco mediante un residuo de glutamato, otro de aspartato y el carbamato de la lisina. La ribulosa 1,5-bisfosfato coordinada cede un protón para formar un compuesto enodiol reactivo que reacciona con el CO_2 formando un nuevo enlace carbono–carbono.

El núcleo metálico desempeña un papel importante en la unión con la ribulosa 1,5-bisfosfato y en su activación, de tal modo que pueda reaccionar con el CO_2 (Figura 20.4). La unión de la ribulosa 1,5-bisfosfato con el Mg^{2+} se realiza mediante su grupo cetónico y el hidroxilo adyacente. Este complejo rápidamente se desprotoniza para formar un intermediario enodiol. Este compuesto reactivo, análogo a los hidróxidos de zinc de la anhidrasa carbónica, se une al CO_2 , formando el nuevo enlace carbono–carbono. El producto resultante está coordinado con el ion Mg^{2+} mediante tres grupos, incluido el carboxilato recientemente formado. En este momento, al β -cetoácido le se añade una molécula de H_2O para formar un intermediario que se escinde en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (Figura 20.5)



Una imperfección catalítica: la rubisco también cataliza una reacción oxigenasa inútil

En ocasiones el reactivo intermedio generado en el ion Mg^{2+} reacciona con el O_2 en vez de hacerlo con el CO_2 . Por tanto, la rubisco también cataliza una reacción oxigenasa perjudicial. Los productos de esta reacción son **fosfoglicolato** y **3-fosfoglicerato** (Figura 20.6). En condiciones atmosféricas normales, a 25 °C, la velocidad de la reacción carboxilasa es cuatro veces mayor que la oxigenasa; la concentración de CO_2 en el estroma es de 10 μM y la de O_2 es 250 μM . La reacción oxigenasa, al igual que la reacción carboxilasa, requiere que la misma lisina 201 esté en forma de carbamato. Dado que el carbamato sólo se forma en presencia de CO_2 , esta propiedad puede impedir que la rubisco, en ausencia de CO_2 , catalice exclusivamente la reacción oxigenasa.

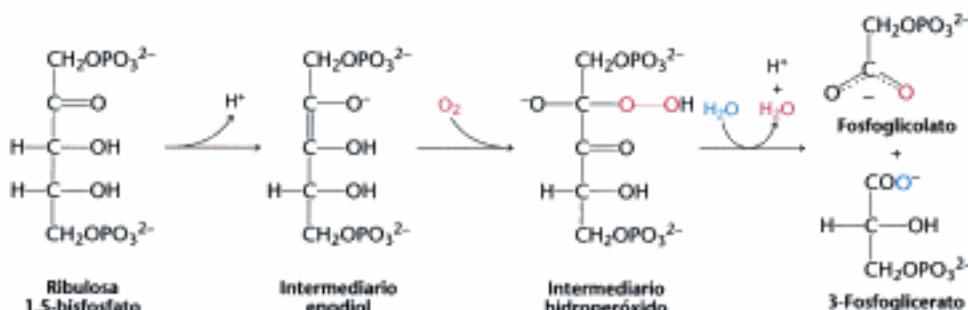


Figura 20.6 Una reacción colateral inútil. El reactivo intermedio enodiol en la rubisco reacciona con el oxígeno molecular para formar un intermediario hidroperóxido, el cual se rompe formando una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato.

El fosfoglicolato no es un metabolito muy versátil. Una vía de recuperación recicla parte de su esqueleto carbonado (Figura 20.7). Una fosfatasa específica lo convierte en **glicolato**, que entra en los **peroxisomas** (también llamados *microcuerpos*; Figura 20.8). El glicolato se oxida a **gioxilato** por la glicolato oxidasa, enzima que

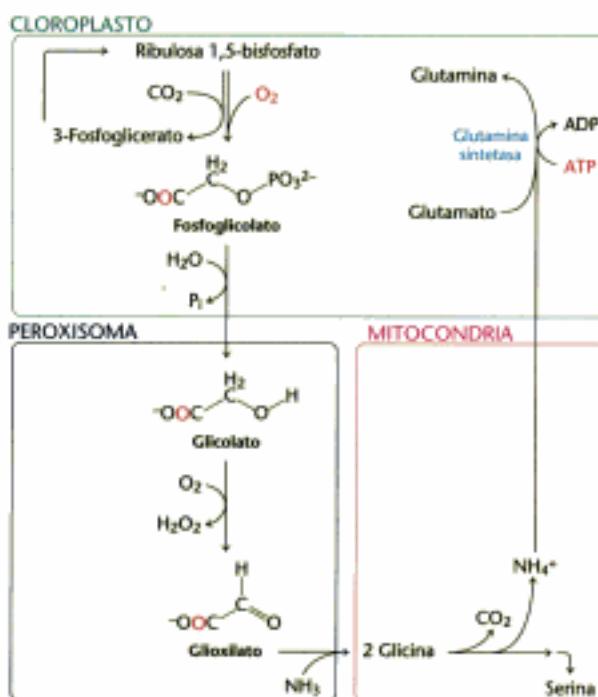


Figura 20.7 Reacciones de la fotorrespiración. En los cloroplastos, como producto de la reacción oxigenasa se forma fosfoglicolato. Tras su desfosforilación, el glicolato se transporta a los peroxisomas donde se transforma en gioxilato y después en glicina. En la mitocondria, dos moléculas de glicina se convierten en serina desprendiéndose un carbono en forma de CO_2 e ion amonio. El amonio se recupera en los cloroplastos.

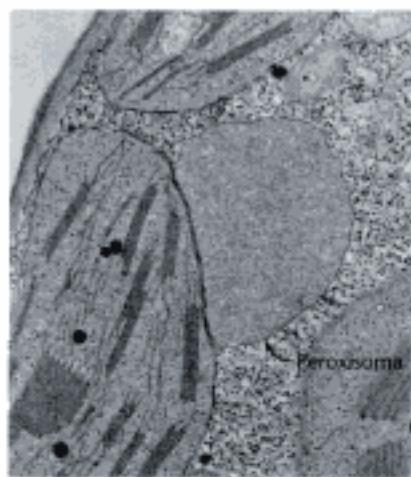


Figura 20.8 Micrografía electrónica de un peroxisoma situado entre dos cloroplastos. [Cortesía de la Dra. Sue Ellen Frederick.]

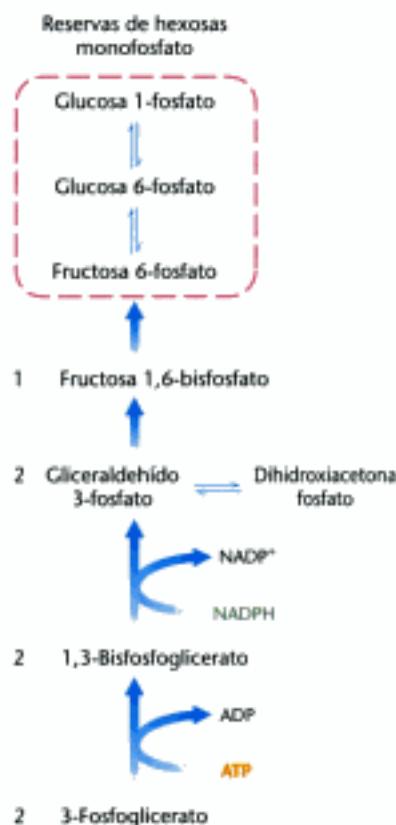


Figura 20.9 Formación de las hexosas fosfato. El 3-fosfoglicerato se transforma en fructosa 6-fosfato mediante una vía paralela a la gluconeogénesis.

contiene un mononucleótido de flavina como grupo prostético. El H₂O₂ producido en esta reacción es escindido por la catalasa en H₂O y O₂. La transaminación del glioxilato proporciona después *glicina*. Se utilizan dos moléculas de glicina para producir una serina, precursor potencial de la glucosa, con liberación de CO₂ y amonio (NH₄⁺). El amonio, que se utiliza en la síntesis de compuestos nitrogenados, se recupera mediante la reacción de la glutamina sintetasa (ver Figura 20.7 y p. 661).

Esta vía sirve para reciclar tres de los cuatro átomos de carbono de dos moléculas de glicolato. Sin embargo, uno de ellos se pierde en forma de CO₂. Este proceso se denomina *fotorrespiración* ya que se consume O₂ y se libera CO₂. La fotorrespiración es un proceso energéticamente inútil, ya que el carbono orgánico se convierte en CO₂ sin producir ATP, NADPH u otro metabolito rico en energía. Probablemente los procesos evolutivos han incrementado la preferencia de la rubisco por la actividad carboxilasa. Así, por ejemplo, la rubisco de las plantas superiores es ocho veces más específica para la carboxilación que la de las bacterias fotosintéticas. Sin embargo, una cierta actividad oxigenasa es un efecto colateral inevitable del mecanismo de las reacciones tipo carboxilasa.

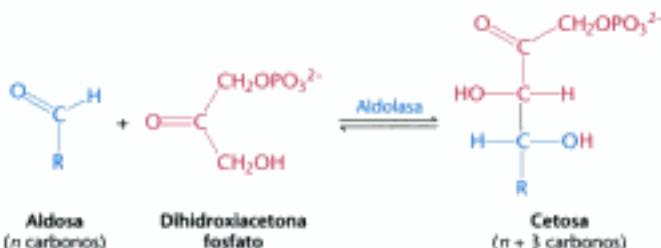
A partir del fosfoglicerato se obtienen hexosas fosfato y se regenera la ribulosa 1,5-bisfosfato

El producto de la rubisco, el 3-fosfoglicerato se convierte en tres tipos de hexosas fosfato: glucosa 1-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato: tres isómeros que se interconvierten unos en otros con facilidad (p. 450 y p. 595). Los pasos de esta conversión (Figura 20.9) son similares a los de la vía de la gluconeogénesis (p. 458), excepto que la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de cloroplastos, que produce gliceraldehído 3-fosfato (GAP), es específica para el NADPH en vez de NADH. Estas reacciones y las catalizadas por la rubisco llevan al CO₂ hasta el nivel de una hexosa, convirtiéndolo en un combustible químico a expensas del NADPH y ATP producidos en las reacciones de la fase luminosa.

La tercera etapa del ciclo de Calvin es la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato, el acceptor del CO₂ en el primer paso. El problema consiste en producir un azúcar de cinco carbonos a partir de azúcares de seis y tres carbonos. Una transcetolasa y una aldolasa desempeñan los papeles principales en esta reorganización de los átomos de carbono. La *transcetolasa*, que la veremos nuevamente en la vía de las pentosas fosfato, requiere del coenzima tiamina pirofosfato (TPP) para transferir una unidad de dos carbonos (CO-CH₂OH) desde la cetosa a la aldosa.



La *aldolasa*, que se vio en la glicolisis (p. 438), cataliza la condensación aldólica entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y un aldehído. Este enzima es muy específico para la dihidroxiacetona fosfato pero acepta una amplia gama de aldehídos.



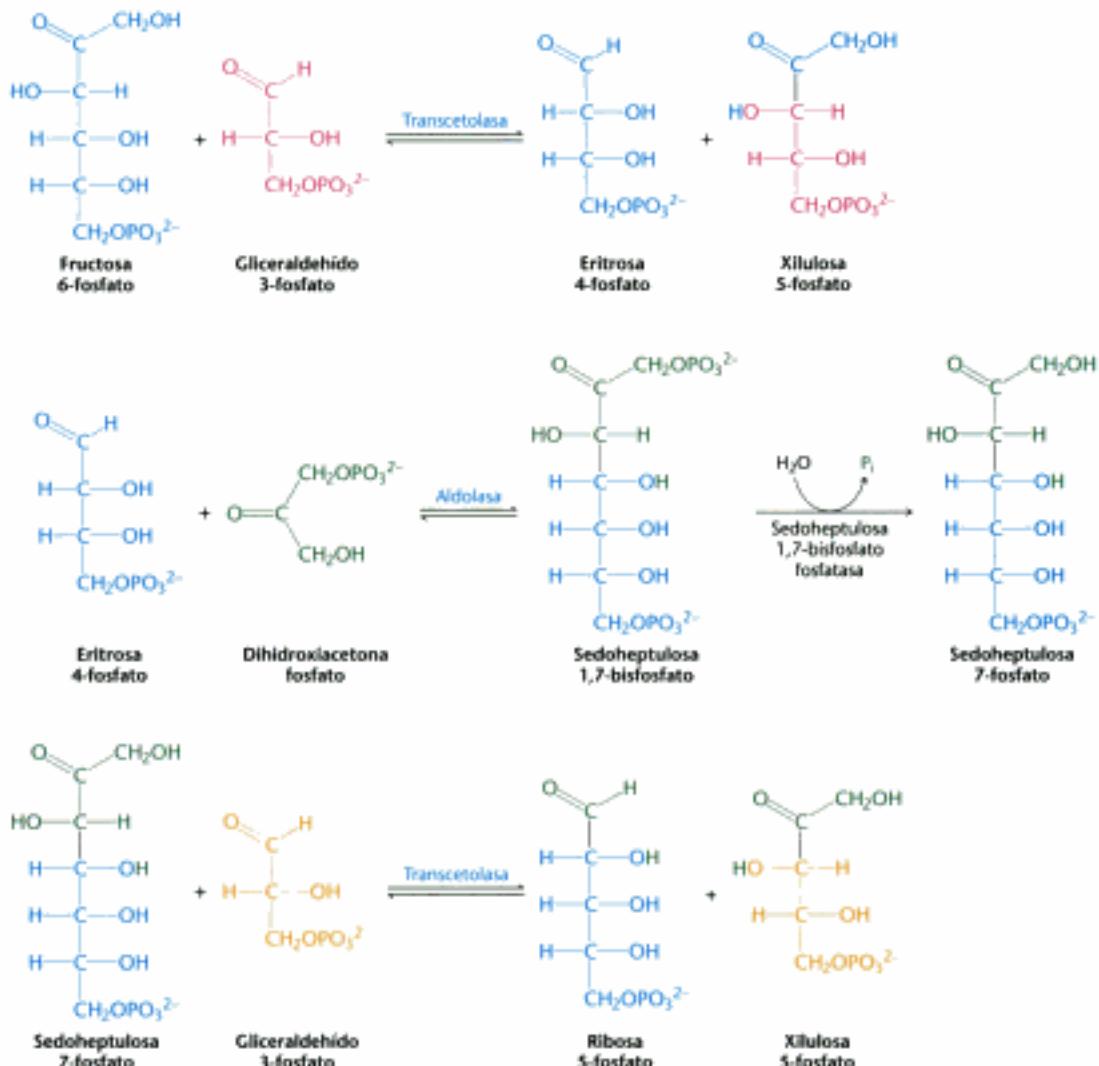
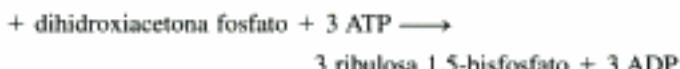


Figura 20.10 Formación de los azúcares de cinco carbonos. Primero, la transcetolasa convierte un azúcar de seis carbonos y otro de tres en dos azúcares de cuatro y cinco carbonos. En este punto, la aldolasa combina los azúcares de cuatro y tres carbonos en otro azúcar de siete carbonos. Por último, este azúcar de siete carbonos se combina con un compuesto de tres carbonos para formar dos azúcares de cinco carbonos.

Con estos enzimas, la construcción de los azúcares de cinco carbonos tiene lugar tal como se muestra en la Figura 20.10.

Por último, la ribosa 5-fosfato se convierte en ribulosa 5-fosfato mediante la *fosfopentosa isomerasa* en tanto que la xilulosa 5-fosfato se convierte en ribulosa 5-fosfato por la acción de la *fosfopentosa epimerasa*. El paso de ribulosa 5-fosfato a ribulosa 1,5-bisfosfato lo realiza la *fosforribulosa quinasa* (Figura 20.11). El resultado global de estas reacciones es:

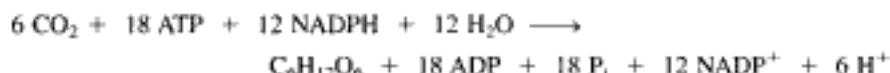


El ciclo de Calvin se completa con una serie de reacciones (Figura 20.12). El balance de todas estas reacciones es la formación de una hexosa y la regeneración del compuesto inicial, ribulosa 1,5-bisfosfato. Así pues, se requiere una cantidad limitada de ribulosa 1,5-bisfosfato para incorporar muchas moléculas de CO₂ en las hexosas.

Hidden page

léculas de 1,3-bisfosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato. Otras seis moléculas de ATP más se gastan en regenerar la ribulosa 1,5-bisfosfato.

Escribamos ahora la ecuación de balance del ciclo de Calvin.



Así pues, se consumen tres moléculas de ATP y dos de NADPH en la conversión del CO_2 hasta el nivel de una hexosa, tales como glucosa o fructosa.

El almidón y la sacarosa son los principales carbohidratos almacenados en las plantas

Las plantas contienen dos formas principales de almacenamiento de azúcares: el *almidón* y la *sacarosa*. El almidón, al igual que el glucógeno, es un polímero de residuos de glucosa, pero está menos ramificado por contener una menor proporción de enlaces α -1,6-glicosídicos (p. 311). Otra diferencia con respecto al glucógeno es que en el almidón el precursor activado es la ADP-glucosa y no la UDP-glucosa. El almidón se sintetiza y almacena en los cloroplastos.

Por contraste, la sacarosa (azúcar común de mesa) es un disacárido que se sintetiza en el citoplasma. Las plantas carecen de la capacidad para transportar hexosas fosfato a través de la membrana del cloroplasto, pero un translocador de fosfato abundante hace de mediador en el transporte de *triosas* fosfato desde los cloroplastos al citoplasma. Los intermediarios triosa fosfato, tales como el gliceraldehído 3-fosfato, entran en el citoplasma en intercambio con fosfato, por medio de la acción de un translocador de fosfato abundante. La fructosa 6-fosfato, formada a partir de *triosas* fosfato, se une a la glucosa a través de la unidad UDP-glucosa, para formar sacarosa 6-fosfato (Figura 20.13). De la hidrólisis del éster de fosfato se obtiene la sacarosa, un azúcar fácilmente transportable y móvil que se almacena en numerosas células de las plantas, como es el caso de la remolacha azucarera y de la caña de azúcar.

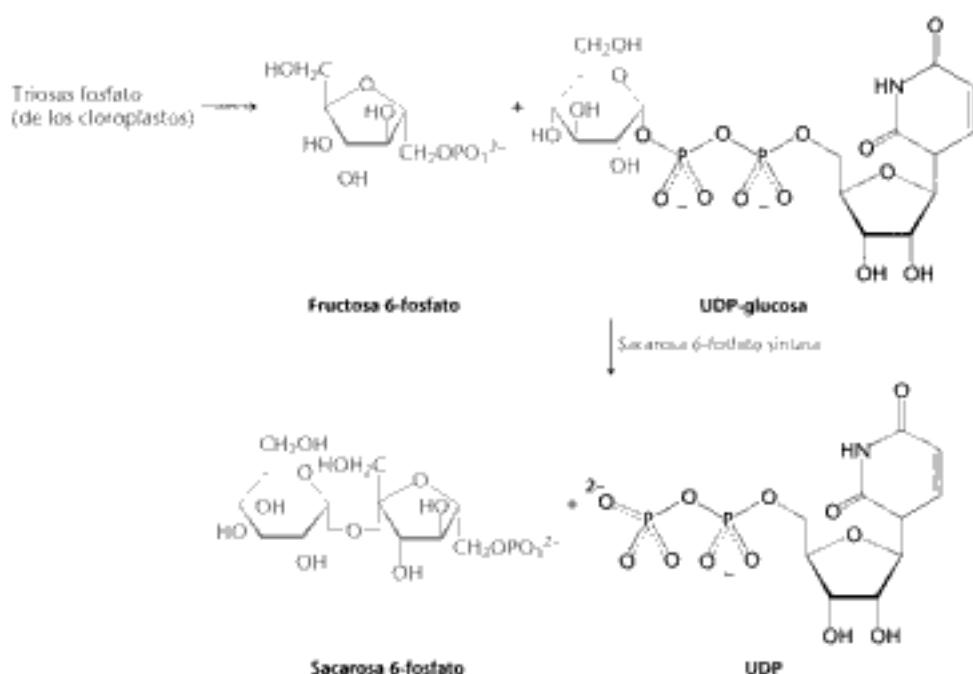


Figura 20.13. Síntesis de la sacarosa. La sacarosa 6-fosfato se obtiene por la reacción entre la fructosa 6-fosfato y el intermediario activado uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa).

Hidden page

Hidden page

Hidden page

El metabolismo ácido de las crasuláceas les permite crecer en ecosistemas áridos

577

20.3 La vía de las pentosas fosfato

En muchas plantas que crecen en climas calurosos y secos los estomas de las hojas permanecen cerrados durante el día para impedir la pérdida de agua (Figura 20.18). Consecuencia de lo anterior es que no se puede absorber el CO₂ durante las horas de insolación que es cuando se precisa para la síntesis de glucosa. El CO₂ entra en las hojas cuando los estomas se abren durante las horas frescas de la noche. Para almacenar el CO₂, hasta que pueda utilizarse durante el día, esas plantas han adquirido una adaptación llamada *metabolismo ácido de las crasuláceas* (CAM) referido al género *Crassulaceae* (plantas suculentas). El CO₂ se fija mediante la vía de C₄ en malato y se almacena en vacuolas. Durante el día se descarboxila el malato y el CO₂ está disponible para el ciclo de Calvin. A diferencia con las plantas C₄, en las plantas CAM el almacenamiento y la utilización del CO₂ están separados en el tiempo, no en el espacio.

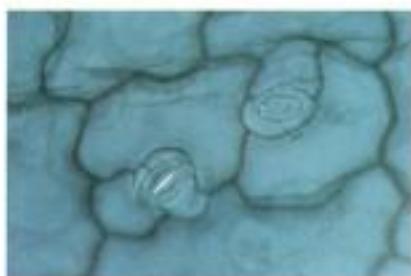
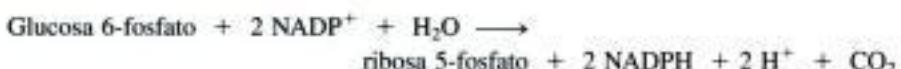


Figura 20.18 Micrografía electrónica de un estoma abierto y otro cerrado. [Herb Charles Ohlmeyer/Fran Heyl Associates.]

20.3 La vía de las pentosas fosfato genera NADPH y sintetiza azúcares de cinco carbonos

La vía de las pentosas fosfato satisface las necesidades que tienen todos los organismos de disponer de una fuente de NADPH para utilizarlo en la biosíntesis reducida (Tabla 20.2). Esta vía presenta dos fases: (1) la generación oxidativa de NADPH y (2) la interconversión no oxidativa de los azúcares (Figura 20.19). En la fase oxidativa se genera NADPH al oxidar la glucosa 6-fosfato hasta ribosa 5-fosfato. Este azúcar de cinco carbonos y sus derivados son componentes del RNA y DNA, al igual que del ATP, NADH, FAD y coenzima A.



En la fase no oxidativa, la vía cataliza la interconversión de azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos en una serie de reacciones no oxidativas. Los azúcares de cinco carbonos en exceso pueden convertirse en intermediarios de la glicolisis. Todas estas reacciones tienen lugar en el citoplasma. Estas interconversiones se basan en las mismas reacciones conducentes a la formación de la ribulosa 1,5-bisfosfato en el ciclo de Calvin.

En la conversión de glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato se generan dos moléculas de NADPH

La fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato comienza con la deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato en el carbono 1, reacción catalizada por la *glucosa 6-fosfato deshidrogenasa* (Figura 20.20). Este enzima es altamente específico para NAD⁺; la K_M para NAD⁺ es de unas mil veces mayor que para NADP⁺. El producto es la *6-fosfoglucono-8-lactona*, que es un éster intramolecular constituido entre el grupo

TABLA 20.2 Vías que precisan NADPH

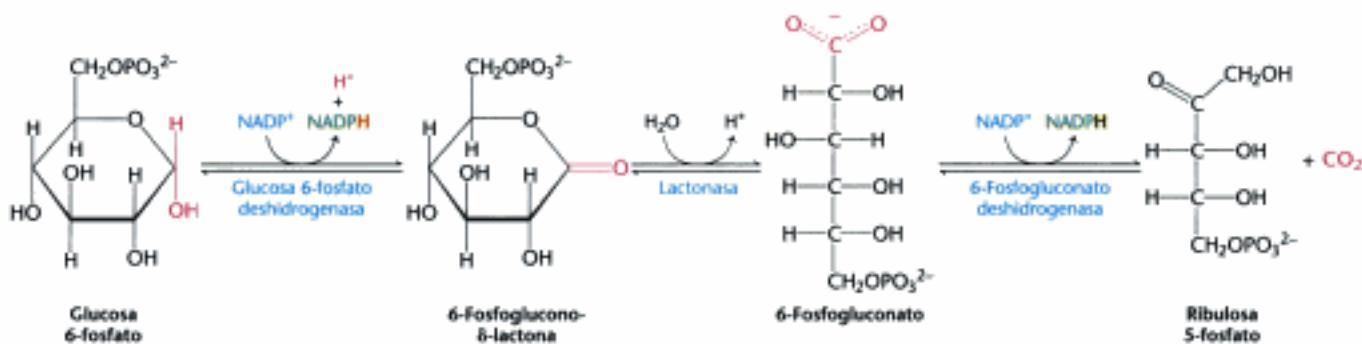
Síntesis

- Biosíntesis de ácidos grasos
- Biosíntesis de colesterol
- Biosíntesis de neurotransmisores
- Biosíntesis de nucleótidos

Destoxicificación

- Reducción del glutatión oxidado
- Citocromo P450 monooxigenasa

Hidden page

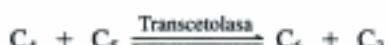


carboxilo del C-1 y el grupo hidroxilo del C-5. El siguiente paso es la hidrólisis de la 6-fosfoglucono- δ -lactona por una *lactonasa* específica, para dar 6-fosfogluconato. La 6-fosfogluconato deshidrogenasa descarboxila oxidativamente este azúcar de seis carbonos para dar ribulosa 5-fosfato. Nuevamente el NADP⁺ es el aceptor de electrones. El paso final en la síntesis de ribulosa 5-fosfato es la isomerización de la ribulosa 5-fosfato por la fosfopentosa isomerasa (ver Figura 20.11)

Figura 20.20 Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. La glucosa 6-fosfato se oxida a 6-fosfoglucono- δ -lactona generando una molécula de NADPH. La lactona producto se hidroliza hasta 6-fosfogluconato, el cual se descarboxila para dar ribulosa 5-fosfato con la generación de una segunda molécula de NADPH.

La vía de las pentosas fosfato y la glicolisis están relacionadas por la transacetolasa y la transaldolasa

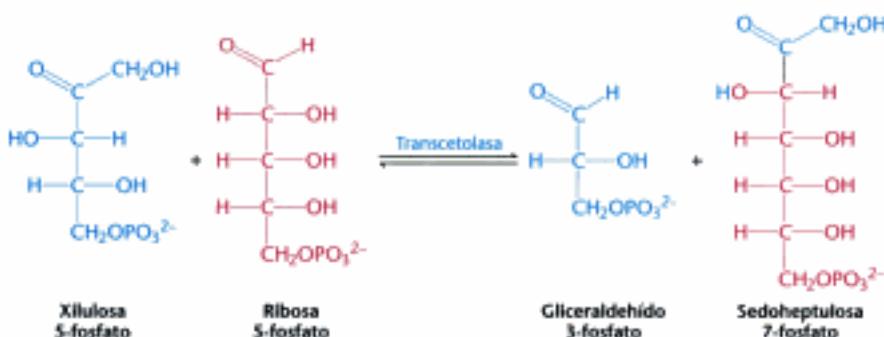
Las reacciones precedentes suministran por cada glucosa 6-fosfato oxidada dos moléculas de NADPH y una ribulosa 5-fosfato. Sin embargo, en muchas células, las necesidades de NADPH para las biosíntesis reductoras son mucho mayores que las necesidades de ribulosa 5-fosfato para su incorporación a nucleótidos y ácidos nucleicos. En estos casos, la ribulosa 5-fosfato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato mediante la *transacetolasa* y la *transaldolasa*. *Estos enzimas crean una relación reversible entre la vía de las pentosas fosfato y la glicolisis al catalizar estas tres reacciones sucesivas:*



El resultado neto de estas reacciones es la *formación de dos hexosas y una triosa a partir de tres pentosas*:

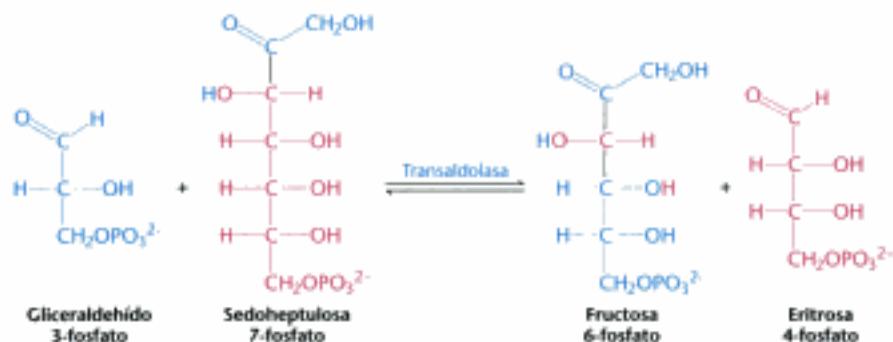


La primera de las tres reacciones que unen la vía de las pentosas fosfato y la glicolisis es la formación de *gliceraldehido 3-fosfato* y *sedoheptulosa 7-fosfato* a partir de dos pentosas.



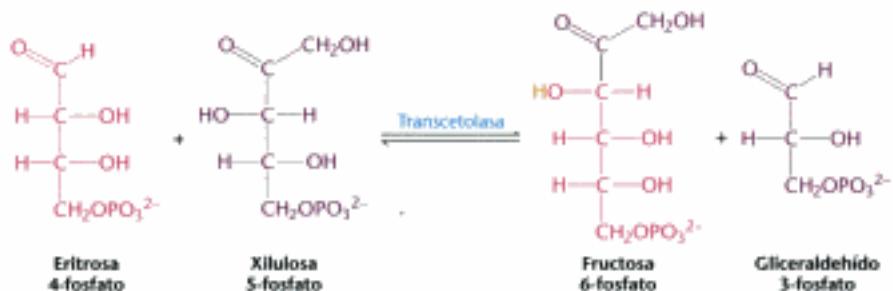
El dador de la unidad de dos carbonos en esta reacción es la xilulosa 5-fosfato, que es un epímero de la ribulosa 5-fosfato. Una cetosa puede ser sustrato de la transcetolasa únicamente si su grupo hidroxílico del C-3 tiene la configuración de la xilulosa, en vez de la ribulosa. La ribulosa 5-fosfato se convierte por medio de la *fosfopentosa isomerasa* en el epímero apropiado para la reacción de la transcetolasa (ver Figura 20.11), en una reacción inversa de la que ocurre en el ciclo de Calvin.

El gliceraldehído 3-fosfato y la sedoheptulosa 7-fosfato, generados por la transcetolasa, reaccionan entonces para formar *fructosa 6-fosfato* y *eritrosa 4-fosfato*.



Esta síntesis de un azúcar de cuatro carbonos y de un azúcar de seis carbonos viene catalizada por la *transaldolasa*.

En la tercera reacción, la transcetolasa cataliza la síntesis de *fructosa 6-fosfato* y *gliceraldehído 3-fosfato*, a partir de eritrosa 4-fosfato y xilulosa 5-fosfato.



La suma global de estas reacciones es:



Puesto que la xilulosa 5-fosfato puede formarse a partir de ribosa 5-fosfato por la acción secuencial de la fosfopentosa isomerasa y la fosfopentosa epimerasa, la reacción neta partiendo de la ribosa 5-fosfato es:



Así pues, el exceso de ribosa 5-fosfato formado por la vía de las pentosas fosfato puede convertirse completamente en intermediarios glicolíticos. Aún más, mediante esta vía cualquier ribosa tomada en la dieta puede procesarse hacia intermediarios glicolíticos. Resulta evidente que los esqueletos carbonados de los azúcares pueden reorganizarse en profundidad para atender las necesidades fisiológicas (Tabla 20.3).

TABLA 20.3 Vía de las pentosas fosfato

Reacción	Enzima
Etapa oxidativa	
Glucosa 6-fosfato + NADP ⁺ → 6-fosfoglucono-δ-lactona + NADPH + H ⁺	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
6-Fosfoglucono-δ-lactona + H ₂ O → 6-fosfogluconato + H ⁺	Lactonasa
6-Fosfogluconato + NADP ⁺ → ribulosa 5-fosfato + CO ₂ + NADPH + H ⁺	6-Fosfogluconato deshidrogenasa
Etapa no oxidativa	
Ribulosa 5-fosfato ⇌ ribosa 5-fosfato	Fosfopentosa isomerasa
Ribulosa 5-fosfato ⇌ xilulosa 5-fosfato	Fosfopentosa epimerasa
Xilulosa 5-fosfato + ribosa 5-fosfato ⇌ sedoheptulosa 7-fosfato + gliceraldehído 3-fosfato	Transketolasa
Sedoheptulosa 7-fosfato + gliceraldehído 3-fosfato ⇌ fructosa 6-fosfato + eritrosa 4-fosfato	Transaldolasa
Xilulosa 5-fosfato + eritrosa 4-fosfato ⇌ fructosa 6-fosfato + gliceraldehído 3-fosfato	Transketolasa

Mecanismo: la transcetolasa y la transaldolasa estabilizan intermediarios carbaníonicos utilizando mecanismos distintos

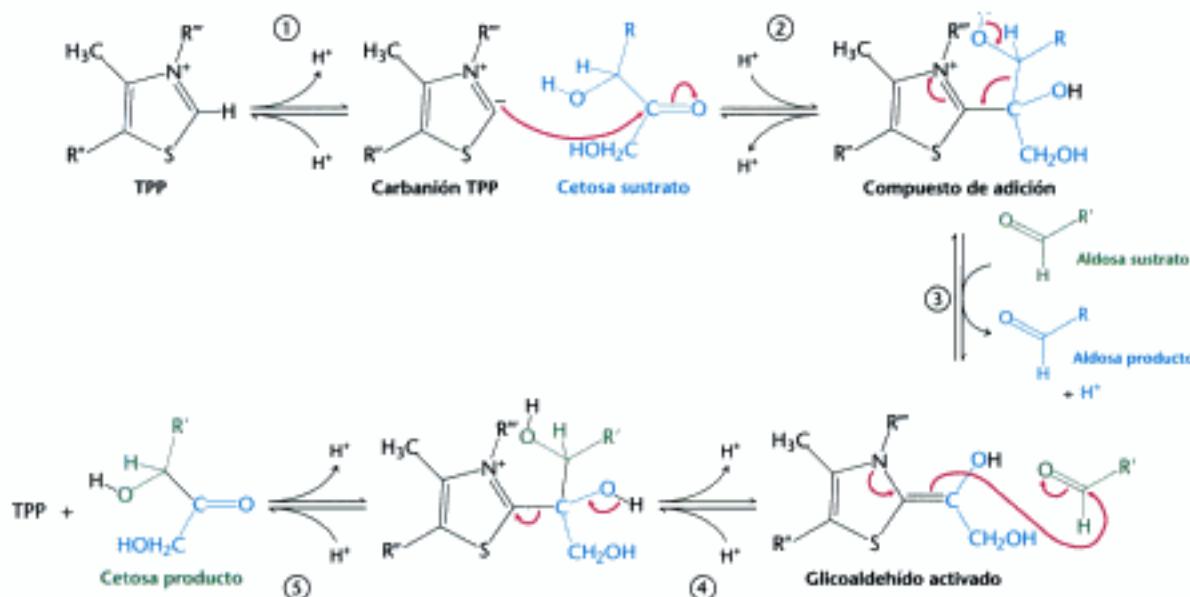
Aunque presenta similitudes las reacciones catalizadas por la transcetolasa y la transaldolasa son distintas. Una diferencia es que la transcetolasa transfiere una unidad de dos carbonos, mientras que la transaldolasa transfiere una unidad de tres carbonos. Durante el transcurso de la reacción cada una de estas unidades está transitoriamente unida al enzima.

Reacción de la transcetolasa. La transcetolasa contiene como grupo prostético una tiamina pirofosfato fuertemente enlazada. El enzima transfiere un glicoaldehído de dos carbonos procedente de una cetosa dadora a una aldosa aceptora. El lugar de la adición del fragmento de dos carbonos es el anillo tiazólico del TPP. La transcetolasa es homóloga de la subunidad E₁ del complejo piruvato deshidrogenasa (p. 478) y el mecanismo de reacción es semejante (Figura 20.21).

El átomo de carbono C-2 del TPP unido se ioniza rápidamente para formar un carbanión. El átomo de carbono con carga negativa de este intermediario reactivo ataca al grupo carbonilo de la cetosa sustrato. El compuesto de adición resultante libera la aldosa producto originando una *unidad glicoaldehído activada*. El átomo de nitrógeno cargado positivamente del anillo de tiazol actúa como un *sumidero de electrones* en la formación de este intermediario activado. Entonces, el grupo carbonilo de la aldosa aceptora adecuada se condensa con la unidad glicoaldehído activada para formar una nueva cetosa, que se desprende del enzima.

Figura 20.21 Mecanismo de la transcetolasa.

(1) La tiamina pirofosfato (TPP) se ioniza para formar un carbanión. (2) El carbanión del TPP ataca a la cetosa sustrato (3) La ruptura el enlace carbono-carbono libera una aldosa producto y deja un fragmento de dos carbonos unido al TPP. (4) Este intermediario glicoaldehído activado ataca a la aldosa sustrato formando un nuevo enlace carbono-carbono. (5) Se libera la cetosa producto y el TPP queda disponible para un nuevo ciclo de reacción.



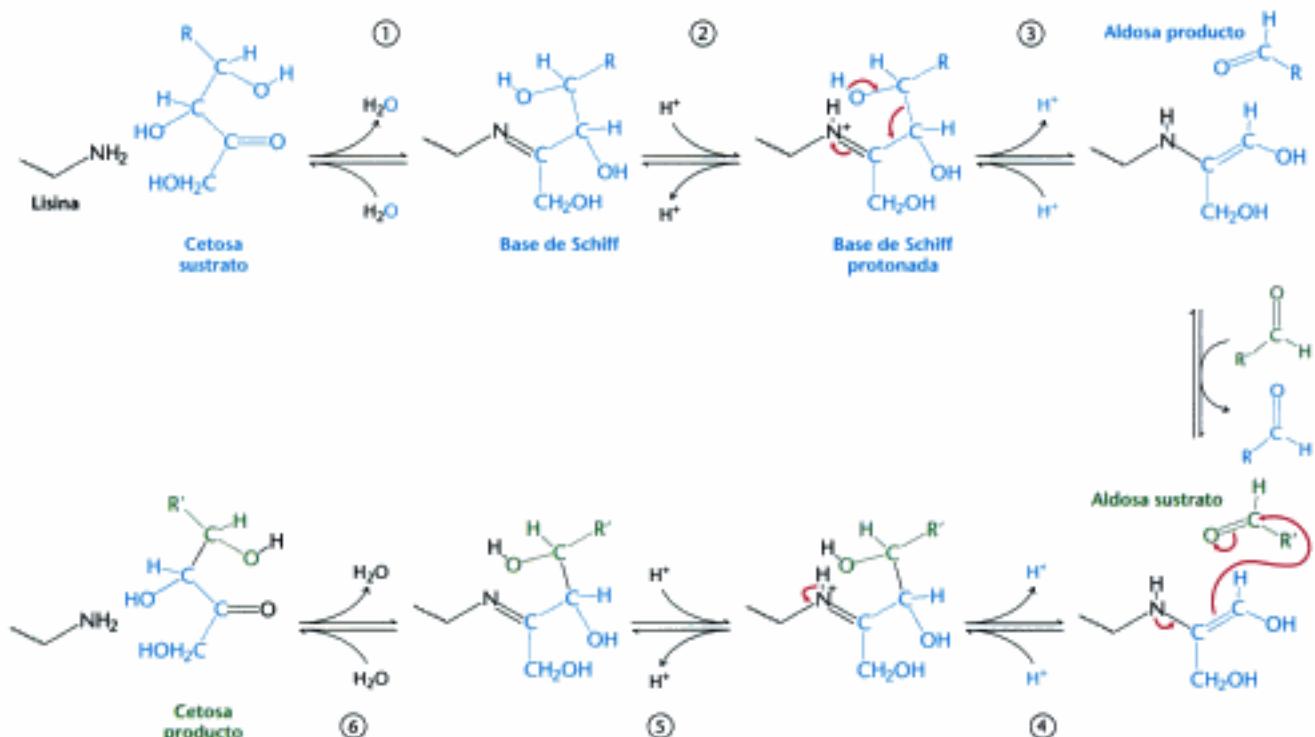


Figura 20.22 Mecanismo de la transaldolasa. (1) La reacción comienza con la formación de una base de Schiff entre un residuo de lisina de la transaldolasa y la cetosa sustrato. La protonación de la base de Schiff (2) conduce a la liberación de la aldosa producto, (3) dejando un fragmento de tres carbonos unido al residuo de lisina. (4) Este intermediario se añade a la aldosa sustrato para formar un nuevo enlace carbono-carbono. La subsiguiente desprotonación (5) e hidrólisis de la base de Schiff (6) libera la cetosa producto de la cadena lateral de lisina, completando el ciclo de reacción.

Reacción de la transaldolasa. La transaldolasa transfiere una unidad *dihidroxiacetona* de tres carbonos desde una cetosa dadora a una aldosa receptora. A diferencia con la transcetolasa, la transaldolasa no tiene grupo prostético. En este caso, *se forma una base de Schiff entre el grupo carbonilo de la cetosa sustrato y el grupo ε-amino de un residuo de lisina del centro activo del enzima* (Figura 20.22). Este tipo de intermediario covalente enzima–sustrato es equivalente al que se forma con la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa en la vía glicolítica (p. 438) y en efecto, estos enzimas son homólogos. Al protonarse la base de Schiff, el enlace entre C-3 y C-4 se rompe y se libera la aldosa. La carga negativa del núcleo carboniánico de la base de Schiff se estabiliza por resonancia. El átomo de nitrógeno cargado positivamente de la base de Schiff protonada actúa como sumidero de electrones. El aducto de la base de Schiff es estable hasta que se une con la aldosa adecuada. Entonces la unidad dihidroxiacetona reacciona con el grupo carbonilo de la aldosa. Por hidrólisis se libera la cetosa producto de la base de Schiff. En la transaldolasa el átomo de nitrógeno de la base de Schiff protonada realiza el mismo papel que el desempeñado por el átomo

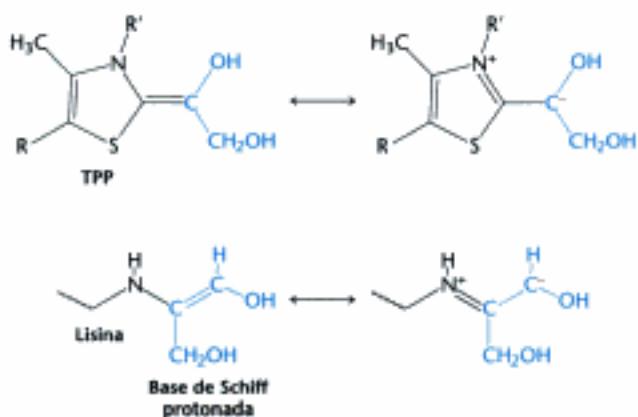


Figura 20.23 Intermediarios carbaniónicos. En la transcetolasa y transaldolasa, el intermediario carbaniónico se estabiliza por resonancia. En la transcetolasa, el TPP estabiliza al intermediario; en la transaldolasa se estabiliza mediante una base de Schiff protonada.

Hidden page

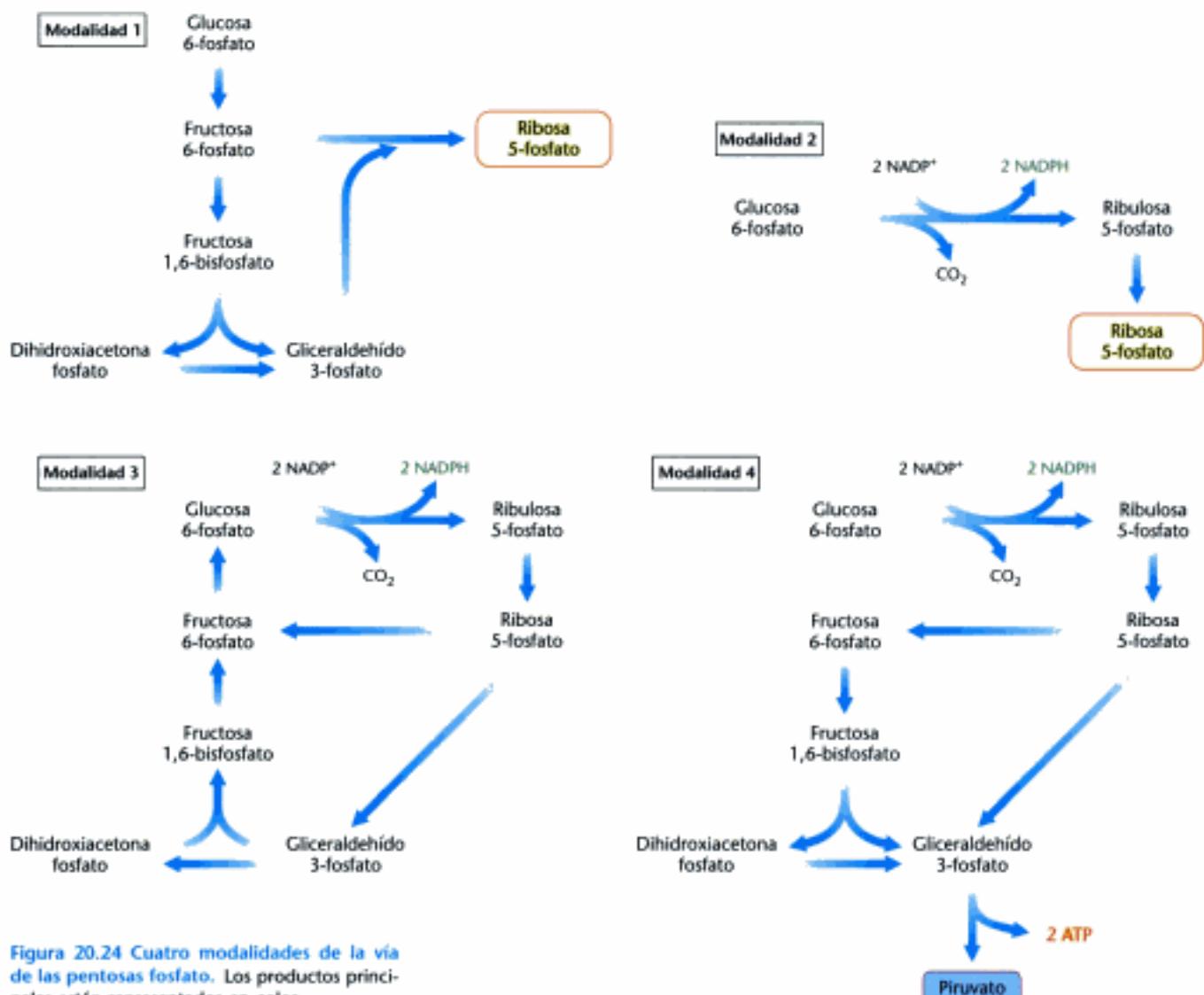
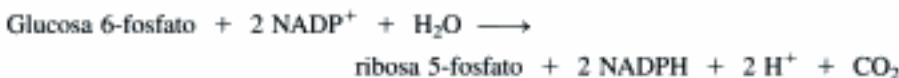


Figura 20.24 Cuatro modalidades de la vía de las pentosas fosfato. Los productos principales están representados en color.

una ribosa 5-fosfato a partir de la glucosa 6-fosfato utilizando la etapa oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. La estequiometría de la modalidad 2 es:

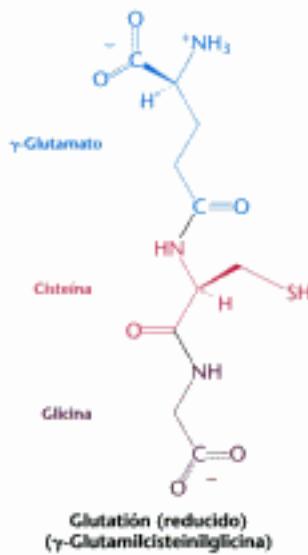


Modalidad 3. Se requiere mucho más NADPH que ribosa 5-fosfato. Por ejemplo, el tejido adiposo requiere un elevado nivel de NADPH para la síntesis de ácidos grasos (Tabla 20.4). En esta situación la glucosa 6-fosfato se oxida completamente

TABLA 20.4 Tejidos con la vía de las pentosas fosfato activa

Tejido	Funcióñ
Glándula adrenal	Síntesis de esteroides
Hígado	Síntesis de ácidos grasos y colesterol
Testículos	Síntesis de esteroides
Tejido adiposo	Síntesis de ácidos grasos
Ovarios	Síntesis de esteroides
Glándula mamaria	Síntesis de ácidos grasos
Eritrocitos	Mantenimiento del glutatión reducido

Hidden page



20.5 La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa desempeña un papel clave en la protección frente a las especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas en el metabolismo oxidativo ocasionan daños en todos los tipos de macromoléculas y su poder oxidante puede conducir en última instancia a la muerte celular. En efecto, las ROS están implicadas en muchas enfermedades del hombre (p. 517). El *glutatión* reducido (GSH), un tripéptido con un grupo sulfhidrilo libre, combate el estrés oxidativo al reducir las especies reactivas del oxígeno a formas inocuas; al concluir su trabajo queda el glutatión en su forma oxidada (GSSG) que debe reducirse para regenerar el GSH. El poder reductor lo aporta el NADPH generado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato. En consecuencia, la vía de las pentosas fosfato es importante para reducir el estrés oxidativo.

La deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa origina un tipo de anemia hemolítica inducida por fármacos

 Desde la introducción en 1926 de la pamaquina, un fármaco antipaludíco, comenzó a ser asociada con la aparición de unas dolencias graves e inexplicables. La mayoría de los pacientes la toleraban bien, pero unos pocos presentaron síntomas agudos a los pocos días de iniciarse el tratamiento. Su orina se volvía negruzca, presentaban ictericia y el contenido de hemoglobina en sangre descendía bruscamente. En algunos casos, la destrucción masiva de glóbulos rojos causaba su muerte.

Treinta años más tarde se descubrió que esta anemia hemolítica inducida por fármacos era debida a una *deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa*, el enzima que cataliza el primer paso de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. Esta anomalía que se hereda como un carácter ligado al cromosoma X, es la enzimopatía más frecuente y afecta a centenares de millones de personas. Las células con niveles reducidos de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa son especialmente sensibles al estrés oxidativo porque producen menos NADPH del necesario para restaurar el glutatión reducido como antioxidante. Este estrés es más agudo en los hematíes porque, al carecer de mitocondrias, no disponen de medios alternativos para regenerar el poder reductor. De hecho, la función principal del NADPH en los hematíes es reducir la forma disulfuro del glutatión a la forma sulfhidrilo en una reacción catalizada por la flavoproteína *glutatión reductasa*. La forma reducida del glutatión sirve como *amortiguador de sulfhidrilos* que mantiene en estado reducido los residuos cisteína de la hemoglobina y otras proteínas del eritrocito. Normalmente, la relación entre las formas reducida y oxidada del glutatión en el eritrocito es de 500 a uno.

¿Cómo la glutatión reductasa regenera el glutatión reducido? Los electrones del NADPH no se transfieren directamente al enlace disulfuro del glutatión oxidado, sino que se transfieren del NADPH a un flavina adenina dinucleótido (FAD) fuertemente unido a la reductasa, después a un puente disulfuro entre dos cisteínas de la subunidad del enzima, y finalmente al glutatión oxidado.

El glutatión reducido es imprescindible para mantener la estructura normal del eritrocito. Los hematíes con un bajo nivel de glutatión reducido son mucho más susceptibles a la hemólisis. ¿Cómo se puede explicar este fenómeno desde el punto de vista bioquímico? Podemos abordar esta cuestión planteando otra: ¿por qué el fármaco antipaludíco pamaquina destruye los hematíes? La pamaquina, un glicósido de purina presente en las habas, es un agente oxidante que conduce a la formación de peróxidos, especies reactivas de oxígeno, que pueden dañar las membranas y a otras



Vicia faba. La planta mediterránea *Vicia faba* produce habas, que contienen un glicósido de purina, la vicina. [Inga Spence/Visuals Unlimited.]



En ausencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, los peróxidos continúan dañando las membranas al carecer de NADPH para restablecer el glutatión reducido. Más aún, los grupos sulfhidrilo de la hemoglobina no pueden permanecer en la forma reducida y las moléculas de hemoglobina se entrelazan unas a otras formando agregados, denominados *corpúsculos de Heinz*, en las membranas celulares (Figura 20.25). Las membranas dañadas por los corpúsculos de Heinz u otras especies reactivas de oxígeno se deforman y terminan lisándose. Así pues, la respuesta a nuestra cuestión es que se requiere la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa para mantener los niveles de glutatión reducido como protección del estrés oxidativo. Sin embargo, en ausencia de estrés oxidativo, esta deficiencia es benigna. La existencia de esta deficiencia de deshidrogenasa de las personas que sufren sensibilidad a la pamaquina por la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es otro claro ejemplo de como *las reacciones atípicas a los fármacos pueden tener un origen genético*.

En ocasiones, una deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa puede ser una ventaja evolutiva

 La incidencia de la forma más corriente de esta deficiencia enzimática, caracterizada por una reducción de diez veces en la actividad del enzima en los eritrocitos, es del 11% en la población afro-americana. Esta elevada frecuencia sugiere que la deficiencia puede ser favorable bajo ciertas condiciones ambientales. De hecho, *la deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en los eritrocitos protege al individuo de la malaria falciparum*. Los parásitos que producen esta enfermedad requieren glutatión reducido y los productos de la vía de las pentosas fosfato para su desarrollo óptimo. Así pues, la deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es un mecanismo de protección frente a la malaria, lo que justifica su alta frecuencia en las regiones del mundo con malaria endémica. Aquí vemos de nuevo la interrelación entre la herencia y el entorno en la producción de la enfermedad.

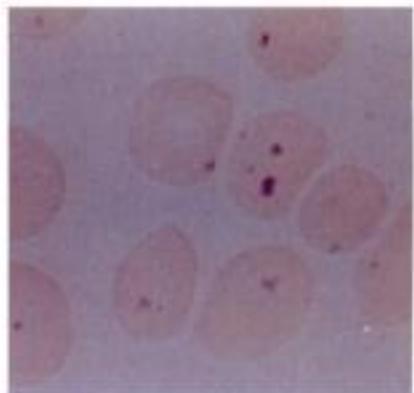


Figura 20.25 Eritrocitos con corpúsculos de Heinz. Micrografía óptica de eritrocitos procedentes de una persona deficiente en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Las partículas oscuras, denominadas corpúsculos de Heinz, situadas en el interior de las células son grumos de proteínas desnaturizadas que adhieren a la membrana plasmática y se tiñen con colorantes básicos. Los eritrocitos de estas personas son muy propensos a sufrir lesiones por oxidación. [Cortesía del Dr. Stanley Schrier.]

Resumen

20.1 El ciclo de Calvin sintetiza hexosas a partir de dióxido de carbono y agua

El ATP y NADPH formados en las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis se utilizan para convertir el CO₂ en hexosas y otros compuestos orgánicos. La fase oscura de la fotosíntesis, llamada ciclo de Calvin, comienza con la reacción del CO₂ y la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Los pasos para convertir el 3-fosfoglicerato en fructosa 6-fosfato y glucosa 6-fosfato son similares a los de la gluconeogénesis, con la salvedad de que la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa del cloroplasto es específica para NADPH en vez de serlo para NADH. En una serie de reacciones complejas se regenera la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de fructosa 6-fosfato, gliceraldehído 3-fosfato e hidroxiacetona fosfato. Algunas de las etapas en la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato son análogas a las de la vía de las pentosas fosfato. Por cada molécula de CO₂ que se convierte en una hexosa se consumen tres moléculas de ATP y dos moléculas de NADPH. Las principales reservas de carbohidratos son el almidón en los cloroplastos y la sacarosa en el citoplasma.

Hidden page

El NADPH generado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido para combatir el estrés oxidativo y para mantener el medio reductor necesario en la célula. Las células que presentan una actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa disminuida son especialmente sensibles al estrés oxidativo.

Términos clave

ciclo de Calvin (reacciones de la fase oscura) (p. 565)	fotorrespiración (p. 570)	plantas C ₄ (p. 576)
autotrofo (p. 566)	transketolasa (p. 570)	plantas C ₃ (p. 576)
heterotrofo (p. 566)	aldolasa (p. 573)	metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (p. 577)
rubisco (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) (p. 567)	almidón (p. 573)	vía de las pentosas fosfato (p. 577)
peroxisoma (microcuerpo) (p. 569)	sacarosa (p. 573)	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (p. 577)
	tiorredoxina (p. 574)	glutatión (p. 586)
	vía C ₄ (p. 576)	

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Horecker, B. L., 1976. Unravelling the pentose phosphate pathway. In *Reflections on Biochemistry* (pp. 65–72), edited by A. Kornberg, L. Cornmella, B. L. Horecker, y J. Oro. Pergamon.
- Levi, P., 1984. Carbon. In *The Periodic Table*. Random House.
- Meléndez-Hevia, E. y Isidoro, A., 1985. The game of the pentose phosphate cycle. *J. Theor. Biol.* 117:251–263.
- Barber, J. y Andersson, B., 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370:31–34.
- Rawsthorne, S., 1992. Towards an understanding of C₃-C₄ photosynthesis. *Essays Biochem.* 27:135–146.

Libros y revisiones

- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J. y Keys, A. J., 2003. Manipulation of rubisco: The amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54:1321–1333.
- Spreitzer, R. J. y Salvucci, M. E., 2002. Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:449–475.
- Wood, T., 1985. *The Pentose Phosphate Pathway*. Academic Press.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L., 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.

Enzimas y mecanismos de reacción

- Harrison, D. H., Runquist, J. A., Holub, A. y Mizorka, H. M., 1998. The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylyl kinase. *Biochemistry* 37:5074–5085.
- Mizorka, H. M., 2000. Phosphoribulokinase: Current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74:95–127.
- Thorell, S., Gergely, P., Jr., Banki, K., Perl, A. y Schneider, G., 2000. The three-dimensional structure of human transaldolase. *FEBS Lett.* 475:205–208.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U. y Sundstrom, M., 1992. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 11:2373–2379.

Robinson, B. H. y Chun, K., 1993. The relationships between transketolase, yeast pyruvate decarboxylase and pyruvate dehydrogenase of the pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* 328:99–102.

Fijación del dióxido de carbono y rubisco

- Sugawara, H., Yamamoto, H., Shiba, N., Inoue, T., Okada, S., Miyake, C., Yokota, A. y Kai, Y., 1999. Crystal structure of carboxylase reaction-oriented ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic red alga, *Galdieria partita*. *J. Biol. Chem.* 274:15655–15661.
- Hansen, S., Volland, V. B., Hough, E. y Andersen, K., 1999. The crystal structure of rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded beta-barrel formed by beta-strands from four subunits. *J. Mol. Biol.* 288:609–621.
- Knight, S., Andersson, I. y Branden, C. I., 1990. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.* 215:113–160.
- Taylor, T. C. y Andersson, I., 1997. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* 265:432–444.
- Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C. y Lorimer, G. H., 1998. Mechanism of rubisco: The carbamate as general base. *Chem. Rev.* 98:549–561.
- Buchanan, B. B., 1992. Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33:147–162.
- Hatch, M. D., 1987. C₄ photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy, and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895:81–106.
- ### Regulación
- Graciet, E., Lebreton, S. y Gontero, B., 2004. The emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein/protein interactions: A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex. *J. Exp. Bot.* 55:1245–1254.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. y Buchanan, B. B., 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:370–375.
- Rokka, A., Zhang, L. y Aro, E.-M., 2001. Rubisco activase: An enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* 25:463–472.

Hidden page

fosfopentosa epimerasa, fosfopentosa isomerasa y gliceraldehído 3-fosfato. ¿Cuál es la distribución del marcado radiactivo en la eritrosa 4-fosfato y la fructosa 6-fosfato formadas en esta mezcla de reacción?

12. *Estequiométrias de síntesis.* ¿Cuál es la estequiometría de la síntesis de: (a) ribosa 5-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato sin la generación concomitante de NADPH; (b) NADPH a partir de glucosa 6-fosfato sin la formación concomitante de azúcares pentosas?

13. *Atrapar la lisina reactiva.* Diseñar un experimento químico para identificar el residuo de lisina que forma la base de Schiff en el centro activo de la transaldolasa.

14. *Poder reductor.* ¿Qué proporción de NADPH a NADP⁺ se requiere para mantener [GSH] = 10 mM y [GSSG] = 1 mM? Utilizar los potenciales redox facilitados en la Tabla 18.1.

Problemas de mecanismos

15. *Un mecanismo alternativo.* El mecanismo de acción de algunas aldolasas no incluye intermediarios de bases de Schiff. En su lugar, estos enzimas precisan de la unión con iones metálicos. Proponer un mecanismo en este sentido para la conversión de la dihidroxiacetona fosfato y del gliceraldehído 3-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato.

16. *Un intermediario recurrente.* La fosfopentosa isomerasa interviene la ribosa 5-fosfato (aldosa) en ribulosa 5-fosfato (cetosa). Proponer un mecanismo.

Problemas de integración del capítulo

17. *Capturando carbonos.* Los experimentos con marcado radiactivo permiten estimar cuánta glucosa 6-fosfato se metaboliza mediante la vía de las pentosas fosfato y cuánta se metaboliza mediante la acción combinada de la glicolisis y del ciclo del ácido cítrico. Supongamos que se dispone de dos muestras de tejidos diferentes y de dos muestras de glucosa con marcado radiactivo en diferentes posiciones: una marcada con ¹⁴C en C-1 y la otra marcada con ¹⁴C en C-6. Diseñar un experimento que permita determinar la actividad relativa del metabolismo aerobio de la glucosa en comparación con el metabolismo de la vía de las pentosas fosfato.

18. *Eficacia de la fotosíntesis.* Estimar la eficacia de la fotosíntesis utilizando los datos siguientes.

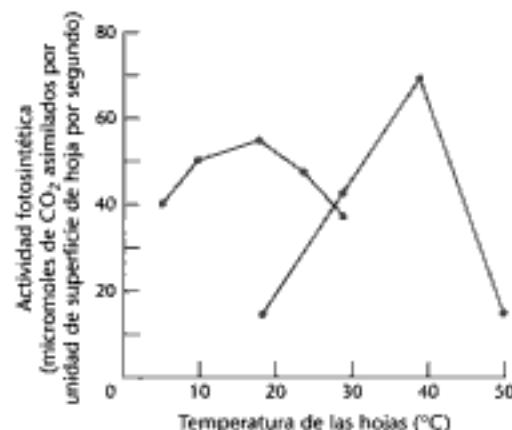
El ΔG° para la reducción del CO₂ hasta una hexosa es +477 kJ mol⁻¹ (+114 kcal mol⁻¹).

Un mol de fotones de 600 nm contiene una energía de 199 kJ (47,6 kcal).

Suponer que el gradiente de protones generado en la producción del NADPH necesario es suficiente para permitir la síntesis del ATP que se necesita.

Problema de Interpretación de datos

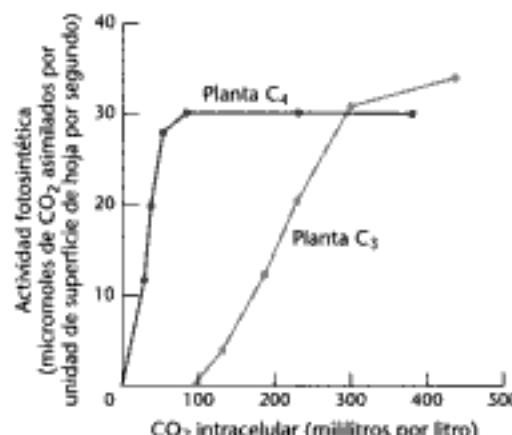
19. El gráfico A muestra la actividad fotosintética en función de la temperatura de las hojas de dos especies de plantas, una es C₄ y la otra C₃.



(a) ¿Qué datos corresponden a la planta C₄ y cuáles a la C₃? Razónar la respuesta.

(b) Sugerir algunas explicaciones posibles para justificar el descenso de la actividad fotosintética con el aumento de la temperatura.

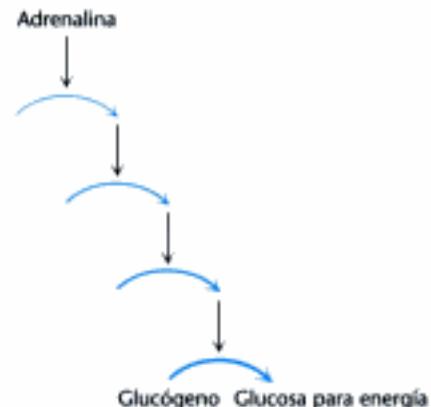
El gráfico B muestra como la actividad fotosintética de las plantas C₃ y C₄ varía en función de la concentración de CO₂ cuando permanecen constantes la temperatura (30 °C) y la intensidad lumínosa (alta).



(c) ¿Por qué pueden las plantas C₄ prosperar en concentraciones de CO₂ que no permiten el crecimiento de las plantas C₃?

(d) Sugerir una explicación posible para justificar el porqué las plantas C₃ continúan incrementando su actividad fotosintética al aumentar la concentración de CO₂, en tanto que las plantas C₄ se estabilizan.

Metabolismo del glucógeno



Las señales en cascada conducen a la movilización del glucógeno para producir glucosa, una fuente de energía para los corredores. [(Izquierda) Mike Powell/Allsport.]

Contenido

- 21.1 La degradación del glucógeno requiere la intervención de varios enzimas
- 21.2 La fosforilasa se regula por interacciones allostéricas y por fosforilación reversible
- 21.3 La adrenalina y el glucagón indican la necesidad de degradar el glucógeno
- 21.4 El glucógeno se sintetiza y degrada por vías diferentes
- 21.5 La degradación y la síntesis del glucógeno se regulan recíprocamente

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa fácilmente movilizable. Es un polímero muy grande y ramificado de residuos de glucosa (Figura 21.1) que se puede romper dando lugar a moléculas de glucosa cuando el consumo de energía es necesario. La mayoría de los residuos de glucosa del glucógeno están unidos por enlaces glicosídicos α -1,4. Las ramificaciones, que aparecen aproximadamente cada diez residuos, se forman por enlaces glicosídicos α -1,6. Recordemos que los enlaces α -glicosídicos forman polímeros helicoidales abiertos, mientras que los enlaces β producen hebras casi rectas que constituyen fibrillas estructurales, como en la celulosa (p. 312).

El glucógeno no está tan reducido como los ácidos grasos y, en consecuencia, no es tan rico en energía. Entonces ¿por qué no almacenar todo el exceso de combustible como ácidos grasos en lugar de formar glucógeno? La liberación controlada de glucosa desde el glucógeno mantiene los niveles de glucosa en sangre entre las co-

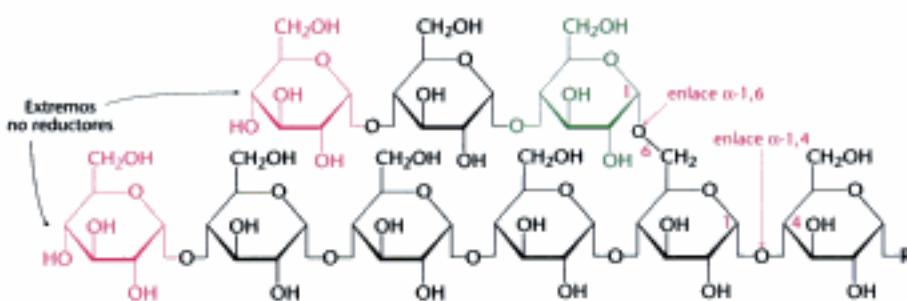
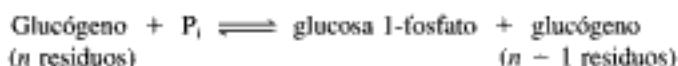


Figura 21.1 Estructura del glucógeno. En esta estructura de dos ramas exteriores de una molécula de glucógeno los residuos de los extremos no reductores se muestran en rojo y el residuo que inicia una ramificación en verde. El resto de la molécula de glucógeno está representado por R.

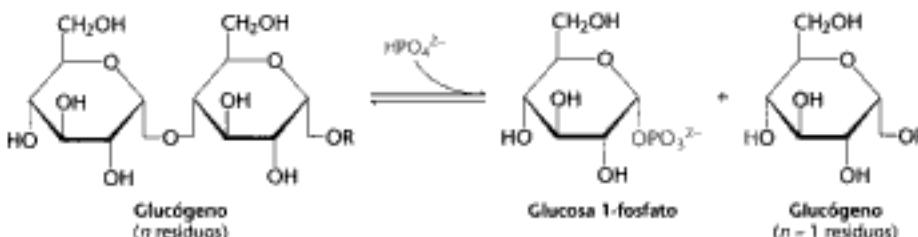
Hidden page

La fosforilasa cataliza la escisión fosforolítica del glucógeno para dar glucosa 1-fosfato

La *glucógeno fosforilasa*, enzima clave en la degradación del glucógeno, escinde su sustrato mediante la adición de ortofosfato (P_i) para producir *glucosa 1-fosfato*. La ruptura de un enlace por la adición de ortofosfato se reconoce como *fosforolisis*.



La fosforilasa cataliza la eliminación secuencial de residuos glucosílicos desde los extremos no reductores de la molécula de glucógeno (los extremos que presentan un grupo OH libre en el C-4; p. 309). El enlace glicosídico entre el C-1 del residuo terminal y el C-4 del residuo adyacente se rompe por el ortofosfato. Concretamente, rompe el enlace entre el átomo de carbono C-1 y el átomo de oxígeno glicosídico, de modo que se mantiene la configuración α en el C-1.



El enzima fosfoglucomutasa puede convertir la glucosa 1-fosfato liberada del glucógeno en glucosa 6-fosfato (p. 595), un intermediario metabólico importante.

La reacción que cataliza la fosforilasa es fácilmente reversible *in vitro*. A pH 6,8 la proporción entre ortofosfato y glucosa 1-fosfato en el equilibrio es de 3,6. El valor de ΔG° para esta reacción es pequeño debido a que el enlace glicosídico se sustituye por un enlace fosforiléster que tiene un potencial de transferencia casi idéntico. Sin embargo, *in vivo* la fosforolisis transcurre en el sentido de la degradación del glucógeno porque la proporción $[P_i]/[\text{glucosa 1-fosfato}]$ es generalmente superior a 100, lo que favorece sustancialmente la fosforolisis. Vemos aquí un ejemplo de cómo la célula puede alterar el incremento de energía libre de una reacción por un cambio en la proporción de sustrato y producto, lo que permite que cambiar el sentido de la reacción.

La escisión fosforolítica del glucógeno es energéticamente ventajosa porque el azúcar que se libera está fosforilado. Por el contrario, una escisión hidrolítica produciría glucosa, la cual luego tendría que ser fosforilada a expensas de la hidrólisis de una molécula de ATP para entrar en la vía glicolítica. Una ventaja adicional de la escisión fosforolítica en las células musculares es que, al no disponer de transportadores adecuados, la glucosa 1-fosfato, que está cargada negativamente en condiciones fisiológicas, no puede ser transportada fuera de la célula.

Para la degradación del glucógeno se necesita también un enzima desramificante

La glucógeno fosforilasa, por sí sola, puede degradar el glucógeno hasta un cierto límite. El enzima pronto encuentra un obstáculo. Los enlaces glicosídicos α -1,6 de los puntos de ramificación, no son susceptibles de escisión por la fosforilasa. De hecho, la fosforilasa cesa de escindir enlaces α -1,4 cuando llega a un residuo terminal situado a cuatro residuos del punto de ramificación. Como hay un punto de ramificación aproximadamente cada diez residuos, la degradación del glucógeno por la fosforilasa se detendría después de la liberación de seis moléculas de glucosa por cada ramificación.

¿Cómo se puede movilizar el resto de la molécula de glucógeno para utilizarla como combustible? Dos enzimas adicionales, una *transferasa* y la α -1,6-glicosidasa,

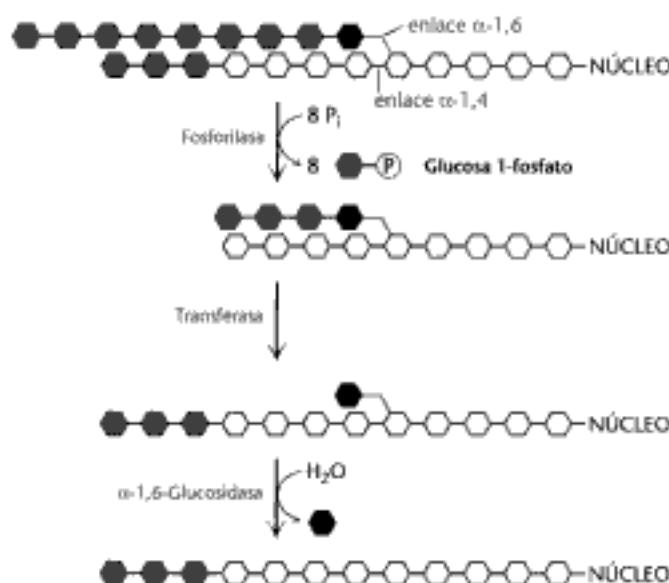
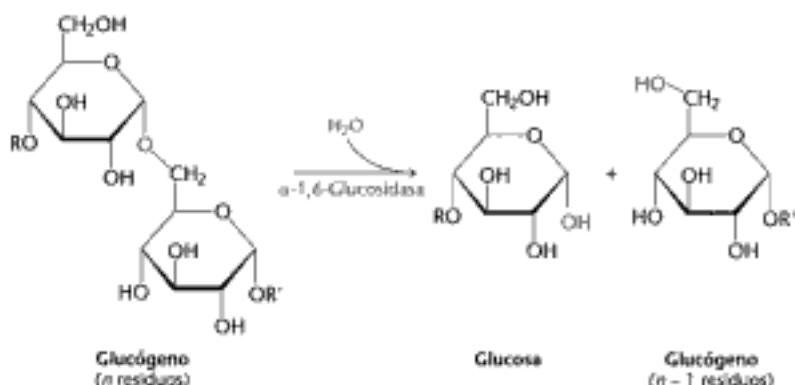


Figura 21.4 Remodelación del glucógeno. Primero la fosforilasa rompe los enlaces α -1,4-glicosídicos de cada rama dejando una longitud de cuatro residuos en cada rama. Luego, la transferasa desplaza un bloque de tres residuos de glucosa de una rama a otra. En esta reacción, se rompe la unión α -1,4-glicosídica entre los residuos azul y verde y se forma un nuevo enlace α -1,4 entre los residuos azul y amarillo. Entonces, la α -1,6-glucosidasa elimina el residuo verde, dejando una cadena lineal con todas las uniones α -1,4, apropiada para escisiones posteriores por la fosforilasa.

remodelan el glucógeno para que la fosforilasa continúe con su degradación (Figura 21.4). La transferasa traslada un bloque de tres residuos glicosídicos desde una rama externa a otra. Esta transferencia deja expuesto un solo residuo de glucosa unido por un enlace glicosídico α -1,6. La α -1,6-glucosidasa, también conocida como el enzima desramificante, hidroliza el enlace glicosídico α -1,6, liberando una molécula de glucosa libre, que luego se fosforila por el enzima glicolítico hexoquinasa.



Así, la transferasa y la α -1,6-glucosidasa convierten la estructura ramificada en otra lineal, la cual es de nuevo abordable para su escisión posterior por la fosforilasa. Es interesante advertir que, en eucariotas, las actividades transferasa y α -1,6-glucosidasa están contenidas en una única cadena polipeptídica de 160 kd, lo cual es otro ejemplo de un enzima bifuncional (Sección 16.2). Además, estos enzimas pueden tener características adicionales en común (Sección 21.4).

La fosfoglucomutasa convierte la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato

La glucosa 1-fosfato formada en la escisión fosforolítica del glucógeno se debe transformar en glucosa 6-fosfato para entrar en la corriente metabólica principal. Este desplazamiento del grupo fosforilo está catalizado por la *fosfoglucomutasa*. Recordemos que este enzima se utiliza también en el metabolismo de la galactosa (p. 450). Para efectuar este desplazamiento, el enzima intercambia un grupo fosforilo con el sustrato (Figura 21.5). El centro catalítico de una molécula activa de mutasa contiene un residuo de serina fosforilado. El grupo fosforilo se transfiere del residuo de se-

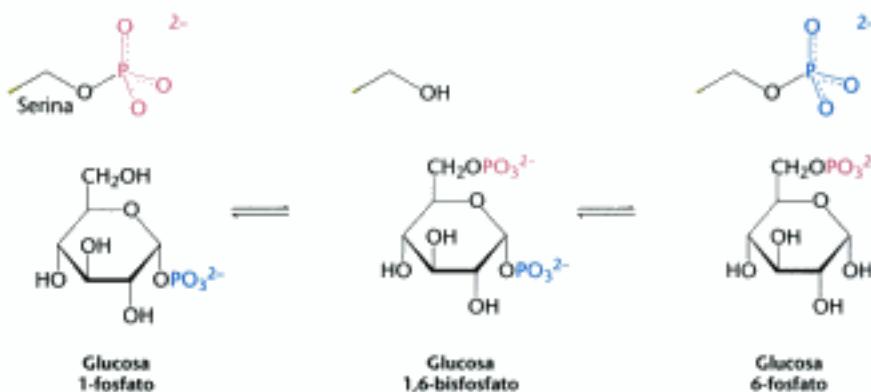


Figura 21.5 Reacción catalizada por la fosfoglucomutasa. Se transfiere un grupo fosforilo desde el enzima al sustrato que devuelve al enzima otro grupo fosforilo diferente para restablecer su estado inicial.

rina al grupo hidroxilo C-6 de la glucosa 1-fosfato para formar glucosa 1,6-bisfosfato. El grupo fosforilo C-1 de este intermediario vuelve entonces al mismo residuo de serina, dando como resultado la formación de glucosa 6-fosfato y la regeneración del fosfoenzima.

Estas reacciones son similares a las de la *fosfoglicerato mutasa*, un enzima glicolítico (p. 444). El papel de la glucosa 1,6-bisfosfato en la interconversión de las fosfoglucosas se asemeja al del 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) en la interconversión de 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato en la glicolisis. En ambas reacciones participa como intermediario un fosfoenzima.

El hígado contiene glucosa 6-fosfatasa, un enzima hidrolítico ausente en el músculo

Una función esencial del hígado es mantener relativamente constante el nivel de glucosa en sangre. El hígado libera glucosa a la sangre durante la actividad muscular y en los intervalos entre las comidas para que puedan consumirla principalmente el cerebro y el músculo esquelético. Sin embargo, la glucosa fosforilada producida por la degradación del glucógeno, en contraste con la glucosa libre, no se transporta fuera de las células. El hígado contiene un enzima hidrolítico, la glucosa 6-fosfatasa, que permite que la glucosa abandone este órgano. Este enzima escinde el grupo fosforilo produciendo glucosa libre y ortofosfato. Esta glucosa 6-fosfatasa, localizada en la membrana interna del retículo endoplásmico liso y orientada hacia el lumen, es el mismo enzima que libera glucosa libre al final de la gluconeogénesis. Recordemos que la glucosa 6-fosfato se transporta al interior del retículo endoplásmico y la glucosa y el ortofosfato formados en la hidrólisis son devueltos al citoplasma (p. 463).



La glucosa 6-fosfatasa no se encuentra en la mayoría de los tejidos. Por tanto, en ellos la glucosa 6-fosfato es retenida para la generación de ATP. En cambio, la glucosa no es un combustible importante para el hígado.

Mecanismo: el piridoxal fosfato participa en la escisión fosforolítica del glucógeno

Estudiaremos ahora el mecanismo catalítico de la glucógeno fosforilasa. Este enzima es un dímero de dos subunidades idénticas de 97 kd. Cada subunidad se pliega de forma compacta en un *dominio amino terminal* (480 residuos) que contiene un sitio de unión de glucógeno y un *dominio carboxilo terminal* (360 residuos; Figura 21.6). El centro catalítico de cada subunidad se localiza en una profunda hendidura formada por residuos de los dominios amino y carboxilo terminales. El reto acometido por la fosforilasa es romper el glucógeno de forma fosforolítica y no hidrolítica y ahorrar así el ATP que sería requerido para fosforilar la glucosa libre. Esta ruptura exige que se excluya el agua del centro activo.

Hidden page

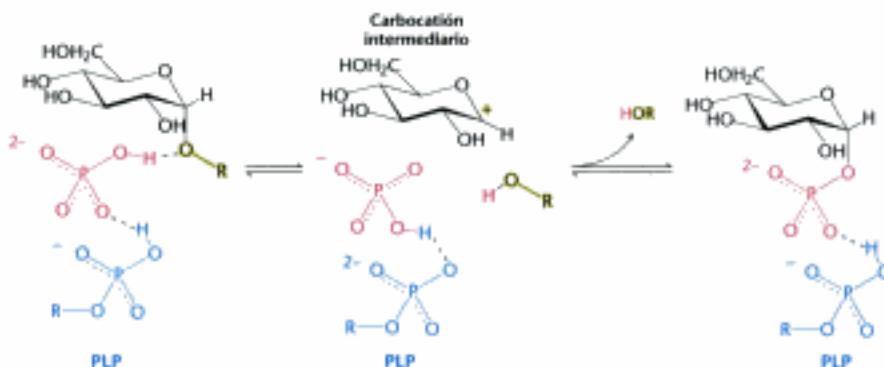


Figura 21.8 Mecanismo de la fosforilasa. La unión de un grupo HPO_4^{2-} (rojo) favorece la escisión del enlace glicosídico al aportar un protón a la glucosa saliente (negro). Esta reacción conduce a la formación de un carbocatión y está favorecida por la transferencia de un protón desde el grupo fosfato protonado del piridoxal fosfato (PLP) unido (azul). El carbocatión y el ortofosfato se combinan formando la glucosa 1-fosfato.

El centro de unión de glucógeno está a 30 Å del centro catalítico (ver Figura 21.6), pero está conectado con éste por una estrecha hendidura capaz de alojar cuatro o cinco unidades de glucosa. La amplia separación entre el centro de unión y el centro catalítico permite al enzima la fosforolisis de varios residuos sin tener que dissociarse y reasociarse después de cada ciclo catalítico. Un enzima capaz de catalizar varias reacciones sin tener que dissociarse y reasociarse después de cada paso catalítico se denomina *progresivo*; una propiedad de enzimas que sintetizan y degradan grandes polímeros. Veremos este tipo de enzimas cuando tratemos la síntesis de DNA y RNA.

21.2 La fosforilasa se regula por interacciones alostéricas y por fosforilación reversible

El metabolismo del glucógeno se controla con precisión por múltiples mecanismos interconectados. El epicentro de este control es el enzima glucógeno fosforilasa. *La fosforilasa se regula por varios efectores allostéricos que reflejan el estado energético de la célula así como por fosforilación reversible, la cual responde a hormonas tales como insulina, adrenalina y glucagón.* Examinaremos las diferencias en el control del metabolismo del glucógeno en dos tejidos: músculo esquelético e hígado. Estas diferencias se deben al hecho de que *el músculo utiliza la glucosa para producir energía para sí mismo mientras que el hígado mantiene la homeostasis de glucosa del conjunto del organismo.*

La fosforilasa de músculo se regula por la carga energética intracelular

La fosforilasa de músculo esquelético es dimérica y existe en dos formas interconvertibles: una fosforilasa *a* generalmente activa y una fosforilasa *b* generalmente inactiva (Figura 21.9). Estas dos formas existen en equilibrio entre un estado relajado activo (R) y un estado tenso mucho menos activo (T), pero el equilibrio para la fosforilasa *a* favorece el estado R mientras que el equilibrio para la fosforilasa *b* favorece el estado T (Figura 21.10). La fosforilasa *a* y la fosforilasa *b* se diferencian por un único grupo fosforilo en cada subunidad. La fosforilasa *b* muscular es activa solamente en presencia de altas concentraciones de AMP, molécula que se une al centro de unión de nucleótidos y estabiliza la conformación de la fosforilasa *b* en el estado activo (Figura 21.11). El ATP actúa como un efecto alostérico ne-

Hidden page

Hidden page

Hidden page

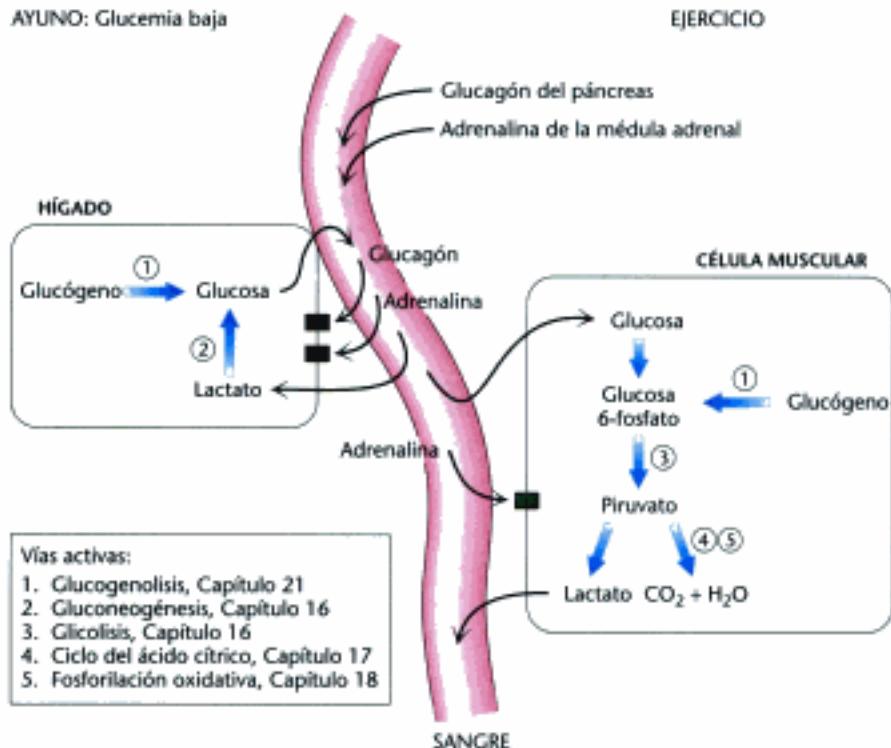


Figura 21.14 Integración de la vía: control hormonal de la glucogenólisis. El glucagón estimula la glucogenólisis hepática cuando la glucemia es baja. La adrenalina estimula la degradación del glucógeno en músculo e hígado para generar combustible para la contracción muscular.

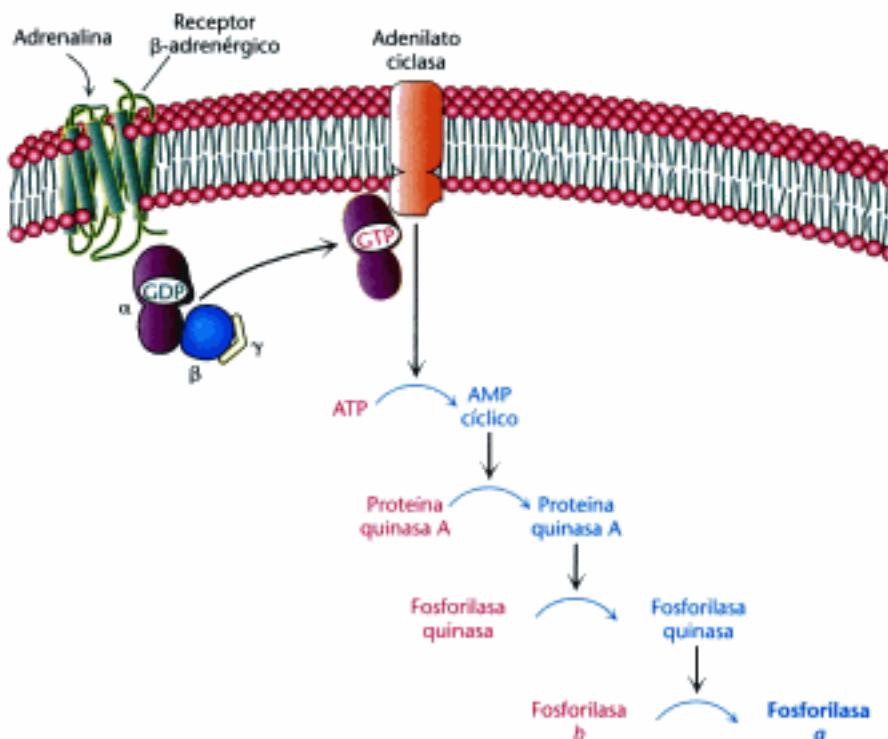


Figura 21.15 Cascada reguladora de la glucogenólisis. La degradación del glucógeno se estimula por la unión de la hormona a los receptores 7TM. La unión de la hormona inicia una vía de transducción de la señal dependiente de proteínas G que concluye con la fosforilación y activación de la glucogeno fosforilasa.

Hidden page

un grupo fosforilo hace que el enzima sea mejor sustrato para la desfosforilación y la consiguiente inactivación por el enzima *proteína fosfatasa 1 (PP1)*. La proteína fosfatasa 1 también elimina el grupo fosforilo de la glucógeno fosforilasa, convirtiendo al enzima a su forma *b* normalmente inactiva.

La regulación de la glucógeno fosforilasa se hizo más compleja a medida que el enzima evolucionó

 El análisis de las estructuras primarias de la glucógeno fosforilasa en humanos, ratas, *Dictyostelium* (moho del limo), levadura, patata y *E. coli* han permitido realizar deducciones sobre la evolución de este importante enzima. Los 16 residuos que están en contacto con la glucosa en el centro activo son idénticos en casi todos los enzimas estudiados. Existe mayor variación, aunque persiste una conservación sustancial, entre los 15 residuos del centro de unión al piridoxal fosfato. El centro de unión de glucógeno también está relativamente bien conservado en todos los enzimas. El alto grado de similitud del centro activo, del centro de unión de piridoxal fosfato y del centro de unión de glucógeno muestra que el mecanismo catalítico se ha mantenido a lo largo de la evolución.

Sin embargo, las diferencias aparecen cuando se comparan los centros reguladores. El tipo de regulación más sencillo sería la inhibición por retroalimentación por la glucosa 6-fosfato. Realmente, el centro regulador de la glucosa 6-fosfato está muy conservado en la mayoría de las fosforilasas. Los residuos aminoacídicos cruciales que participan en la regulación por fosforilación y unión de nucleótidos están conservados solamente en los enzimas de mamíferos. Por tanto, este nivel de regulación fue una adquisición evolutiva tardía.

21.4 El glucógeno se sintetiza y degrada por vías diferentes

Como se ha visto en la glicólisis y en la gluconeogénesis, las vías biosintéticas y degradativas rara vez operan exactamente con las mismas reacciones, en las direcciones directa e inversa. El metabolismo del glucógeno supuso el primer ejemplo conocido de este principio importante. *Las vías separadas permiten una mayor flexibilidad, tanto en el control como en la energética.*

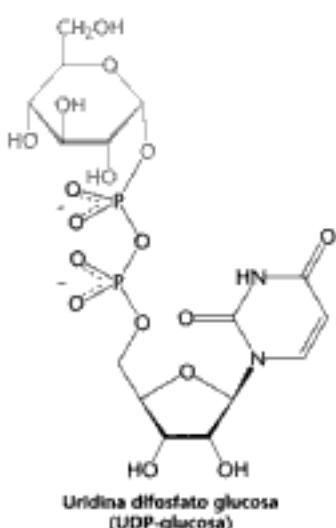
En 1957, Luis Leloir y sus colaboradores demostraron que el glucógeno se sintetiza por una vía que utiliza uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) en vez de glucosa 1-fosfato como el dador activado de glucosa.



La UDP-glucosa es una forma activada de la glucosa

La UDP-glucosa, el dador de glucosa en la biosíntesis del glucógeno, es una *forma activada de la glucosa*, como el ATP y el acetil-CoA son formas activadas del ortofosfato y del acetato respectivamente. El átomo de carbono C-1 de la unidad glucosilo de la UDP-glucosa se activa porque su grupo hidroxilo se esterifica con el componente difosfato del UDP.

La UDP-glucosa se sintetiza a partir de glucosa 1-fosfato y uridina trifosfato (UTP) en una reacción catalizada por la *UDP-glucosa pirofosforilasa*. El pirofosfato liberado en esta reacción proviene de los dos residuos fosforilo externos del UTP.



Hidden page

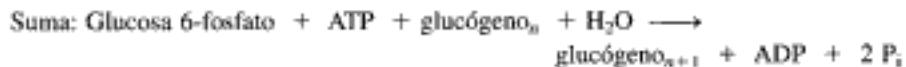
Hidden page

La glucógeno sintasa es el enzima regulador clave en la síntesis de glucógeno

La actividad de la glucógeno sintasa, al igual que la de la fosforilasa, está regulada por modificación covalente. La glucógeno sintasa se fosforila en múltiples puntos por varias proteína quinasas; entre ellas la proteína quinasa A y la glucógeno sintasa quinasa (GSK). La alteración de las cargas en la proteína conduce a su inactivación. *La fosforilación produce efectos antagonicos sobre las actividades enzimáticas de la glucógeno sintasa y de la fosforilasa.* La fosforilación convierte la forma activa *a* de la sintasa en la forma *b* normalmente inactiva. La forma *b* fosforilada requiere un alto nivel del activador alostérico glucosa 6-fosfato para activarse, mientras que la forma *a* es activa esté presente o no la glucosa 6-fosfato.

El glucógeno es una forma eficiente de almacenamiento de glucosa

¿Cuál es el costo de la conversión de la glucosa 6-fosfato en glucógeno y de la reconversión de éste en glucosa 6-fosfato? Las reacciones correspondientes ya han sido descritas, exceptuando la reacción 5, que es la regeneración del UTP. El ATP fosforila al UDP en una reacción catalizada por la *nucleósido difosfoquinasa*.



Así pues, en la incorporación de glucosa 6-fosfato al glucógeno se hidroliza un ATP. La energía liberada por la degradación del glucógeno es muy eficiente. Alrededor del 90% de los residuos se escinden fosforolíticamente produciendo glucosa 1-fosfato, que se convierte, sin gasto alguno, en glucosa 6-fosfato. El otro 10% son residuos de ramificación que se rompen por hidrólisis. En este caso se utiliza una molécula de ATP para fosforilar cada una de esas moléculas de glucosa hasta glucosa 6-fosfato. La oxidación completa de la glucosa 6-fosfato libera unas 31 moléculas de ATP, y el almacenamiento consume algo más de una molécula de ATP por molécula de glucosa 6-fosfato; así la *eficiencia global del almacenamiento es casi del 97%*.

21.5 La degradación y la síntesis del glucógeno se regulan recíprocamente

Un importante mecanismo de control previene que el glucógeno se sintetice al mismo tiempo que se degrada. *Las mismas cascadas desencadenadas por el glucagón y la adrenalina que inician la degradación de glucógeno en el hígado y el músculo, paralizan la síntesis de glucógeno. El glucagón y la adrenalina controlan la degradación y síntesis del glucógeno a través de la proteína quinasa A* (Figura 21.17). Recordemos que la proteína quinasa A añade un grupo fosforilo a la fosforilasa quinasa, activando el enzima e iniciando la degradación del glucógeno. Del mismo modo, la proteína quinasa A adiciona un grupo fosforilo a la glucógeno sintasa, lo cual da lugar a un descenso de la actividad enzimática. Otras quinasas, como la glucógeno sin-

Hidden page

Hidden page

Hidden page

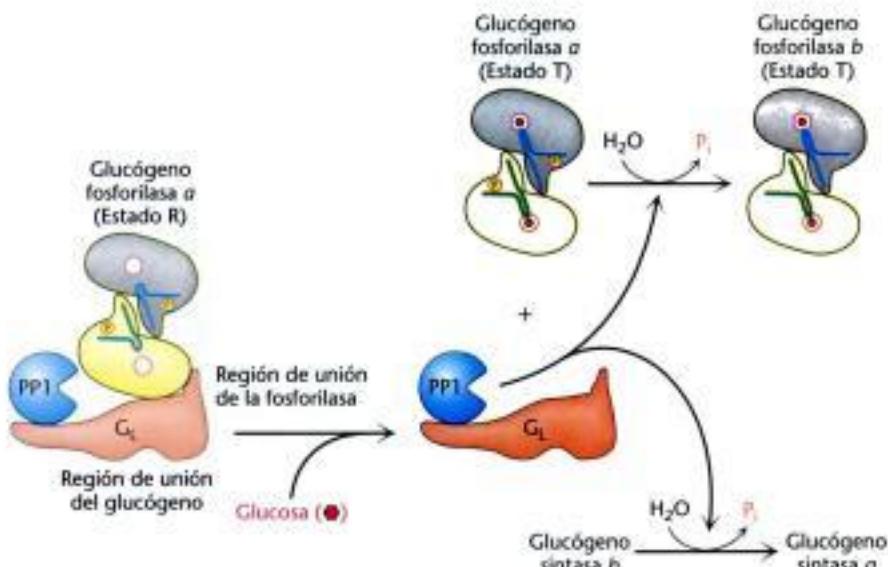


Figura 21.22 Regulación del metabolismo del glucógeno hepático por glucosa. La glucosa se une a la glucógeno fosforilasa α en el hígado y la inhibe, facilitando la formación del estado T de la fosforilasa α . El estado T de la fosforilasa α no une a la proteína fosfatasa 1 (PP1) promoviendo la disociación y activación de la glucógeno fosforilasa α . La PP1 libre desfosforila a la glucógeno fosforilasa α y a la glucógeno sintasa β , inactivando la degradación y activando la síntesis del glucógeno.

geno sintasa, y (3) la unión de la fosfatasa a la fosforilasa α para evitar la activación prematura de la glucógeno sintasa.

Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno pueden entenderse en términos bioquímicos

 La primera enfermedad de almacenamiento de glucógeno fue descrita por Edgar von Gierke en 1929. Un paciente con esta enfermedad presenta un abdomen voluminoso producido por una *dilatación masiva del hígado*. Cursa con una *hipoglucemia* pronunciada entre las comidas y, además, el nivel de glucosa en sangre no se eleva con la administración de adrenalina y glucagón. Un niño con esta enfermedad de almacenamiento de glucógeno puede tener convulsiones debido a que el nivel de glucosa en sangre es bajo.

El defecto enzimático de la enfermedad de von Gierke se dilucidó en 1952 por Carl y Gerty Cori. Descubrieron que *el hígado de un paciente con esta enfermedad carecía de glucosa 6-fosfatasa*. Esta fue la primera demostración de una deficiencia congénita de un enzima hepático. El glucógeno del hígado es de estructura normal pero está presente en cantidades anormalmente elevadas. La ausencia de glucosa 6-fosfatasa en el hígado produce hipoglucemia, puesto que no se puede formar glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato. Este azúcar fosforilado no puede salir del hígado porque es incapaz de atravesar la membrana plasmática. El exceso de glucosa 6-fosfato provoca un incremento de la glicolisis en el hígado, lo que conduce a un nivel elevado de lactato y piruvato en la sangre. Los pacientes con la enfermedad de von Gierke también muestran mayor dependencia del metabolismo graso. Esta enfermedad puede también producirse por una mutación en el gen que codifica el *transportador de la glucosa 6-fosfato*. Recordemos que la glucosa 6-fosfato debe ser transportada al lumen del retículo endoplásmico para que la hidrolice la fosfatasa (p. 463). Pueden asimismo originar la enfermedad de von Gierke las mutaciones en otras tres proteínas esenciales de este sistema.

Se han caracterizado otras siete enfermedades de almacenamiento del glucógeno (Tabla 21.1). En la enfermedad de Pompe (tipo II) los lisosomas se quedan repletos de glucógeno porque carecen de α -1,4-glucosidasa, un enzima hidrolítico normalmente confinado en estos orgánulos (Figura 21.23). Los Cori descubrieron el efecto bioquímico de otra enfermedad de almacenamiento de glucógeno (tipo III), que no puede distinguirse de la enfermedad de von Gierke (tipo I) por simple exploración del paciente. En la enfermedad tipo III, la estructura del glucógeno hepático y muscular es anormal y se produce un fuerte incremento en su cantidad. Lo más sorprendente es que las ramas externas del glucógeno son muy cortas. *Los pacientes que sufren este tipo de glucogenosis carecen del enzima desramificante (α -1,6-glucosidasa)*.



Figura 21.23 Lisosoma repleto de glucógeno. Esta micrografía electrónica muestra el músculo esquelético de un niño con la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (enfermedad de Pompe). Los lisosomas están llenos de glucógeno debido a una deficiencia en la α -1,4-glucosidasa, un enzima hidrolítico confinado en los lisosomas. La cantidad de glucógeno en el citoplasma es normal. [Tomado de H.-G. Hers y F. Van Hoof, Eds. *Lysosomes and Storage Diseases* (Academic Press, 1973), p.205.]

TABLA 21.1 Enfermedades de almacenamiento de glucógeno

Tipo	Enzima defectuosa	Órgano afectado	Glucógeno en el órgano afectado	Características clínicas
I Enfermedad de Von Gierke	Glucosa 6-fosfatasa o sistema de transporte	Hígado y riñón	Cantidad incrementada; estructura normal.	Desarrollo voluminoso del hígado. Incapacidad de desarrollo. Grave hipoglucemía, cetosis, hiperuricemia, hiperlipemia.
II Enfermedad de Pompe	α -1,4-Glucosidasa (lisosómica)	Todos los órganos	Cantidad masivamente incrementada; estructura normal.	Un paro cardiorrespiratorio causa la muerte, generalmente antes de los dos años de edad.
III Enfermedad de Cori	Amilo-1,6-glucosidasa (enzima desramificante)	Músculo e hígado	Cantidad incrementada; ramificaciones externas cortas.	Igual que el tipo I, pero con un curso más benigno.
IV Enfermedad de Andersen	Enzima ramificante (α -1,4 \longrightarrow α -1,6)	Hígado y bazo	Cantidad normal; muy largas las ramas externas.	Cirrosis progresiva del hígado. Un fallo hepático origina la muerte generalmente antes de los dos años.
V Enfermedad de McArdle	Fosforilasa	Músculo	Cantidad moderadamente incrementada; estructura normal.	Limitación para realizar ejercicios vigorosos debido a los fuertes dolores musculares. Los pacientes son normales y bien desarrollados.
VI Enfermedad de Hers	Fosforilasa	Hígado	Cantidad incrementada.	Igual que el tipo I, pero con un curso más benigno.
VII	Fosfofructoquinasa	Músculo	Cantidad incrementada; estructura normal.	Igual que el tipo V.
VIII	Fosforilasa quinasa	Hígado	Cantidad incrementada; estructura normal.	Aumento moderado del hígado. hipoglucemía moderada.

Nota: Desde los tipos I hasta el VII se heredan como autosómicos recesivos. El tipo VIII está ligado al sexo.



Figura 21.24 Estudio con NMR de un músculo de brazo humano. El nivel de ADP durante el ejercicio aumenta mucho más en un paciente con la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de McArdle (tipo V) que en un control sano. [Según C. K. Radda. Biochem. Soc. Trans. 14(1986): 517-525.]

cosidasa), y por ello solamente las ramas más externas del glucógeno pueden ser utilizadas eficazmente. Así pues, solamente una pequeña fracción de este glucógeno anormal es funcionalmente activo como almacén de glucosa accesible.

Un defecto en el metabolismo del glucógeno limitado al músculo se encuentra en la enfermedad de McArdle (tipo V). *En ella está ausente la actividad de la fosforilasa del músculo*, y la capacidad del paciente para realizar ejercicios vigorosos está limitada debido a que sufre calambres musculares dolorosos. El paciente es por lo demás normal y está bien desarrollado. Es decir, la utilización efectiva del glucógeno muscular no es esencial para la vida. Los estudios realizados en estos pacientes utilizando resonancia magnética nuclear con fósforo-31 han aportado mucha información. El pH de las células del músculo esquelético de los sujetos normales desciende durante el ejercicio vigoroso debido a la producción de ácido láctico. Por el contrario, las células musculares de los pacientes con la enfermedad de McArdle se vuelven más alcalinas durante el ejercicio debido a la ruptura de la creatina fosfato (p. 416). En estos pacientes no se acumula lactato porque la tasa de glicólisis de sus músculos es mucho menor que la normal: su glucógeno no puede movilizarse. Los resultados de los estudios de NMR en esta enfermedad han demostrado que los dolorosos calambres van unidos a altos niveles de ADP (Figura 21.24). La espectroscopía de NMR es una técnica valiosa e inofensiva para determinar la terapia adecuada para esta enfermedad en cuanto a dieta y ejercicio.

Resumen

El glucógeno, combustible almacenado de fácil movilización, es un polímero ramificado de residuos de glucosa. La mayoría de las unidades de glucosa del glucógeno están unidas por enlaces glicosídicos α -1,4. Cada diez residuos aproximadamente, se forma una rama mediante un enlace glicosídico α -1,6. El glu-

cógeno está presente en grandes cantidades en las células del músculo e hígado, donde se almacena en el citoplasma en forma de gránulos hidratados.

21.1 La degradación del glucógeno requiere la intervención de varios enzimas

La mayor parte de la molécula de glucógeno se degrada hasta glucosa 1-fosfato por la acción de la glucógeno fosforilasa, enzima clave de la degradación del glucógeno. El enlace glicosídico entre el C-1 de un residuo terminal y el C-4 del adyacente se rompe mediante el ortofosfato para dar glucosa 1-fosfato, que puede convertirse reversiblemente en glucosa 6-fosfato. Los puntos de ramificación se degradan por la acción concertada de una oligosacárido transferasa y una α -1,6-glucosidasa.

21.2 La fosforilasa se regula por interacciones alostéricas y por fosforilación reversible

La fosforilasa *b*, que es normalmente inactiva, se convierte en fosforilasa *a* activa por fosforilación de un solo residuo de serina en cada subunidad. Esta reacción está catalizada por la fosforilasa quinasa. En el músculo la forma *b* puede también activarse por la unión de AMP, efecto antagonizado por el ATP y por la glucosa 6-fosfato. En el hígado la glucosa inhibe a la forma *a*. Los centros de unión de AMP y los centros de fosforilación están situados en la interfase de las subunidades. En el músculo la fosforilasa se activa para generar glucosa a fin de utilizarla dentro de la propia célula como combustible de su actividad contráctil. Por el contrario, la fosforilasa hepática se activa para liberar glucosa que se exportará a otros órganos, tales como músculo esquelético y cerebro.

21.3 La adrenalina y el glucagón indican la necesidad de degradar el glucógeno

La adrenalina y el glucagón estimulan la ruptura del glucógeno a través de receptores 7TM específicos. El músculo es la primera diana de la adrenalina mientras que el hígado es sensible al glucagón. Ambas moléculas señal inician la cascada de quinasas que conduce a la activación de la glucógeno fosforilasa.

21.4 El glucógeno se sintetiza y degrada por vías diferentes

El glucógeno se sintetiza por una vía diferente a la de su degradación. La UDP-glucosa, el intermediario activado en la síntesis del glucógeno, se forma a partir de glucosa 1-fosfato y UTP. La glucógeno sintasa cataliza la transferencia de glucosa desde la UDP-glucosa hasta el grupo hidroxilo del C-4 de un residuo terminal de una molécula de glucógeno en crecimiento. La síntesis se inicia por la glucogenina, una proteína capaz de autoglucosilarse y que contiene un oligosacárido unido covalentemente a un residuo específico de tirosina. Un enzima ramificante convierte algunos enlaces α -1,4 en enlaces α -1,6 para aumentar el número de terminaciones de modo que el glucógeno pueda producirse y degradarse con mayor rapidez.

21.5 La degradación y la síntesis del glucógeno se regulan reciprocamente

La síntesis y la degradación del glucógeno están coordinadas por varias cascadas amplificadoras de reacciones. La adrenalina y el glucagón estimulan la degradación del glucógeno e inhiben su síntesis por incremento del nivel citoplasmático de AMP cíclico, el cual activa a la proteína quinasa A. La proteína quinasa A activa la degradación del glucógeno por unión de un fosfato a la fosforilasa quinasa e inhibe la síntesis del glucógeno por fosforilación de la glucógeno sintasa.

Las acciones de movilización del glucógeno debidas a la PKA son invertidas por la proteína fosfatasa 1, enzima regulado por varias hormonas. La adrenalina inhibe a esta fosfatasa al bloquear su unión a las moléculas de glucógeno y al activar a un inhibidor. Por el contrario, la insulina desencadena una cascada que fosforila e inactiva a la glucógeno sintasa quinasa. Por consi-

Hidden page

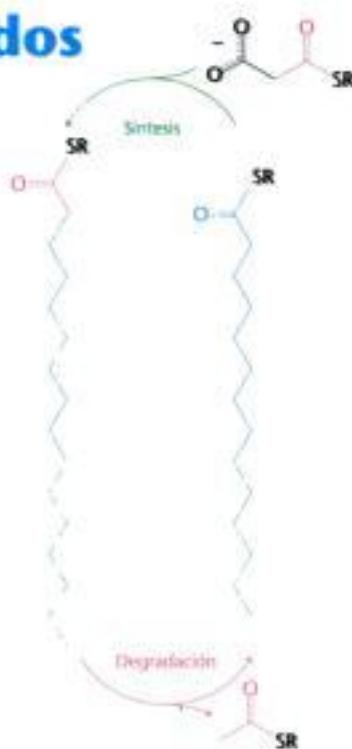
Hidden page

Hidden page

Metabolismo de los ácidos grasos



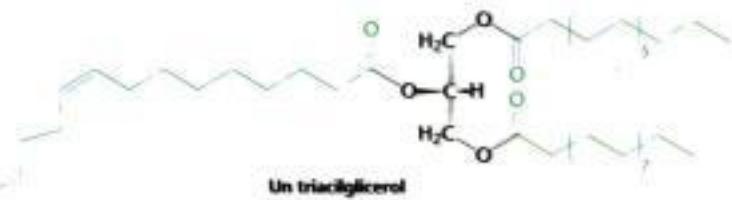
La grasa es una forma eficaz de almacenar energía para su uso posterior. (Derecha) Los procesos de síntesis de ácidos grasos (preparación para el almacenamiento del combustible) y de degradación de ácidos grasos (preparación para el empleo del combustible) son, en muchos sentidos, el uno inverso del otro. (Arriba) Los estudios en ratones son reveladores de la interacción entre estas vías y la base bioquímica del apetito y del control del peso corporal. [(Arriba) © Jackson/Visuals Unlimited.]



Pasemos ahora del metabolismo de carbohidratos al de los ácidos grasos. Un ácido graso contiene una larga cadena hidrocarbonada y un grupo terminal carboxilato. Los ácidos grasos tienen cuatro principales misiones fisiológicas. Primero, *los ácidos grasos son moléculas combustibles*. Se almacenan como *triacilgliceroles* (llamados también *grasas neutras o triglicéridos*), que son ésteres de ácidos grasos con glicerol, sin carga eléctrica (Figura 22.1). Los ácidos grasos movilizados desde los triacilgliceroles se oxidan para cubrir las necesidades de energía de una célula o del organismo. En reposo o durante un ejercicio moderado, como caminar, los ácidos grasos son nuestra primera fuente de energía. Segundo, *los ácidos grasos forman parte de la estructura de los fosfolípidos y los glicolípidos*. Estas moléculas anfipáticas son componentes importantes de las membranas biológicas, como ya se analizó en el Capítulo 12. Tercero, muchas proteínas se modifican por la *unión covalente de ácidos grasos*, que las dirigen hacia su posición en las membranas (p. 340). Cuarto, *derivados de ácidos grasos actúan como hormonas y mensajeros intracelulares*. En este capítulo estudiaremos la oxidación y la síntesis de los ácidos grasos.

Contenido

- 22.1 Los triacilgliceroles son depósitos de energía muy concentrada
- 22.2 La utilización de los ácidos grasos como combustible requiere un procesamiento de tres etapas
- 22.3 Los ácidos grasos insaturados o con cadena impar requieren etapas adicionales de degradación
- 22.4 Los ácidos grasos se sintetizan y se degradan por vías diferentes
- 22.5 La acetil-coenzima A carboxilasa ejerce una función esencial en el control del metabolismo de los ácidos grasos
- 22.6 La elongación y la insaturación de los ácidos grasos se realizan por sistemas enzimáticos accesorios



Hidden page

en 3 etapas: una reducción, una deshidratación y una segunda reducción, exactamente lo opuesto a la degradación. El producto es el butiril-CoA. Otro grupo malonilo activado se condensa con la unidad de butirilo y el proceso se repite hasta que se sintetiza un ácido graso de 16 carbonos.

22.1 Los triacilgliceroles son depósitos de energía muy concentrada

Los *triacilgliceroles* son depósitos muy concentrados de energía metabólica porque están en forma *reducida y anhidra*. El rendimiento de la oxidación completa de los ácidos grasos es de alrededor de 38 kJ g^{-1} (9 kcal g^{-1}), a diferencia de los aproximadamente 17 kJ g^{-1} (4 kcal g^{-1}) que se obtienen de los carbohidratos y las proteínas. Esta gran diferencia en la producción de calorías se debe a que los ácidos grasos están mucho más reducidos. Además, los triacilgliceroles son apolares y por ello se almacenan en una forma casi anhidra, mientras que las proteínas y los carbohidratos son mucho más polares y, por tanto, están hidratados. De hecho, 1 g de glucógeno seco retiene alrededor de 2 g de agua. En consecuencia, *un gramo de grasa, prácticamente anhidra, acumula más de seis veces la energía de un gramo de glucógeno, hidratado*. Probablemente, por esta razón los triacilgliceroles fueron seleccionados durante la evolución como el principal reservorio de energía en lugar del glucógeno. Considerese que un hombre normal de 70 kg tiene unas reservas de combustible de 420 000 kJ (100 000 kcal) en los triacilgliceroles, 100 000 kJ (24 000 kcal) en las proteínas (principalmente en el músculo), 2500 kJ (600 kcal) en el glucógeno y 170 kJ (40 kcal) en glucosa. Los triacilgliceroles constituyen alrededor de 11 kg de su peso corporal total. Si esta cantidad de energía fuera almacenada como glucógeno, su peso corporal sería 64 kg mayor. El glucógeno y los depósitos de glucosa proporcionan la energía suficiente para mantener las funciones fisiológicas durante unas 24 horas, mientras que los depósitos de triacilgliceroles permiten la supervivencia durante varias semanas.

En los mamíferos, el principal lugar de acumulación de triacilgliceroles es el citoplasma de las *células adiposas* (*células grasas* o *adipocitos*). Las gotitas de triacilglicerol se unen para formar un gran glóbulo que puede ocupar casi todo el volumen celular (véase la Figura 22.1). Las células adiposas están especializadas en la síntesis y almacenamiento de triacilgliceroles y en su movilización generando moléculas combustibles que son transportadas por la sangre a otros tejidos. El músculo también almacena triacilgliceroles para su propio consumo. Estos son claramente visibles en el tejido muscular como el veteado de la carne de buey.

La utilidad de los triacilgliceroles como fuente de energía se manifiesta de modo espectacular en la capacidad de las aves migratorias para volar grandes distancias sin alimentarse. Como ejemplos se pueden citar al chorlito dorado americano y al gorrión de garganta rubí. El chorlito dorado vuela desde Alaska hasta el extremo sur de Sudamérica y una gran parte del vuelo (3800 km ó 2400 millas) transcurre sobre el océano, donde los pájaros no pueden alimentarse. El gorrión de garganta rubí puede volar sin parar de un lado al otro del Golfo de México. Los ácidos grasos almacenados en los triacilgliceroles proporcionan la energía para estas dos prodigiosas hazañas.

Los lípidos de la dieta se digieren mediante las lipasas pancreáticas

La mayoría de los lípidos se ingieren en forma de triacilgliceroles pero para que el epitelio intestinal los absorba deben degradarse. Los enzimas intestinales conocidos como lipasas, secretadas por el páncreas, degradan los triacilgliceroles hasta monacilglicerol y ácidos grasos (Figura 22.3). Recordemos que, a diferencia de los carbohidratos y las proteínas, los lípidos no son solubles en agua. Entonces, ¿cómo son accesibles a las lipasas que están en disolución acuosa? La solución es rodear a los lípidos con un envoltorio soluble. En la luz intestinal, los triacilgliceroles se incor-



Los triacilgliceroles son el combustible de los largos vuelos migratorios del chorlito dorado americano (*Pluvialis dominica*). [Gerard Fuhrer/Visuals Unlimited.]

Hidden page

22.2 La utilización de los ácidos grasos como combustible requiere un procesamiento de tres etapas

Los tejidos periféricos consiguen acceder a los depósitos de energía de los lípidos del tejido adiposo a través de tres etapas de procesado. En primer lugar, los lípidos deben movilizarse. En este proceso, los triacilgliceroles se degradan a ácidos grasos y glicerol, que se liberan desde el tejido adiposo y se transportan a los tejidos que requieren energía. En segundo lugar, en estos tejidos, los ácidos grasos deben activarse y transportarse al interior de la mitocondria para su degradación. En tercer lugar, los ácidos grasos se descomponen de manera secuencial en acetil-CoA, que posteriormente se procesa en el ciclo del ácido cítrico.

Los triacilgliceroles se hidrolizan por una lipasa estimulada por hormonas

Considérese el caso de una persona que comienza a hacer ejercicio al despertarse del sueño nocturno. Su almacén de glucógeno será bajo, pero los lípidos estarán disponibles. ¿Cómo se movilizan esos almacenes de lípidos? El acontecimiento inicial en la utilización de la grasa como fuente de energía es la hidrólisis de los triacilgliceroles para liberar los ácidos grasos. Esta reacción está catalizada por una lipasa controlada por hormonas. En las condiciones de un corredor matinal, estarán presentes el glucagón y la adrenalina. En las células adiposas, estas hormonas se unen a los receptores 7TM que activan a la adenilato ciclase (p. 383). El nivel incrementado de AMP cíclico estimula entonces a la proteína quinasa A, que fosforila a dos proteínas clave: la *perilipina A*, una proteína asociada al glóbulo de grasa, y la lipasa sensible a hormonas. La fosforilación de la perilipina A reestructura la gota de grasa de forma tal que los triacilgliceroles se hacen más accesibles a la lipasa sensible a hormonas. La lipasa fosforilada hidroliza los triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres. Así pues, la adrenalina y el glucagón promueven la lipólisis (Figura 22.6). Aunque su función en el músculo no se ha establecido con certeza, es probable que estas hormonas también regulen el uso de los almacenes de triacilgliceroles en dicho tejido.

Los ácidos grasos liberados no son solubles en el plasma sanguíneo, así que la albúmina sérica se une a los ácidos grasos y les sirve de portador. De esta forma, los ácidos grasos libres se vuelven accesibles como combustible para otros tejidos.

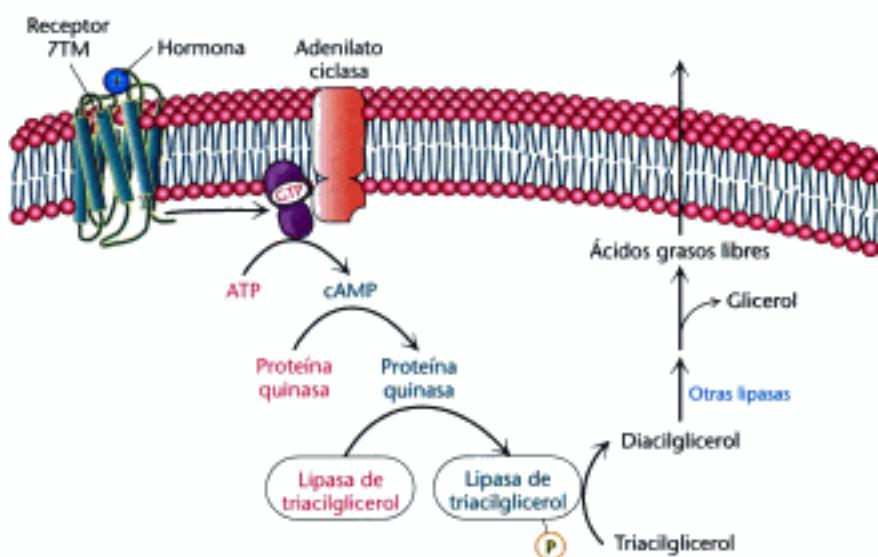
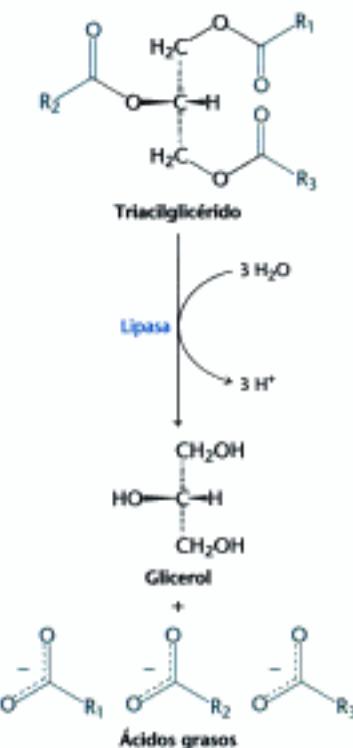


Figura 22.6 Movilización de los triacilgliceroles. En respuesta a señales hormonales, los triacilgliceroles del tejido adiposo se convierten en ácidos grasos libres y glicerol, que son liberados al torrente sanguíneo. El proceso lipolítico lo inicia una lipasa sensible a hormonas. Abreviatura: 7TM, 7 hélices transmembrana.

Hidden page



Estas reacciones parciales son reversibles. En efecto, la constante de equilibrio para la suma de estas reacciones es próxima a la unidad. Se rompe un enlace de alta energía (entre el PP_i y AMP) y se forma otro enlace equivalente (el enlace tioéster del acil-CoA). ¿Cómo se consigue que la reacción transcurra en el sentido directo? La respuesta es que el pirofosfato se hidroliza rápidamente por la acción de una pirofosfatasa, de modo que la reacción completa es:

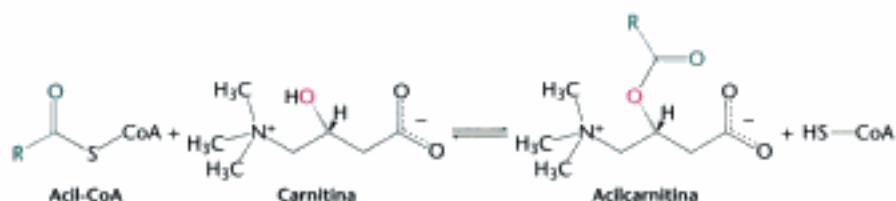


Esta reacción es bastante favorable debido a que se hidroliza el equivalente a dos moléculas de ATP, mientras que se forma un único compuesto de alto potencial de transferencia. Vemos aquí otro ejemplo de un tema recurrente en bioquímica: *muchas reacciones biosintéticas son irreversibles por la hidrólisis del pirofosfato inorgánico.*

 Hay otro tema repetitivo en esta reacción de activación. La presencia de un intermediario aciladenilato unido al enzima no es exclusiva de la síntesis de acil-CoA. Los aciladenilatos se forman frecuentemente cuando los grupos carbonilo se activan en las reacciones bioquímicas. En la síntesis de proteínas, los aminoácidos se activan mediante un mecanismo semejante (p. 862), aunque los enzimas que catalizan este proceso no son homólogos a la acil-CoA sintetasa. Por tanto, la activación por adenilación se repite en parte debido a la evolución convergente.

La carnitina transporta los ácidos grasos de cadena larga activados hasta la matriz mitocondrial

Los ácidos grasos se activan en la membrana externa de la mitocondria, pero se oxidan en la matriz mitocondrial. Se necesita un mecanismo de transporte especial para que las moléculas de acil-CoA de cadena larga crucen la membrana interna de la mitocondria. Los ácidos grasos de cadena larga activados se transportan a través de la membrana conjugados con la *carnitina*, un alcohol zwitteriónico. El grupo acilo se transfiere desde el átomo de azufre del CoA al grupo hidroxilo de la carnitina para formar *acilcarnitina*. Esta reacción está catalizada por la *carnitina aciltransferasa I*; llamada también *carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI)*, que está unida a la membrana externa mitocondrial.



La acilcarnitina se transporta a través de la membrana interna mitocondrial por acción de una translocasa (Figura 22.8). El grupo acilo se transfiere de nuevo a un CoA

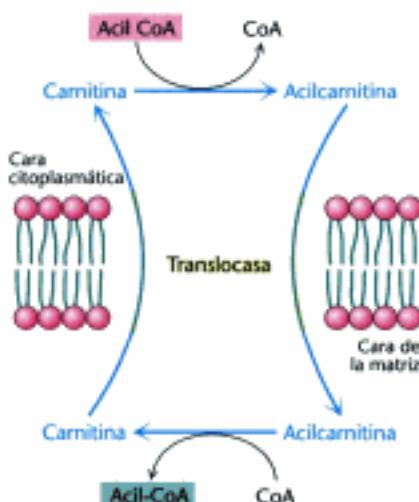


Figura 22.8 Translocación de acilcarnitina. Una translocasa media la entrada de acilcarnitina a la matriz mitocondrial intercambiándola por carnitina, que vuelve a la cara citoplasmática de la membrana interna mitocondrial.

Hidden page

Hidden page

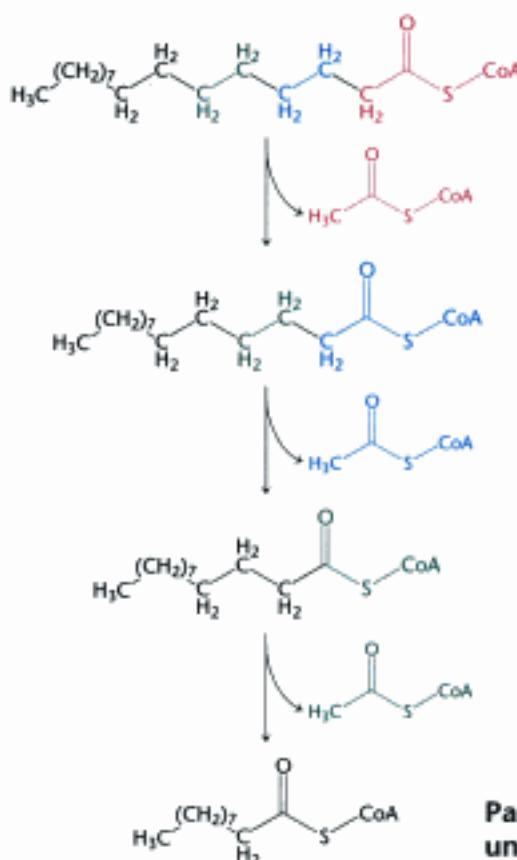


Figura 22.10 Los primeros tres ciclos de la degradación del palmitato. Se van eliminando secuencialmente fragmentos de dos carbonos a partir del extremo carboxílico del ácido graso.

Cuando cada una de estas 7 moléculas de NADH se oxida en la cadena respiratoria se generan aproximadamente 2,5 ATPs, mientras que por cada una de las 7 moléculas de FADH₂ se forman 1,5 ATPs, puesto que sus electrones entran en la cadena a nivel del ubiquinol. Recuérdese que la oxidación del acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico produce 10 moléculas de ATP. Así pues, el número de moléculas de ATP formadas en la oxidación del palmitil-CoA es de: 10,5 a partir de las 7 moléculas de FADH₂, 17,5 a partir de las 7 moléculas de NADH y 80 a partir de las 8 moléculas de acetil-CoA, lo que da un total de 108. Se consumen el equivalente a 2 moléculas de ATP en la activación del palmitato, en la que el ATP se escinde hasta AMP y 2 P_i. Por tanto, la oxidación completa de una molécula de palmitato rinde 106 moléculas de ATP.

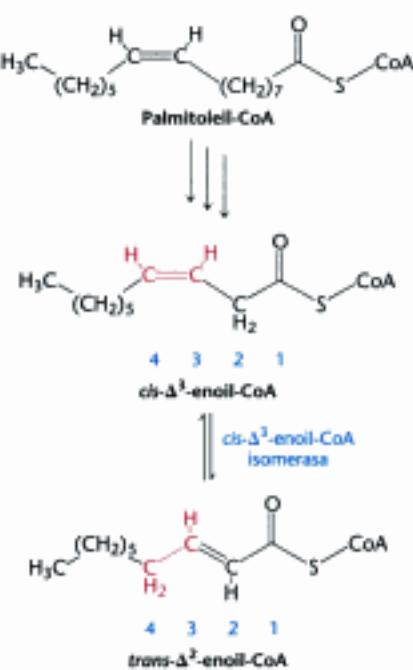
22.3 Los ácidos grasos insaturados o con cadena impar requieren etapas adicionales de degradación

La vía de la β-oxidación consigue degradar por completo los ácidos grasos saturados de un número par de átomos de carbono. La mayor parte de los ácidos grasos tienen ese tipo de estructuras debido a su forma de síntesis (p. 636). Sin embargo, no todos los ácidos grasos son tan sencillos. La oxidación de los ácidos grasos que contienen dobles enlaces así como la de los ácidos grasos que contienen un número impar de átomos de carbono requiere reacciones adicionales a las de la β-oxidación.

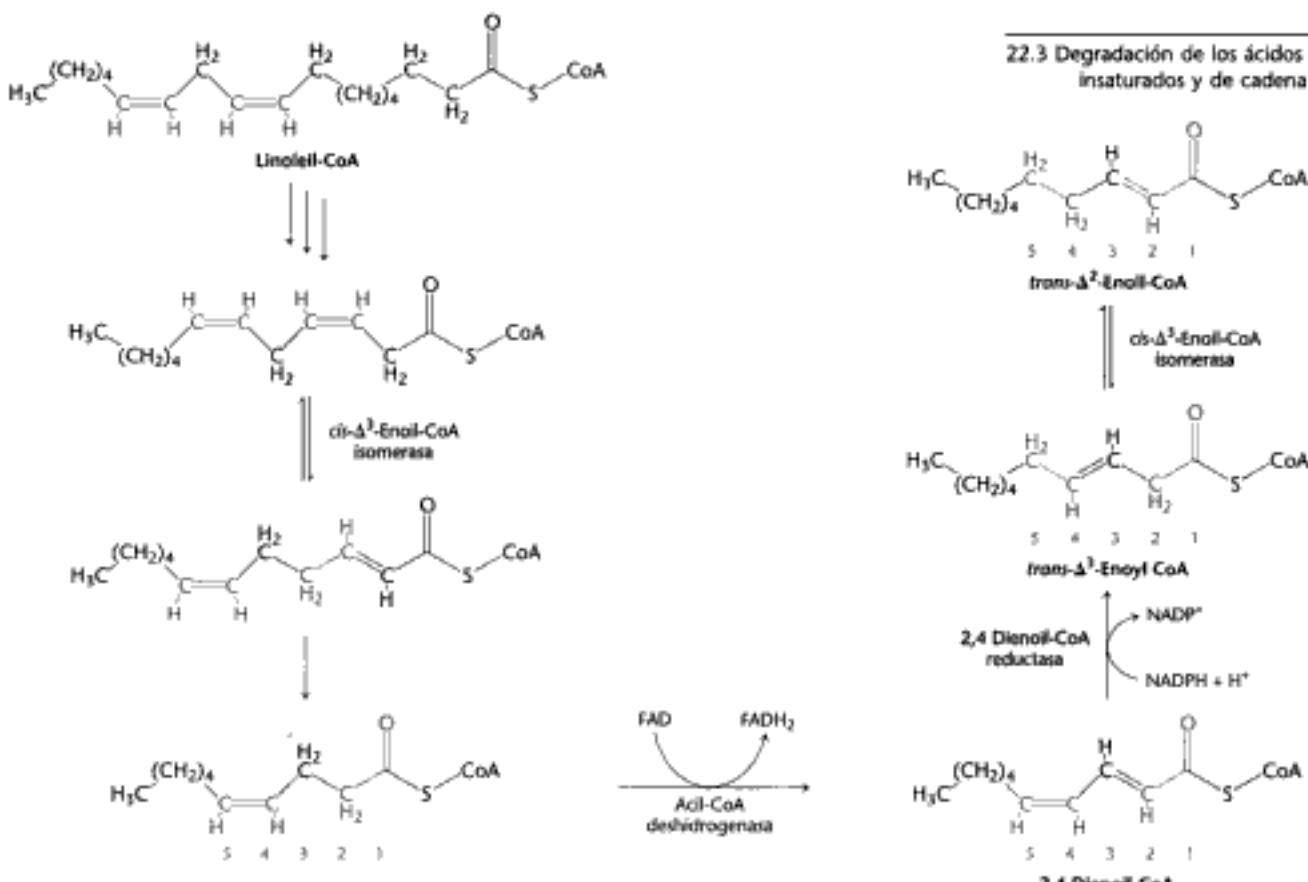
Para la oxidación de los ácidos grasos insaturados se requiere una isomerasa y una reductasa

La oxidación de los ácidos grasos insaturados presenta algunas dificultades; aunque, sin embargo, la dieta proporciona muchos de estos ácidos grasos. La mayoría de las reacciones son las mismas de los ácidos grasos saturados. De hecho, solamente dos nuevos enzimas son necesarios –una isomerasa y una reductasa– para degradar una amplia gama de ácidos grasos insaturados.

Consideremos la oxidación del palmitoleato. Este ácido graso insaturado de C₁₆, que tiene un doble enlace entre el C-9 y C-10, se activa y transporta a través de la membrana interna mitocondrial de la misma forma que los ácidos grasos saturados. El palmitoleil-CoA experimenta después tres ciclos de β-oxidación, en los que intervienen los mismos enzimas que en la oxidación de los ácidos grasos saturados. Sin embargo, el cis-Δ³-enoil-CoA formado en el tercer ciclo no es un sustrato para la acil-CoA deshidrogenasa. La presencia de un doble enlace cis entre el C-3 y C-4 impide la formación de un doble enlace trans entre el C-2 y C-3. Esta barrera se resuelve gracias a una nueva reacción que cambia la posición y la configuración del doble enlace. Una cis-Δ³-enoil-CoA isomerasa convierte este doble enlace cis-Δ³ en un doble enlace trans-Δ². Las reacciones posteriores son las de la vía de oxidación de ácidos grasos saturados, para la que el trans-Δ²-enoil-CoA es un sustrato normal. En la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados surge otro problema. Consideremos el linoleato, un ácido graso poliinsaturado de 18 carbonos con dos dobles enlaces: cis-Δ⁹ y cis-Δ¹² (Figura 22.11). El doble enlace cis-Δ³ que aparece después de tres ciclos de β-oxidación se convierte en trans-Δ² por acción de la isomerasa que se acaba de mencionar en el párrafo anterior. El acil-CoA que se produce en otro de los ciclos de la β-oxidación contiene un doble enlace cis-Δ⁴. La deshidrogenación de esta especie molecular por la acil-CoA deshidrogenasa produce un intermediario 2,4-dienoil, que no es un sustrato adecuado para el siguiente enzima de la vía de la β-oxidación. Este escollo se salva gracias a la 2,4-dienoil-CoA reductasa, un enzima que utiliza NADPH para reducir el intermediario 2,4-dienoil-CoA a trans-Δ³-enoil-CoA. La cis-Δ³-enoil-CoA isomerasa transforma ahora el trans-Δ³-enoil-CoA en la forma trans-Δ², un intermediario habitual de la β-oxidación. Estas estrategias catalíticas resultan elegantes y económicas. Para la oxidación de cualquier ácido graso



22.3 Degradación de los ácidos grasos insaturados y de cadena impar



poliinsaturado sólo se necesitan dos enzimas adicionales. La isomerasa resuelve los dobles enlaces situados en posiciones impares mientras que la reductasa y la isomerasa lo hace con los situados en posiciones pares.

Los ácidos grasos de cadena impar producen propionil-coenzima A en la tiolisis del último ciclo de oxidación

Los ácidos grasos con número impar de átomos de carbono son especies poco abundantes. Se oxidan de la misma forma que los ácidos grasos de número par, y sólo se diferencian de éstos en que en el ciclo final de la degradación se produce propionil-CoA y acetil-CoA, en lugar de dos moléculas de acetil-CoA. El propionil-CoA, unidad de 3 carbonos activada, entra en el ciclo del ácido cítrico después de convertirse en succinil-CoA.

La vía para convertir al propionil-CoA en succinil-CoA es especialmente interesante porque supone un reordenamiento que requiere vitamina B_{12} (llamada también cobalamina). El propionil-CoA se carboxila a expensas de la hidrólisis de un ATP para formar el isómero D del metilmalonil-CoA (Figura 22.12). Esta reacción de car-

Figura 22.11 Oxidación del linoleil-CoA. La oxidación completa del ácido graso diinsaturado linoleico requiere dos enzimas adicionales: la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa.

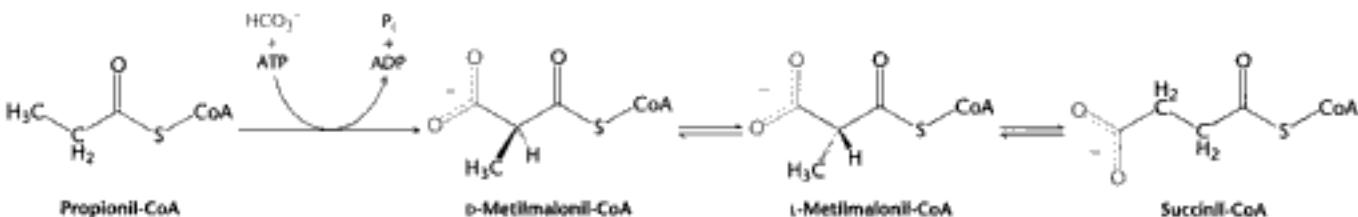
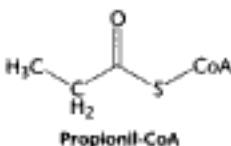


Figura 22.12 Conversión del propionil-CoA en succinil-CoA. El propionil-CoA generado a partir de ácidos grasos con un número impar de carbonos, así como de algunos aminoácidos, se convierte en el succinil-CoA que, recordemos, es un intermediario del ciclo del ácido cítrico.

boxilación está catalizada por la *propionil-CoA carboxilasa*, un enzima dependiente de biotina que es homólogo y tiene un mecanismo catalítico similar al de la piruvato carboxilasa (p. 462). El isómero D del metilmalonil-CoA se racemiza al isómero L, que es el sustrato de una mutasa que lo convierte en *succinil-CoA* mediante un *reordenamiento intramolecular*. El grupo —CO—S—CoA migra desde el C-2 al C-3 intercambiándose por un átomo de hidrógeno. Esta isomerización tan inusual está catalizada por la *metilmalonil-CoA mutasa*, que contiene como coenzima un derivado de la vitamina B₁₂ o cobalamina.

La vitamina B₁₂ contiene un anillo de corrina y un átomo de cobalto

Los enzimas que requieren cobalamina, presentes en la mayoría de los organismos, catalizan tres tipos de reacciones: (1) *reordenamientos intramoleculares*, (2) *metilaciones*, como en la síntesis de metionina (p. 691) y (3) *reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos* (Sección 25.3). En los mamíferos, las únicas reacciones que se conocen que requieren coenzima B₁₂ son la conversión de L-metilmalonil-CoA en succinil-CoA y la formación de metionina por metilación de la homocisteína. Esta última reacción es especialmente importante debido a que la metionina se requiere para la generación de coenzimas que participan en la síntesis de purinas y de timina, que a su vez son necesarias en la síntesis de ácidos nucleicos.

El núcleo de cobalamina consta de un *anillo de corrina con un átomo de cobalto en el centro* (Figura 22.13). El anillo de corrina, al igual que las porfirinas, contiene *cuatro anillos pirrólicos*. Dos pirroles están unidos entre sí, mientras que los otros dos están enlazados por puentes metínicos, como en las porfirinas. El anillo de corrina está más reducido que el de las porfirinas y los sustituyentes son diferentes. El átomo de cobalto está unido a los cuatro nitrógenos pirrólicos. El quinto sustituyente del cobalto es un derivado del *dimetilbencimidazol*, que contiene ribosa 3-fosfato y aminoisopropanol, enlazado a través de uno de sus átomos de nitrógeno. En el coenzima B₁₂, el *sexto sustituyente* unido al átomo de cobalto es un grupo *5'-desoxiadenosilo*. Esta posición también puede estar ocupada por un grupo ciano, un grupo metilo u otros ligandos. En todos estos compuestos, el cobalto está en el estado de oxidación +3.

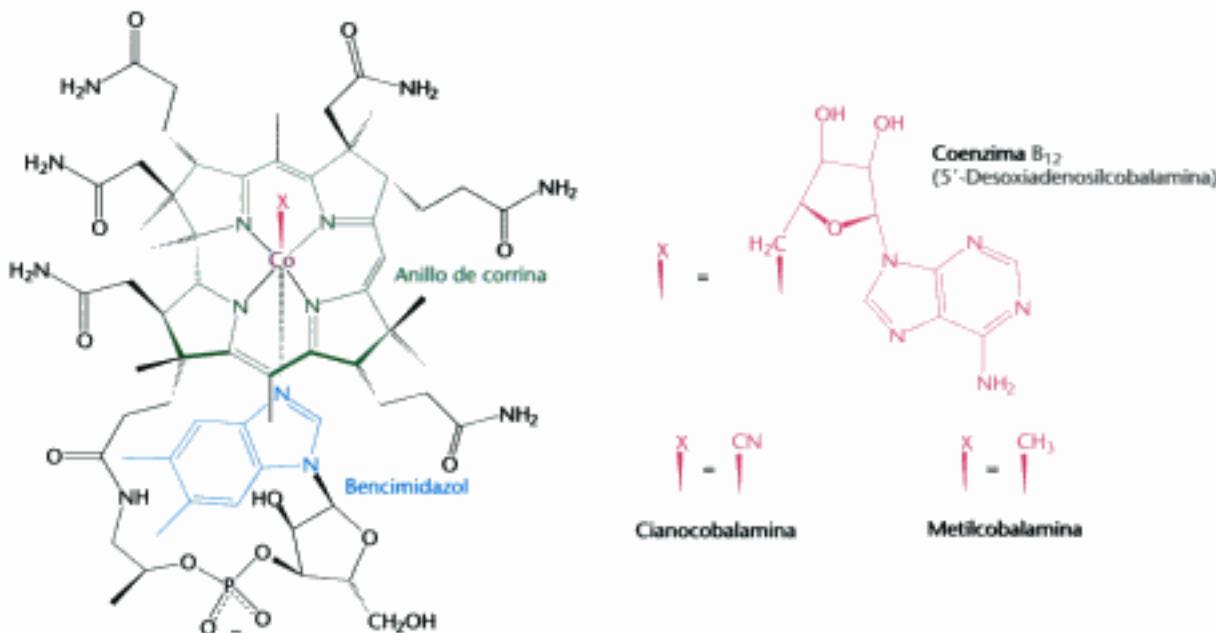


Figura 22.13 Estructura del coenzima B₁₂, la 5'-desoxiadenosilcobalamina. La sustitución del 5'-desoxiadenosilo por los grupos ciano y metilo origina cianocobalamina y metilcobalamina, respectivamente.

Hidden page

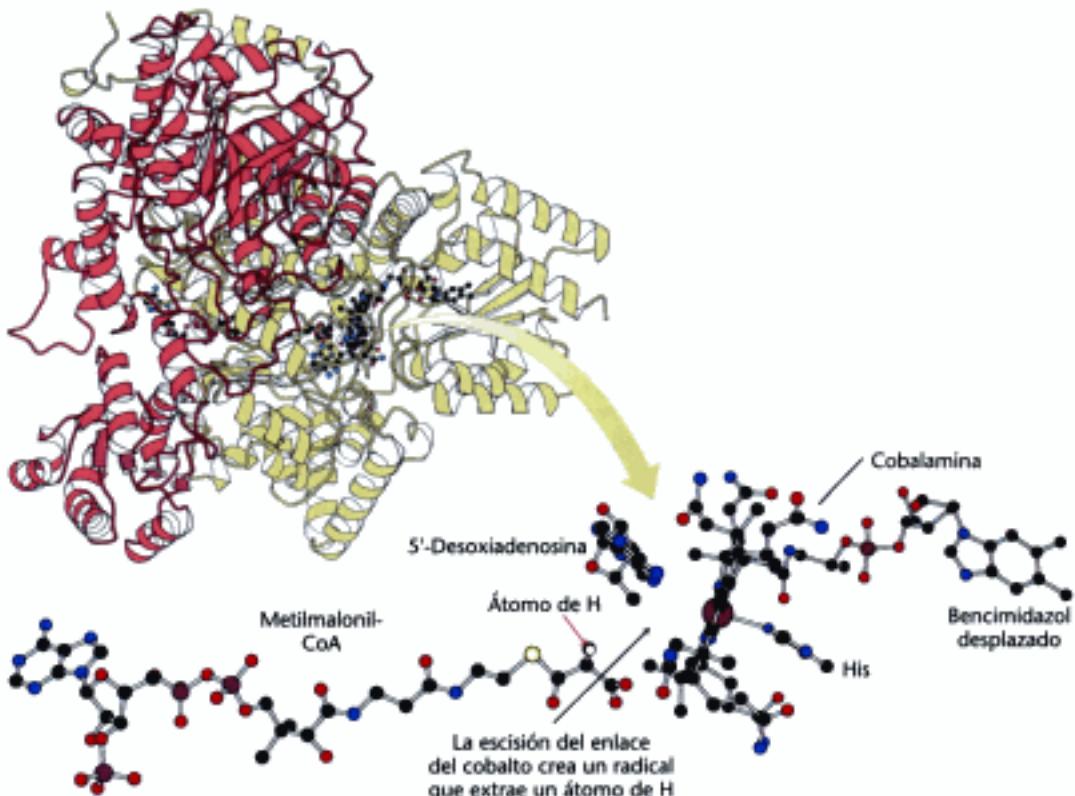


Figura 22.17 Centro activo de la metilmalonil-CoA mutasa. Obsérvese que al cobalto se une un residuo de histidina del enzima en lugar del bencimidazol. El ordenamiento del sustrato y del coenzima en el centro activo facilita la escisión del enlace cobalto-carbono y la posterior extracción de un átomo de hidrógeno del sustrato. [Tomado de 4REQ.pdb.]

(Figura 22.17). El amontonamiento estérico alrededor del enlace cobalto-carbono dentro del anillo de corrina contribuye a la debilidad del enlace.

Los ácidos grasos también se oxidan en los peroxisomas

Aunque la mayoría de las oxidaciones de los ácidos grasos tienen lugar en la mitocondria, algunas oxidaciones suceden en los orgánulos celulares denominados *peroxisomas* (Figura 22.18). Estos orgánulos son pequeños compartimentos rodeados de membrana presentes en las células de la mayoría de organismos eucarióticos. La oxidación de los ácidos grasos en estos orgánulos acaba en octanoil-CoA y puede servir para acortar las cadenas largas y hacerlas mejores sustratos para la β -oxidación mitocondrial. La oxidación en los peroxisomas difiere de la β -oxidación en la deshidrogenación inicial (Figura 22.19). En los peroxisomas, una deshidrogenasa de flavina transfiere los electrones al O_2 produciendo H_2O_2 , en vez de capturar los electrones de alta energía en forma de $FADH_2$, como sucede en la β -oxidación mitocondrial. Los peroxisomas contienen concentraciones elevadas del enzima catalasa que degrada el H_2O_2 a O_2 y agua. Las etapas siguientes son idénticas a sus correspondientes mitocondriales, aunque las llevan a cabo diferentes isoformas de los enzimas.

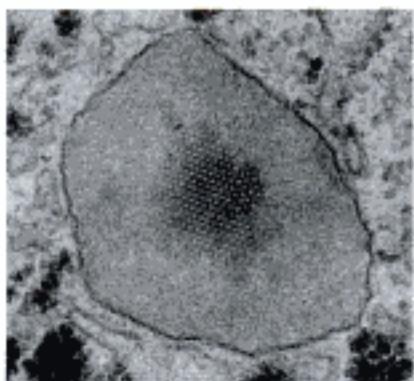


Figura 22.18 Micrografía electrónica de un peroxisoma de una célula hepática. Dentro del orgánulo se encuentra un cristal de urato oxidasa rodeado por una membrana bicapa sencilla. Las estructuras granulares oscuras del exterior del peroxisoma son partículas de glucógeno. [Cortesía del Dr. George Palade.]

Los peroxisomas no son funcionales en pacientes con el síndrome de Zell-Weger. Se caracteriza por anormalidades en el hígado, riñón y músculo, que normalmente conducen a la muerte alrededor de los seis años de edad. Este síndrome está causado por un defecto en la importación de los enzimas al interior de los peroxisomas. Vemos aquí una condición patológica resultado de una distribución celular de los enzimas inapropiada.

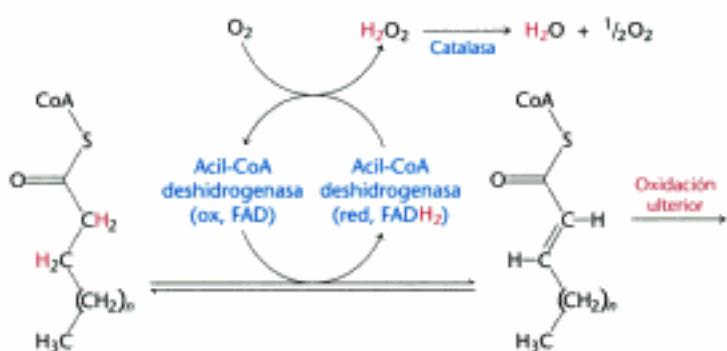


Figura 22.19 Iniciación de la degradación peroxisómica de los ácidos grasos. La primera deshidratación de la degradación de ácidos grasos en los peroxisomas requiere una deshidrogenasa dependiente de FAD que transfiere electrones al O₂ y produce H₂O₂.

Si predomina la degradación de las grasas, se forman cuerpos cetónicos a partir del acetil-coenzima A

El acetil-CoA formado en la oxidación de los ácidos grasos sólo entra en el ciclo del ácido cítrico si la degradación de las grasas y la de los carbohidratos están adecuadamente equilibradas. Esto se debe a que la entrada del acetil-CoA en dicho ciclo depende de la asequibilidad del oxalacetato, con quien se combina para la formación del citrato. Recordemos que el oxalacetato se forma normalmente a partir del piruvato, el producto final de la degradación de la glucosa por la glicólisis. Por tanto, la concentración de oxalacetato estará disminuida si no hay carbohidratos disponibles o si no se utilizan apropiadamente. Esta es la base molecular del refrán que dice: *las grasas se queman en la llama de los azúcares*.

En la inanición o en la diabetes el oxalacetato se consume en la formación de glucosa por la vía de la gluconeogénesis (p. 461) y, por consiguiente, no está disponible para condensarse con el acetil-CoA. En estas condiciones, el acetil-CoA mitocondrial se deriva hacia la formación del acetacetato y D-3-hidroxibutirato. El acetacetato, el D-3-hidroxibutirato y la acetona son los llamados *cuerpos cetónicos*. Se pueden presentar concentraciones anormalmente altas de cuerpos cetónicos en la sangre de los enfermos diabéticos sin tratamiento (p. 773).

El acetacetato se forma a partir de acetil-CoA en tres etapas (Figura 22.20). Se condensan dos moléculas de acetil-CoA para formar acetacetil-CoA. Esta reacción, catalizada por la tiolasa, es la inversa de la tiolisis en la β-oxidación de los ácidos grasos. Posteriormente, el acetacetil-CoA reacciona con acetil-CoA y con agua para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) y CoA libre. Esta condensación es se-

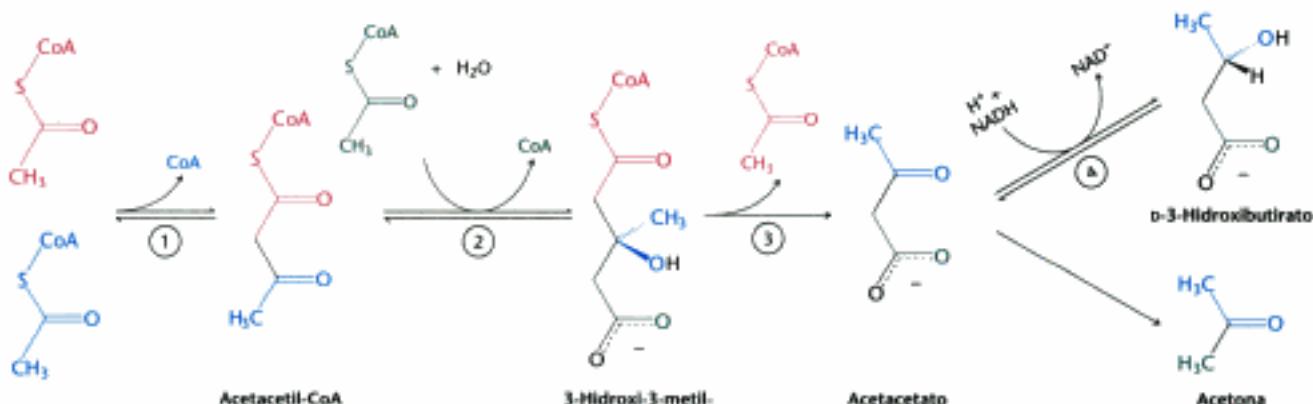
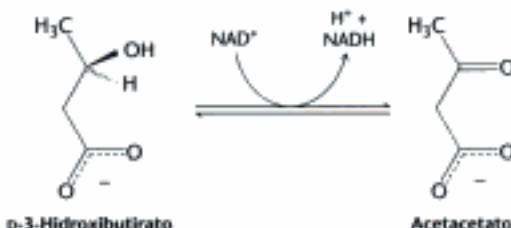


Figura 22.20 Formación de los cuerpos cetónicos. Los cuerpos cetónicos (acetacetato, D-3-hidroxibutirato y acetona) se forman a partir de acetil-CoA principalmente en el hígado. Los enzimas que catalizan estas reacciones son: (1) 3-cetotiolasa, (2) hidroximetilglutaril-CoA sintasa, (3) enzima de escisión del hidroximetilglutaril-CoA y (4) D-3-hidroxibutirato deshidrogenasa. El acetacetato se descarboxila espontáneamente para formar acetona.

Hidden page

lización de acetacetato durante el ayuno y la diabetes (pp. 772 y 773). En el ayuno prolongado, el acetacetato aporta el 75% de las necesidades energéticas del cerebro.

El acetacetato se oxida y produce acetil-CoA en 2 pasos. En primer lugar, el acetacetato se activa por transferencia del CoA procedente del succinil-CoA mediante una reacción catalizada por una CoA transferasa específica. El acetacetil-CoA se escinde luego por medio de la tiolasa liberándose dos moléculas de acetil-CoA, que pueden entrar en el ciclo del ácido cítrico (Figura 22.22). El hígado puede suministrar acetacetato a otros órganos porque él carece de esta particular transferasa de CoA. El 3-hidroxibutirato requiere una reacción adicional para producir acetil-CoA. Primero se oxida generando acetacetato, que se procesa como acabamos de mencionar, y NADH, que se emplea en la fosforilación oxidativa.



Los cuerpos cetónicos pueden considerarse como una forma hidrosoluble de transporte de unidades acetilo. Los ácidos grasos son liberados por el tejido adiposo y se convierten en el hígado en unidades acetilo, quien los exporta como acetacetato. Como cabría esperar, el acetacetato tiene también una función reguladora. Elevadas concentraciones de acetacetato en sangre indican abundancia de unidades acetilo y provocan una reducción en la velocidad de la lipólisis del tejido adiposo.

 Ciertas condiciones patológicas pueden conducir a un aumento de las concentraciones sanguíneas de cuerpos cetónicos peligrosas para la vida. La más común de estas condiciones es la cetosis diabética de los pacientes con diabetes mellitus dependiente de insulina, que son incapaces de producir insulina. Como se ha mencionado, esta hormona se libera normalmente después de una comida e indica a los tejidos que captan glucosa (p. 610). Además, la insulina restringe la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo. La ausencia de insulina tiene dos consecuencias bioquímicas importantes (Figura 22.23). En primer lugar, el hígado no puede captar glucosa y, en consecuencia, no puede proporcionar oxalacetato para procesar

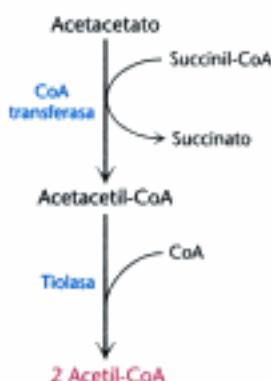


Figura 22.22 Utilización del acetacetato como combustible. El acetacetato puede convertirse en dos moléculas de acetil-CoA, que después entran en el ciclo del ácido cítrico.

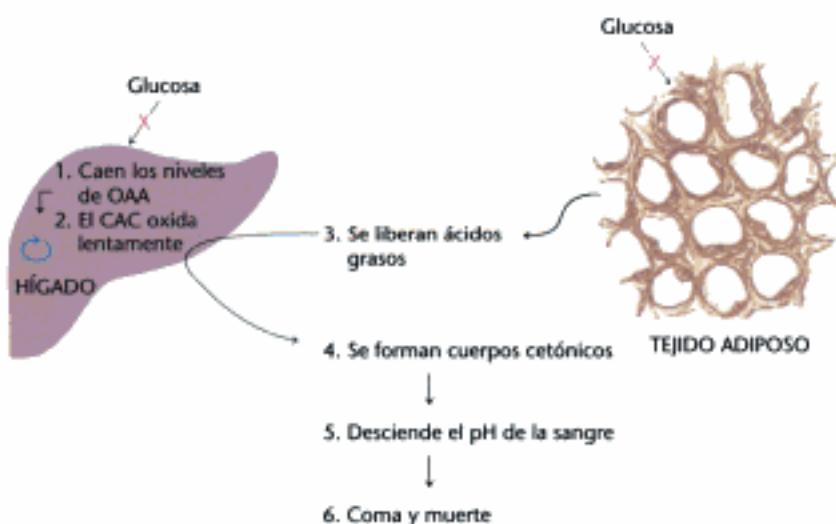


Figura 22.23 La carencia de insulina produce la cetosis diabética. En ausencia de insulina, las grasas se liberan del tejido adiposo y la glucosa no se puede absorber por el hígado o el tejido adiposo. El hígado degrada los ácidos grasos por la β -oxidación pero no puede procesar todo el acetil-CoA generado debido a que el oxalacetato (OAA) derivado de la glucosa es deficitario. Los cuerpos cetónicos se forman en exceso y salen a la sangre acidificándola.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

ACP se reduce hasta D-3-hidroxibutiril-ACP. Esta reacción difiere de su correspondiente en la degradación de los ácidos grasos en dos aspectos: (1) se forma el isómero D, en lugar del L, y (2) el agente reductor es el NADPH, mientras que el NAD⁺ es el agente oxidante en la β-oxidación. Esta diferencia es un ejemplo más del principio general que establece que el *NADPH se consume en las reacciones biosintéticas mientras que el NADH se genera en las reacciones productoras de energía*. En una segunda etapa, el D-3-hidroxibutiril-ACP se deshidrata para formar crotonil-ACP, que es un *trans*-Δ²-enoil-ACP. En la etapa final del ciclo se reduce el crotonil-ACP a butiril-ACP. De nuevo el reductor es el NADPH, mientras que el FAD es el oxidante en la reacción correspondiente de la β-oxidación. El enzima que cataliza esta etapa, la *enoil-ACP reductasa*, es inhibido por el *triclosano*, un agente antibacteriano de amplio espectro que se emplea en diversos productos como pasta de dientes, jabones y cremas para la piel. Estas tres últimas reacciones -una reducción, una deshidratación y una segunda reducción- convierten el acetacetil-ACP en butiril-ACP, lo cual completa el primer ciclo de elongación.

En el segundo ciclo de la síntesis de ácidos grasos, el butiril-ACP (C₄-acil-ACP) se condensa con malonil-ACP para formar un C₆-β-cetoacil-ACP. Esta reacción es semejante a la del primer ciclo, en la cual el acetil-ACP se condensa con malonil-ACP para formar el C₄-β-cetoacil-ACP. Una reducción, una deshidratación y una segunda reducción convierten el C₆-β-cetoacil-ACP en un C₆-acil-ACP, el cual está listo para un tercer ciclo de elongación. Los ciclos de elongación continúan hasta que se forma el C₁₆-acil-ACP. Este intermediario es un buen sustrato para una tioesterasa que hidroliza el C₁₆-acil-ACP para producir palmitato y ACP. *La tioesterasa actúa como una regla que determina la longitud de la cadena del ácido graso*. La síntesis de los ácidos grasos de cadena más larga se estudiará en la Sección 22.6.

En los animales los ácidos grasos se sintetizan a partir de un complejo enzimático multifuncional

Aunque las reacciones bioquímicas básicas de la síntesis de ácidos grasos son muy similares en *E. coli* y en los eucariotas, las estructuras de las sintetasas varían considerablemente. Las ácido graso sintetasas de los animales, al contrario de las de *E. coli* y las plantas, tienen los componentes enzimáticos unidos en una gran cadena polipeptídica.

La ácido graso sintasa de mamíferos es un dímero de subunidades idénticas de 272 kd. Cada cadena está plegada formando tres dominios unidos por regiones flexibles que permiten el movimiento de los dominios, rasgo necesario para que pue-

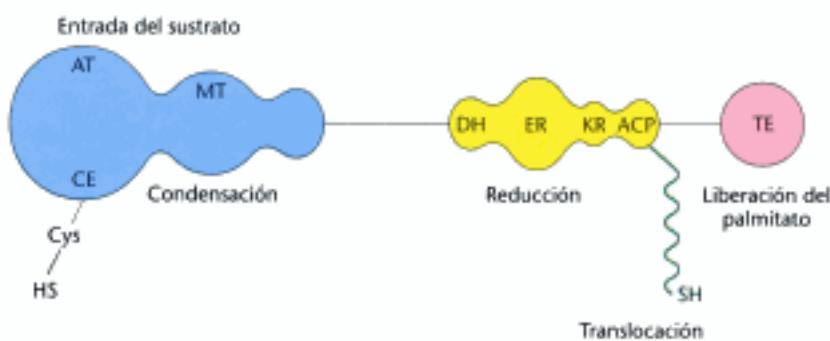


Figura 22.26 Representación esquemática de una cadena de la ácido graso sintasa de animales. El enzima activo es un dímero de 2 cadenas iguales, cada una con 3 dominios. El dominio 1 (en azul) contiene las actividades acetiltransferasa (AT), maloniltransferasa (MT) y enzima condensante (CE). El dominio 2 (en amarillo) contiene la proteína portadora de ácidos (ACP) y las actividades β-cetoacilreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (ER). El dominio 3 (en rojo) contiene la tioesterasa (TE). El grupo de fosfopanteteína (en verde) es flexible y transporta al ácido graso de un centro catalítico a otro. [Tomado de Y. Tsukamoto, H. Wong, J. S. Mattick y S. J. Wakil, *J. Biol. Chem.* 258 (1983):15312-15322.]

Hidden page

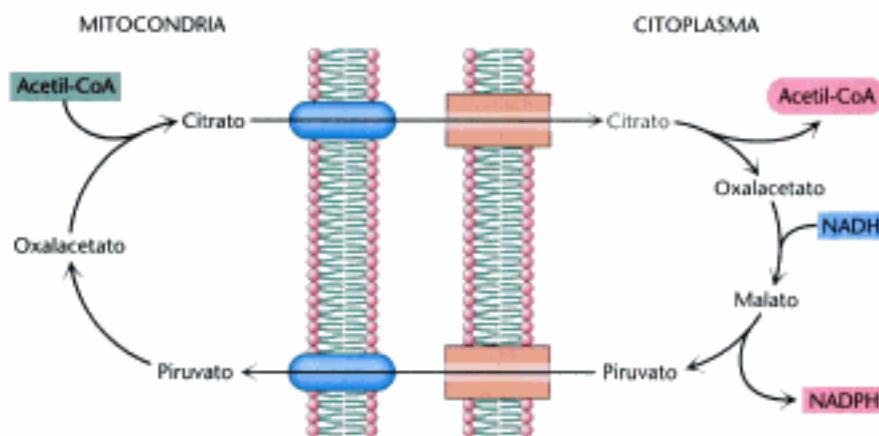


Figura 22.27 Transferencia del acetil-CoA al citoplasma. El acetil-CoA se transfiere desde la mitocondria al citoplasma y el potencial reductor del NADH se convierte simultáneamente en el del NADPH mediante esta serie de reacciones.

Diversas fuentes suministran NADPH para la síntesis de ácidos grasos

El oxalacetato formado en la transferencia de grupos acetilo al citoplasma debe ahora retornar a la mitocondria. Como la membrana interna mitocondrial es impermeable al oxalacetato, son necesarias una serie de reacciones para superar esta barrera. Es importante el hecho de que estas reacciones además generen una gran parte del NADPH necesario para la síntesis de los ácidos grasos. Primero, el oxalacetato es reducido a malato por el NADH. Esta reacción está catalizada por la *malato deshidrogenasa* del citoplasma.



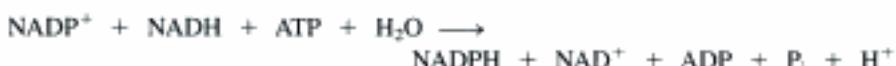
Segundo, el malato sufre una descarboxilación oxidativa por el *enzima málico dependiente de NADP⁺* (llamado también *enzima málico*).



El piruvato formado en esta reacción entra rápidamente a la mitocondria, donde se carboxila hasta oxalacetato mediante la piruvato carboxilasa.



La suma de estas tres reacciones es:



Así pues, *por cada acetil-CoA transferido desde la mitocondria al citoplasma se genera un NADPH*. Por lo tanto, se forman 8 moléculas de NADPH cuando se transfieren 8 moléculas de acetil-CoA al citoplasma para la síntesis del palmitato. *Los 6 NADPH adicionales que se requieren para este proceso proceden de la vía de las pentosas fosfato* (Sección 20.3).

La acumulación de los precursores de la síntesis de ácidos grasos es un ejemplo admirable del uso coordinado de múltiples procesos metabólicos para satisfacer una necesidad biológica. El ciclo del ácido cítrico, el transporte de oxalacetato desde la mitocondria y la vía de las pentosas fosfato proporcionan los átomos de carbono y el poder reductor, mientras que la glicolisis y la fosforilación oxidativa proporcionan el ATP para cubrir las necesidades de la síntesis de los ácidos grasos (Figura 22.28).

Los inhibidores de la ácido graso sintasa pueden ser fármacos útiles

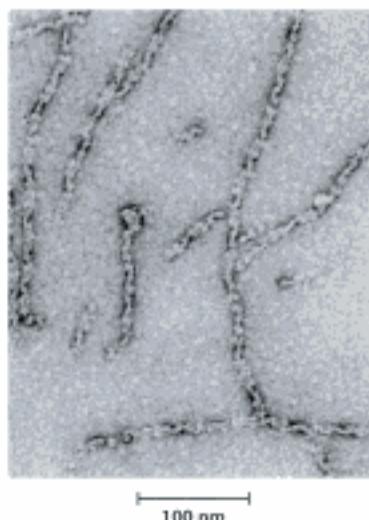
La ácido graso sintasa está sobreexpresada en algunos cánceres. Intrigados por esta observación, algunos investigadores, ensayaron inhibidores de la ácido graso sintasa en ratones para averiguar si afectaban el crecimiento del tumor.

Hidden page

este modo, la carboxilasa se inactiva cuando la carga energética es baja. Las grasas no se sintetizan cuando hay demanda de energía.

La acetil-CoA carboxilasa también se estimula allostéricamente por el citrato. El citrato actúa de una manera poco común sobre la acetil-CoA carboxilasa inactiva, que se presenta como dímeros aislados. *El citrato facilita la polimerización de los dímeros inactivos a filamentos activos* (Figura 22.30). Además, la polimerización inducida por el citrato puede revertir parcialmente la inhibición producida por la fosforilación (Figura 22.31). La concentración de citrato es elevada cuando tanto el acetil-CoA como el ATP son abundantes indicando que hay materia prima y energía disponible para la síntesis de los ácidos grasos. El efecto estimulador del citrato sobre la carboxilasa es contrarrestado por el palmitil-CoA, que abunda cuando hay un exceso de ácidos grasos. El palmitil-CoA provoca que los filamentos se desensamblen en las subunidades inactivas. El palmitil-CoA también inhibe a la translocasa que transfiere citrato desde la mitocondria al citoplasma, así como a la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, que genera NADPH en la vía de las pentosas fosfato.

La acetil-CoA carboxilasa también desempeña un papel en la regulación de la degradación de los ácidos grasos. El malonil-CoA, el producto de la reacción de la carboxilasa, está presente a concentraciones elevadas cuando abundan las moléculas combustibles. *El malonil-CoA inhibe a la carnitina aciltransferasa I, evitando el acceso de los ácidos grasos a la matriz mitocondrial en momentos de plenitud*. El malonil-CoA es un inhibidor especialmente eficaz de la carnitina aciltransferasa I de corazón y músculo, tejidos que por sí mismos poseen escasa capacidad de síntesis de ácidos grasos. En estos tejidos, la acetil-CoA carboxilasa puede ser un enzima exclusivamente regulador.



100 nm

Figura 22.30 Filamentos de acetil-CoA carboxilasa. La micrografía electrónica muestra la forma filamentosa enzimáticamente activa de la acetil-CoA carboxilasa de hígado de pollo. La forma inactiva es un dímero formado por subunidades de 265 kd. [Cortesía del Dr. M. Daniel Lane.]

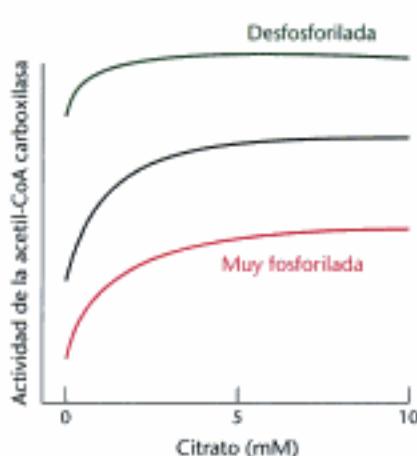
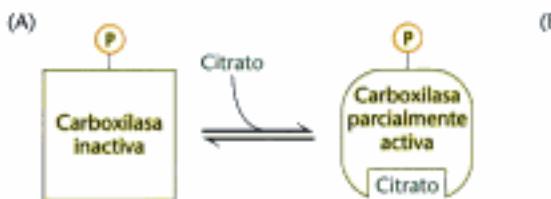


Figura 22.31 Dependencia de la actividad catalítica de la acetil-CoA carboxilasa con la concentración de citrato. (A) El citrato puede activar parcialmente la carboxilasa fosforilada. (B) La forma desfosforilada de la carboxilasa es muy activa incluso en ausencia de citrato. El citrato contrarresta parcialmente la inhibición producida por la fosforilación. [Tomado de G. M. Mabrouk, I. M. Helmy, K. G. Thampy y S. J. Wakil. *J. Biol. Chem.* 265 (1990):6330-6338.]

La acetil-CoA carboxilasa se regula por diversas hormonas

La carboxilasa se controla por las hormonas glucagón, adrenalina e insulina, que indican la situación energética del conjunto del organismo. *La insulina estimula la síntesis de los ácidos grasos al activar a la carboxilasa, mientras que el glucagón y la adrenalina ejercen el efecto opuesto*.

Regulación por glucagón y adrenalina. Considérese de nuevo a una persona que se acaba de despertar de un sueño nocturno y comienza a hacer ejercicio. Como se ha indicado, el almacén de glucógeno será bajo, pero los lípidos estarán disponibles para su movilización.

Como ya se mencionado, las hormonas glucagón y adrenalina, presentes en situaciones de ayuno y ejercicio, estimularán la liberación de ácidos grasos de los triacilgliceroles del tejido adiposo, que serán liberados a la sangre, y posiblemente captados por el tejido muscular, donde se emplearán de inmediato como combustible.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

- Kim, K. H., Lopez, C. F., Bai, D. H., Luo, X. y Pape, M. E., 1989. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 3:2250-2256.
- Witters, L. A. y Kemp, B. E., 1992. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267:2864-2867.
- Cohen, P. y Hardie, D. G., 1991. The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated indirectly by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1094:292-299.
- Moore, F., Weekes, J. y Hardie, D. G., 1991. Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase: A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur. J. Biochem.* 199:691-697.
- Eicosanoides**
- Nakamura, M. T. y Nara, T. Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of D6, D5, and D9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24:345-376.
- Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L. y Garrido, R. M., 2000. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 289:1933-1937.
- Smith, T., McCracken, J., Shin, Y. K. y DeWitt, D., 2000. Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H2 synthase-2 (cyclooxygenase-2). *J. Biol. Chem.* 275:40407-40415.
- Kalgutkar, A. S., Crews, B. C., Rowlinson, S. W., Garner, C., Seibert, K. y Marnett L. J., 1998. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science* 280:1268-1270.
- Lands, W. E., 1991. Biosynthesis of prostaglandins. *Annu. Rev. Nutr.* 11:41-60.
- Sigal, E., 1991. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol.* 260:L13-L28.
- Weissmann, G., 1991. Aspirin. *Sci. Am.* 264(1):84-90.
- Vane, J. R., Flower, R. J. y Botting, R. M., 1990. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* (12 suppl.):IV12-IV23.
- Enfermedades genéticas**
- Brivet, M., Boutron, A., Slama, A., Costa, C., Thullier, L., Demaugre, F., Rabier, D., Saudubray, J. M. y Bonnefont, J. P., 1999. Defects in activation and transport of fatty acids. *J. Inherited Metab. Dis.* 22:428-441.
- Wanders, R. J., van Grunsven, E. G. y Jansen, G. A., 2000. Lipid metabolism in peroxisomes: Enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* 28:141-149.
- Wanders, R. J., Vreken, P., den Boer, M. E., Wijburg, F. A., van Gennip, A. H. y Ijlst, L., 1999. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β-oxidation. *J. Inherited Metab. Dis.* 22:442-487.
- Kerner, J. y Hoppel, C., 1998. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu. Rev. Nutr.* 18:179-206.
- Bartlett, K. y Pourfazam, M., 1998. Recent developments in the detection of inherited disorders of mitochondrial β-oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* 26:145-152.
- Pöltl, R. J., 1995. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation. *J. Inherited Metab. Dis.* 18:473-490.
- Roe, C. R. y Coates, P. M., 1995. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (7th ed., pp. 1501-1534), editado por C. R. Striver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden y D. S. Fredrickson. McGraw-Hill.

Problemas

1. *Después de la lipólisis.* Escribir una ecuación ajustada para la conversión del glicerol en piruvato. Además de los enzimas de la vía glicolítica, ¿qué otros enzimas se requieren?
2. *De los ácidos grasos a los cuerpos cetónicos.* Escribir una ecuación ajustada para la conversión del estearato en acetacetato.
3. *Contrapunto.* Comparar y contrastar la oxidación y la síntesis de los ácidos grasos con respecto a:
 - Lugar de los procesos.
 - Transportador de los acilos.
 - Reductores y oxidantes.
 - Estereoquímica de los intermediarios.
 - Dirección de síntesis o degradación.
 - Organización del sistema enzimático.
4. *Orígenes.* Para cada uno de los siguientes ácidos grasos insaturados, indicar si el precursor biosintético en los animales es el palmitoleato, oleato, linoleato o linoléato.

(a) 18:1 <i>cis</i> -Δ ¹¹	(d) 20:3 <i>cis</i> -Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹
(b) 18:3 <i>cis</i> -Δ ⁶ , Δ ⁹ , Δ ¹²	(e) 22:1 <i>cis</i> -Δ ¹³
(c) 20:2 <i>cis</i> -Δ ⁹ , Δ ¹²	(f) 22:6 <i>cis</i> -Δ ⁴ , Δ ⁷ , Δ ¹⁰ , Δ ¹³ , Δ ¹⁶ , Δ ¹⁹
5. *Carbonos trazadores.* Considerar un extracto celular que sintetiza activamente palmitato. Suponer que la acido graso sintasa en esta preparación forma una molécula de palmitato en unos cinco minutos. Una gran cantidad de malonil-CoA marcado con ¹⁴C en cada átomo de carbono de su componente malonilo se añade repentinamente a este sistema. La síntesis de los ácidos grasos se detiene un minuto después mediante alteración del pH y se analiza la radiactividad de los ácidos grasos en el sobrenadante. ¿Qué átomo de carbo-
- bono del palmitato formado por este sistema será más radiactivo, el C-1 o el C-14?
6. *Dirigido por la descarboxilación.* ¿Cuál es la función de la descarboxilación en la síntesis de los ácidos grasos? Citar otra reacción clave en una vía metabólica que utilice un mecanismo análogo.
7. *Sobresaturación de quinasa.* Suponer que una mutación en el promotor ocasiona una superproducción de proteína quinasa A en adipocitos. ¿Cómo afectaría esta mutación al metabolismo de los ácidos grasos?
8. *Un mutante no aceptor.* El residuo de serina de la acetil-CoA carboxilasa, que es la diana de la proteína quinasa dependiente de AMP, sufre una mutación a alanina. ¿Cuál sería la consecuencia lógica de esta mutación?
9. *Capacidad bloqueada.* La presencia de una molécula combustible en el citoplasma no asegura que pueda ser utilizada eficazmente. Citar dos ejemplos de cómo un defecto en el transporte de metabolitos entre compartimientos puede producir una enfermedad.
10. *Inversión elegante.* Los peroxisomas tienen una vía alternativa para oxidar los ácidos grasos poliinsaturados. Poseen una hidratasa que convierte el D-3-hidroxiacil-CoA en *trans*-Δ²-enoil-CoA. ¿Cómo podría utilizarse este enzima para oxidar acilos que contuvieran un doble enlace *cis* en un átomo de carbono par (por ejemplo, el doble enlace *cis*-Δ¹² del linoleato)?
11. *Cáustrofe por covalencia.* ¿Cuál sería una posible desventaja de poseer muchos centros catalíticos próximos entre sí en la misma cadena polipeptídica muy larga?

Hidden page

Hidden page

Distintos coenzimas desempeñan papeles importantes en la degradación de los aminoácidos, entre ellos destaca el *piridoxal fosfato*. Este coenzima forma bases de Schiff intermedias que permiten transferir los grupos α -amino entre aminoácidos y cetoácidos. Estudiaremos varios errores genéticos de la degradación de aminoácidos que producen lesiones cerebrales y retraso mental, a menos que se inicie el tratamiento médico desde del nacimiento. La *fenilcetonuria*, debida a un bloqueo de la transformación de la fenilalanina en tirosina, puede diagnosticarse fácilmente y tratarse mediante la eliminación de la fenilalanina de la dieta. El estudio del metabolismo de los aminoácidos es especialmente gratificante porque ofrece abundantes conexiones entre la bioquímica básica y la medicina clínica.

23.1 Las proteínas se degradan a aminoácidos

TABLA 23.1 Aminoácidos esenciales en humanos

Histidina
Isoleucina
Leucina
Lisina
Metionina
Fenilalanina
Treonina
Triptófano
Valina

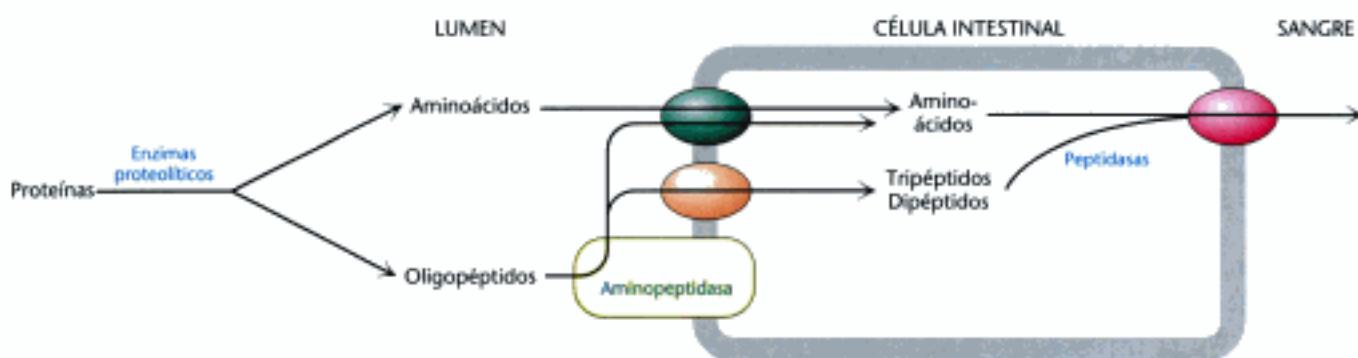
Las proteínas de la dieta son una fuente fundamental de aminoácidos, en particular, aquellas proteínas que contienen aminoácidos esenciales (aminoácidos que no pueden sintetizarse y deben obtenerse en la dieta) (Tabla 23.1). Las proteínas ingeridas con la dieta se digieren hasta aminoácidos o péptidos pequeños que pueden absorberse en el intestino y transportarse a través de la sangre. Otra fuente importante de aminoácidos es la degradación de proteínas celulares.

La digestión de las proteínas de la dieta comienza en el estómago y se completa en el intestino

La digestión de las proteínas comienza en el estómago, donde el medio ácido favorece la desnaturización proteica. Las proteínas desnaturizadas son más accesibles como sustratos para la proteólisis que las proteínas nativas. El principal enzima proteolítico del estómago es la *pepsina*, una proteasa inespecífica que, sorprendentemente, tiene un máximo de actividad a pH 2. De este modo, aunque en el medio extremadamente ácido del estómago sufren desnaturización otras proteínas, la pepsina puede mantenerse activa.

La degradación de las proteínas continúa en la luz del intestino debido a la actividad de los enzimas proteolíticos secretados por el páncreas. Estas proteínas, introducidas en los Capítulos 9 y 10 (Secciones 9.1 y 10.4), se segregan como zimógenos inactivos que después se convierten en enzimas activos. Esta batería de enzimas exhibe un amplio abanico de especificidades, de modo que los sustratos se degradan a aminoácidos libres, así como a dipéptidos y tripéptidos. Las proteasas que se localizan en la membrana plasmática de las células intestinales, como la aminopeptidasa N, continúan la digestión. Las aminopeptidasas digieren las proteínas desde el extremo amino terminal. Los aminoácidos simples, así como los dipéptidos y tripeptidos, se transportan desde la luz intestinal al interior de los enterocitos y, posteriormente, se liberan a la sangre para su captación por otros tejidos (Figura 23.1).

Figura 23.1 Digestión y absorción de las proteínas. La digestión proteica es en primer lugar el resultado de la actividad de enzimas secretadas por el páncreas. Las aminopeptidasas asociadas al epitelio intestinal digieren aún más las proteínas. Los aminoácidos y los di- y tripeptídos se absorben en las células intestinales mediante transportadores específicos. Los aminoácidos libres se liberan después a la sangre para su utilización por otros tejidos.



Hidden page

Hidden page

lia E3 es una de las familias de proteínas mayores en humanos. Esta diversidad viene justificada por la gran variedad de proteínas que son objeto de destrucción.

Tres ejemplos demuestran la importancia de los enzimas E3 en el funcionamiento normal de la célula. Las proteínas que no se degradan como consecuencia de un enzima E3 defectuoso pueden acumularse dando lugar a enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas tales como el Parkinson juvenil o de aparición prematura. Un defecto en otro miembro de la familia de los enzimas E3 causa el síndrome de Angelman, una anomalía neurológica grave caracterizada por retraso mental, falta de habla, descoordinación en el movimiento, e hiperactividad. Por el contrario, el recambio incontrolado de proteínas también puede crear situaciones patológicas peligrosas. Por ejemplo, el virus del papiloma humano (HPV) codifica una proteína que activa un enzima E3 específico. El enzima produce la ubiquitinación del supresor tumoral p53 y de otras proteínas que controlan la reparación del DNA, que posteriormente se destruyen. La activación de este enzima E3 se ha observado en más del 90% de los carcinomas cervicales. Así, el marcaje inapropiado de proteínas reguladoras, claves para la destrucción, puede desencadenar sucesos posteriores, conduciendo a la formación de un tumor.

El proteasoma digiere las proteínas marcadas con ubiquitina

Si la ubiquitina es la marca de la muerte, ¿quién es el verdugo? *Un gran complejo proteasa denominado proteasoma o proteasoma 26S digiere las proteínas ubiquitinadas.* Esta proteasa, integrada por muchas subunidades e impulsada por ATP, recupera la ubiquitina, que posteriormente se reciclará. El proteasoma 26S es un complejo de dos componentes: una unidad catalítica (20S) y una unidad reguladora (19S).

La unidad 20S está construida a partir de dos copias de 14 subunidades homólogas cada una y tiene una masa de 700 kd (Figura 23.5). Las subunidades están organizadas en cuatro anillos de 7 subunidades cada uno que se apilan para formar una estructura que se asemeja a un barril. Los dos anillos exteriores del barril están compuestos por las denominadas subunidades α , y los dos anillos centrales por las subunidades β . El núcleo catalítico 20S es un barril sellado. *El acceso al interior está controlado por la unidad reguladora 19S,* él mismo es un complejo proteico de 700 kd formado por 20 subunidades. A ambos extremos del núcleo catalítico 20S se unen sendos complejos 19S para formar el proteasoma 26S completo (Figura 23.6). La unidad 19S se une específicamente a las cadenas de poliubiquitina, asegurando así que únicamente las proteínas ubiquitinadas se degraden. Los componentes clave del complejo 19S son seis ATPasas pertenecientes a la clase AAA (ATPasa asociada con varias actividades celulares). Parece ser que la hidrólisis de ATP podría ayudar al complejo 19S a desdoblar al sustrato e inducir cambios conformativos en el núcleo catalítico 20S, de manera que el sustrato pueda entrar en el centro del complejo.

Los sitios proteolíticos activos se encuentran en el interior del barril para proteger los potenciales sustratos hasta que se hayan llegado a su interior. Hay tres tipos de centros activos en las subunidades β , cada uno con diferente especificidad, pero todos emplean una treonina N-terminal. El grupo hidroxilo del residuo de treonina ejerce un ataque nucleofílico sobre los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos para formar intermediarios acil-enzima (p. 244). Los sustratos se degradan de forma progresiva sin liberar intermediarios de degradación hasta que el sustrato ha sido reducido a péptidos cuyo tamaño oscila entre siete y nueve aminoácidos. Por último, una isopeptidasa de la subunidad 19S escinde a las moléculas intactas de ubiquitina de los péptidos resultantes. La ubiquitina se recicla y los productos peptídicos se degradarán posteriormente por otras proteasas celulares para rendir aminoácidos individuales. Así, la vía de la ubiquitinación y el proteasoma cooperan para degradar proteínas indeseadas. La Figura 23.7 presenta una visión general de los destinos de los aminoácidos que siguen una digestión mediada por el proteasoma.

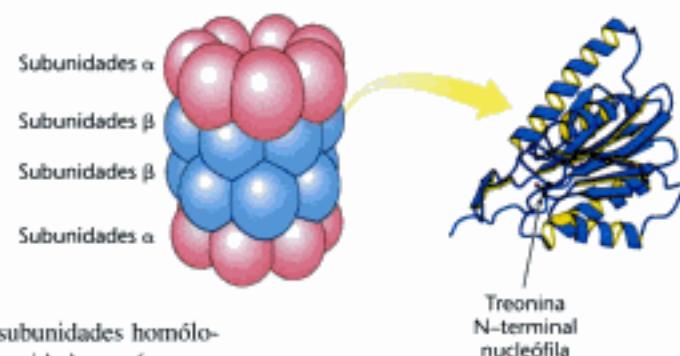


Figura 23.5 Proteasoma 20S. El proteasoma 20S consta de 28 subunidades homólogas (α , en rojo; β , en azul), organizadas en cuatro anillos de 7 subunidades cada uno. Algunas de las subunidades β contienen centros activos proteásicos en los extremos amino. [Subunidad tomada de TRYp.pdb.]

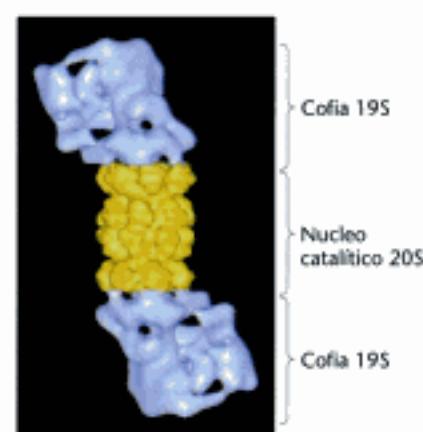


Figura 23.6 Proteasoma 26S. En cada extremo de la unidad catalítica 20S hay unida una cofia 19S. [Tomado de W. Baumeister, J. Walz, F. Zuhl y E. Seemüller. Cell 92(1998):367. Cortesía del Dr. Wolfgang Baumeister.]

Figura 23.7 El proteasoma y otras proteasas generan aminoácidos libres. Las proteínas ubiquitinadas se degradan hasta fragmentos peptídicos de los cuales se elimina la ubiquitina, que posteriormente será reciclada. Los fragmentos peptídicos se digieren posteriormente hasta aminoácidos, que serán utilizados en reacciones biosintéticas, en particular en la síntesis de proteínas. Alternativamente, el grupo amino se escinde y se procesa hasta urea (p. 661) y el esqueleto carbonado puede utilizarse para sintetizar carbohidratos o grasas o bien utilizarse directamente como combustible en la respiración celular.

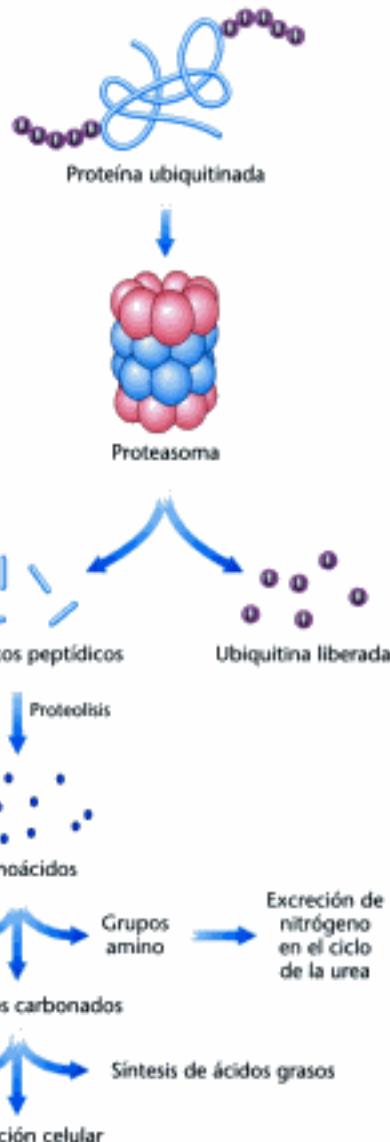
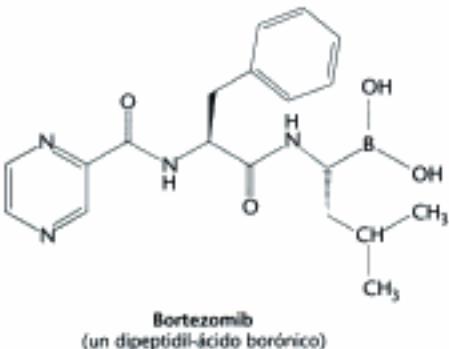


TABLA 23.3 Procesos regulados por degradación de proteínas

Transcripción de genes
Progresión del ciclo celular
Formación de órganos
Ritmos circadianos
Respuesta inflamatoria
Supresión tumoral
Metabolismo del colesterol
Procesamiento de antígenos

La degradación de las proteínas puede utilizarse para regular funciones biológicas

 La Tabla 23.3 es un listado de varios procesos fisiológicos que están controlados, al menos en parte, por la degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteasoma. En todos los casos, las proteínas que se degradan son proteínas reguladoras. Consideremos, por ejemplo, el control de la respuesta inflamatoria. Un factor de transcripción denominado *NF-κB* (*NF* indica *nuclear factor*) inicia la expresión de un número de genes que participan en esta respuesta. El propio factor se activa mediante la degradación de una proteína inhibidora, *I-κB* (*I* significa inhibidor). En respuesta a las señales de inflamación que se unen a los receptores de membrana, el *I-κB* se fosforila en dos serinas, creando un centro de unión al E3. La unión al E3 conduce a la ubiquitinación y degradación del *I-κB*, lo que rompe la asociación del inhibidor con el *NF-κB*. El factor de transcripción liberado migra al núcleo para estimular la transcripción de los genes diana. El sistema *NF-κB/I-κB* ilustra la interacción de varios motivos reguladores clave: la transducción de señales mediadas por receptor, la fosforilación, la compartmentalización, la degradación específica y controlada, y la expresión selectiva de genes. La importancia de este sistema ubiquitina-proteasoma en la regulación de la expresión génica se resalta con la reciente aprobación de bortezomib (Velcade), un potente inhibidor del proteasoma, como terapia



Hidden page

Hidden page

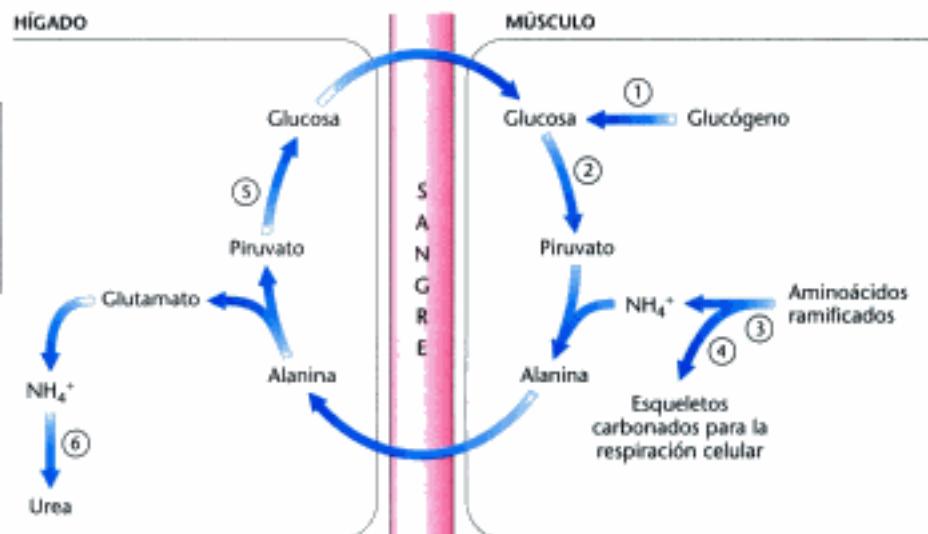
Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

- Vías activas:
- Ruptura del glucógeno, cap. 21
 - Glicolisis, cap. 16
 - Ciclo del ácido cítrico, cap. 17
 - Fosforilación oxidativa, cap. 18
 - Gluconeogénesis, cap. 16
 - Ciclo de la urea, cap. 23



amino, finalmente, aparece como urea. A este transporte se le denomina *ciclo de la alanina*, que recuerda al ciclo de Cori tratado anteriormente (p. 468). No obstante, a diferencia del ciclo de Cori, el piruvato no se reduce a lactato mediante NADH y, por lo tanto, hay más electrones de alta energía disponibles para la fosforilación oxidativa.

El nitrógeno también puede transportarse como glutamina. La glutamina sintetasa (p. 683) cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y NH_4^+ en una reacción dependiente de ATP:



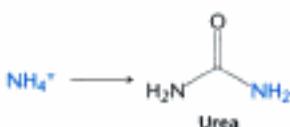
El nitrógeno de la glutamina puede convertirse en urea en el hígado.

Figura 23.16 Vía de integración. Ciclo de la alanina. Durante el ejercicio prolongado el músculo utiliza aminoácidos de cadena ramificada como combustible. El nitrógeno eliminado se transfiere (mediante el glutamato) a la alanina, que se libera al torrente sanguíneo. En el hígado, se capta la alanina y se convierte en piruvato para su posterior utilización en la síntesis de glucosa.

23.4 En la mayoría de los vertebrados terrestres el ion amonio se convierte en urea

Parte del NH_4^+ que se forma en la degradación de los aminoácidos se consume en la biosíntesis de compuestos nitrogenados. En la mayoría de los vertebrados terrestres, el NH_4^+ excedente se transforma en urea, que posteriormente se excreta. A estos organismos se les denomina *ureotélicos*.

En los vertebrados terrestres la urea se sintetiza en el *ciclo de la urea* (Figura 23.17). El ciclo de la urea, propuesto por Hans Krebs y Kurt Henseleit en 1932, fue la primera vía metabólica cíclica que se descubrió. Uno de los átomos de nitrógeno de la urea se obtiene por transferencia desde un aminoácido, el aspartato. El otro átomo de nitrógeno procede directamente del NH_4^+ libre, y el átomo de carbono del HCO_3^- (derivado del CO_2 por hidratación; Sección 9.2).



El ciclo de la urea comienza con la formación de carbamilfosfato

El ciclo de la urea comienza con el acoplamiento de NH_3 libre con HCO_3^- para formar carbamilfosfato. Aunque el carbamilfosfato es una molécula sencilla, su síntesis es compleja y comprende tres etapas, todas ellas catalizadas por la *carbamilo-fosfato sintetasa*.

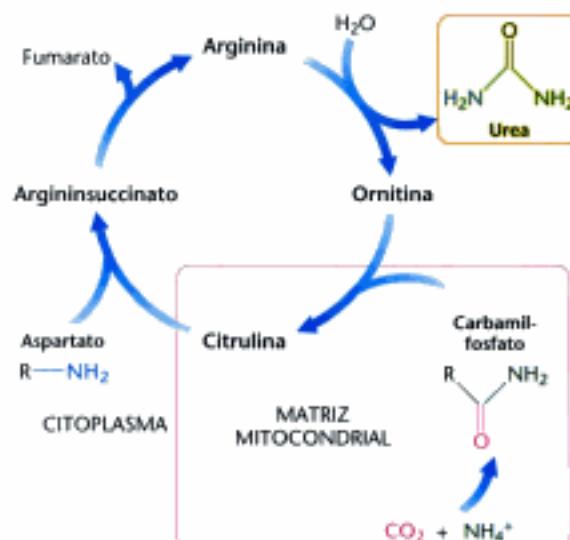
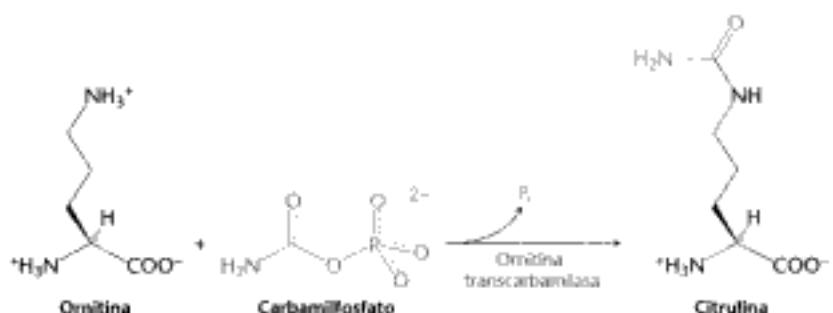


Figura 23.17 Ciclo de la urea.



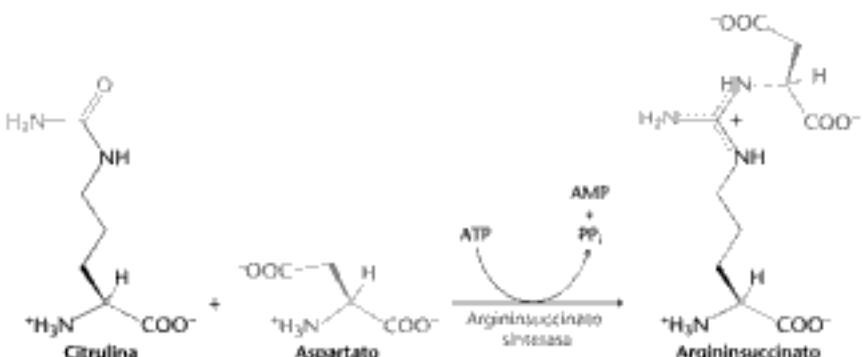
Es importante reseñar aquí que puesto que el NH_3 es una base fuerte, normalmente existe en la forma NH_4^+ en disoluciones acuosas. La reacción comienza con la fosforilación del HCO_3^- para formar carboxifosfato, que después reacciona con el amoníaco para dar lugar a ácido carbámico. Por último, una segunda molécula de ATP fosforila al ácido carbámico para formar carbamilfosfato. La estructura y el mecanismo del enzima que cataliza estas reacciones se tratarán en el Capítulo 25. El consumo de dos moléculas de ATP provoca que la síntesis de carbamilfosfato sea esencialmente irreversible. El enzima de mamíferos necesita N-acetilglutamato para su actividad, como se verá en breve.

El grupo carbamilo del carbamilfosfato, que tiene un elevado potencial de transferencia debido a su enlace anhídrido, se transfiere a la *ornitina* para formar *citrulina* en una reacción catalizada por la *ornitina transcarbamilasa*.



La ornitina y la citrulina son aminoácidos, pero no se utilizan como sillares de construcción de las proteínas. La formación del NH_4^+ por la glutamato deshidrogenasa, su incorporación al carbamilfosfato como NH_3 , y la consiguiente síntesis de citrulina tienen lugar en la matriz mitocondrial. Por el contrario, las siguientes tres reacciones del ciclo de la urea, que conducen a la formación de urea, tienen lugar en el citoplasma.

La citrulina se transporta al citoplasma, donde condensa con aspartato, el donante del segundo grupo amino de la urea. Esta síntesis de *argininsuccinato*, catalizada por la *argininsuccinato sintetasa*, está favorecida por la ruptura del ATP en AMP y pirofósforato, y la consiguiente hidrólisis del pirofósforato.



Hidden page

Hidden page

Hidden page

La urea no es la única manera de eliminar el exceso de nitrógeno

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de los vertebrados terrestres son ureotélicos: excretan el nitrógeno excedente como urea. Sin embargo, la urea no es la única forma excretable de nitrógeno. *Los organismos amoniotélicos, como los vertebrados e invertebrados acuáticos, eliminan el nitrógeno como NH₄⁺* y dependen del medio acuoso para diluir esta sustancia tóxica. De manera interesante, el pez pulmonado, que normalmente es amoniotélico, se convierte en ureotélico en tiempo de sequía, cuando vive fuera del agua.

Tanto los organismos ureotélicos como los amoniotélicos dependen, para la excreción del nitrógeno, de una cantidad suficiente de agua en distintos grados. *Por el contrario, los organismos uricotélicos, como aves y reptiles, que excretan el nitrógeno como ácido úrico, necesitan poca agua.* El ácido úrico se excreta en forma de papilla sólida que requiere muy poca cantidad de agua. La excreción de ácido úrico tiene la ventaja de eliminar cuatro átomos de nitrógeno por molécula. La vía de excreción de nitrógeno desarrollada en el curso de la evolución depende claramente del hábitat del organismo.

23.5 Los átomos de carbono de los aminoácidos degradados aparecen en los principales intermediarios metabólicos

Veamos ahora los destinos de los esqueletos carbonados de los aminoácidos después de la eliminación del grupo α-amino. *La estrategia de la degradación de los aminoácidos es transformar los esqueletos carbonados en los principales intermediarios metabólicos que puedan convertirse en glucosa o bien oxidarse en el ciclo del ácido cítrico.* La gama de las vías de conversión van desde las extremadamente simples hasta otras bastante complejas. Los esqueletos carbonados del conjunto diverso de los 20 aminoácidos fundamentales se canalizan hacia tan solo siete moléculas: *piruvato, acetil-CoA, acetacetil-CoA, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y oxalacetato.* Veremos aquí un ejemplo de la notable economía de las transformaciones metabólicas.

Los aminoácidos que se degradan a acetil-CoA o a acetacetil-CoA se denominan *cetogénicos*, puesto que dan lugar a cuerpos cetónicos o a ácidos grasos. Por el contrario, los aminoácidos que se degradan a piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato u oxalacetato se denominan *glucogénicos*. La síntesis neta de glucosa a partir de dichos aminoácidos es factible puesto que los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y el piruvato pueden convertirse en fosfoenolpiruvato y posteriormente en glucosa (p. 460). Recordemos que los mamíferos carecen de una vía para la síntesis neta de glucosa a partir del acetil-CoA o acetacetil-CoA.

Del conjunto básico de los veinte aminoácidos solamente la leucina y la lisina son puramente cetogénicos (Figura 23.22). La isoleucina, fenilalanina, triptófano y tirosina son a la vez cetogénicos y glucogénicos. Algunos de sus átomos de carbono aparecen en el acetil-CoA o en el acetacetil-CoA, mientras que otros aparecen en precursores potenciales de la glucosa. Los 14 aminoácidos restantes se clasifican como puramente glucogénicos. Esta clasificación no está universalmente aceptada porque se aplican distintos criterios cuantitativos. El que un aminoácido sea considerado glucogénico, cetogénico o mixto, depende en parte del criterio del observador, aunque la mayoría de los carbonos de los aminoácidos claramente terminan en glucosa o glucógeno. Nosotros identificaremos las vías de degradación según el punto de entrada en el metabolismo.

El piruvato es el punto de entrada al metabolismo de muchos aminoácidos

El piruvato es el punto de entrada de los aminoácidos de tres carbonos (alanina, serina y cisteína) en la corriente principal del metabolismo (Figura 23.23). La transaminación de la alanina origina directamente piruvato:



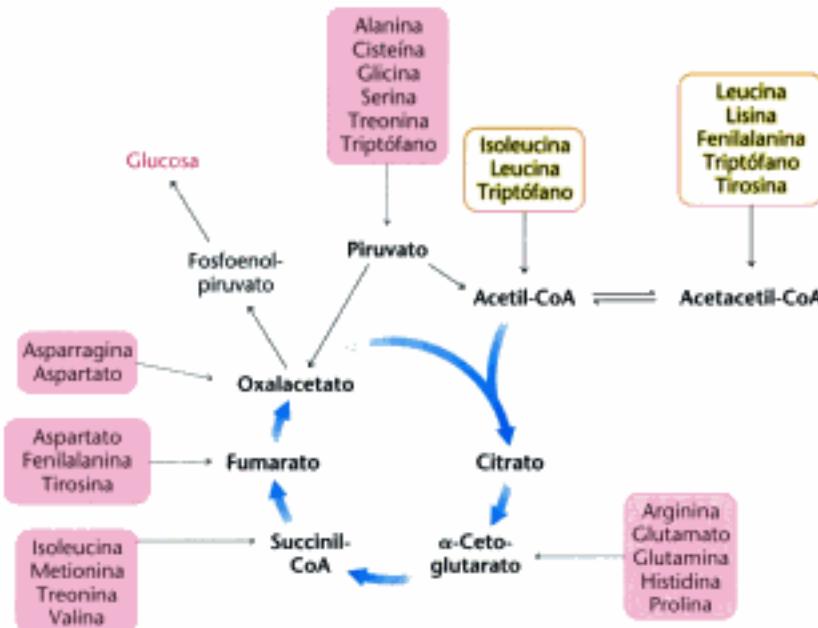


Figura 23.22 Destinos de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Los aminoácidos glucogénicos se muestran en rojo y los cetogénicos en amarillo. Algunos aminoácidos son a la vez glucogénicos y cetogénicos.

Como ya se ha mencionado con anterioridad (p. 656), el glutamato se desamina después, originando NH_4^+ y regenerando el α -cetoglutarato. La suma de estas reacciones da:



Otra reacción sencilla en la degradación de los aminoácidos es la *desaminación de la serina a piruvato* por medio de la *serina deshidratasa* (p. 660).



La cisteína puede transformarse en piruvato por varias vías, apareciendo su átomo de azufre en los compuestos: H_2S , SCN^- o SO_3^{2-} .

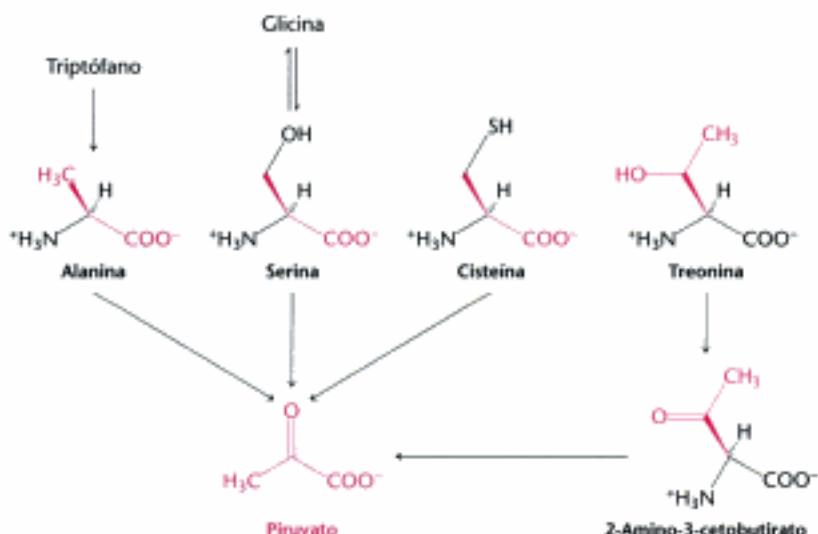


Figura 23.23 Formación de piruvato a partir de aminoácidos. El piruvato es el punto de entrada de la alanina, serina, cisteína, glicina, treonina y triptófano.

Los átomos de carbono de otros tres aminoácidos pueden transformarse en piruvato. La *glicina* puede convertirse en serina por adición enzimática de un grupo hidroximetilo o bien puede escindirse para originar CO_2 , NH_4^+ y un fragmento monocarbonado activado. La *treonina* puede llegar hasta piruvato a través del 2-amino-3-cetobutirato intermedio. Tres átomos de carbono del *triptófano* pueden aparecer en la alanina, que se puede convertir en piruvato.

El oxalacetato es el punto de entrada al metabolismo para el aspartato y la asparragina

El aspartato y la asparragina se convierten en oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. El *aspartato*, un aminoácido de cuatro carbonos, *se transamina directamente a oxalacetato*:



La *asparragina* es hidrolizada por la *asparraginasa* a NH_4^+ y aspartato, que después se transamina.

Recordemos que el aspartato puede además convertirse en *fumarato* en el ciclo de la urea (p. 663). El fumarato también es punto de entrada para la mitad de los átomos de carbono de la *tirosina* y la *fenilalanina*, como se estudiará en breve.

El α -cetoglutarato es el punto de entrada al metabolismo para los aminoácidos de cinco átomos de carbono

Los esqueletos carbonados de varios aminoácidos de cinco carbonos entran en el ciclo del ácido cítrico a nivel del *α -cetoglutarato*. Estos aminoácidos se convierten primero en *glutamato*, que después es desaminado oxidativamente por la glutamato deshidrogenasa para originar *α -cetoglutarato* (Figura 23.24).

La *histidina* se convierte en 4-imidazolona-5-propionato (Figura 23.25). El enlace amida en el anillo de este intermediario se hidroliza al derivado *N*-formimino del glutamato, el cual se convierte en glutamato por transferencia de su grupo formimino al tetrahidrofolato, un portador de unidades de un carbono activadas (p. 689).

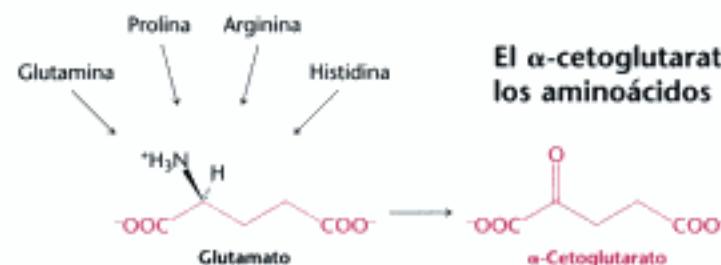


Figura 23.24 Formación de α -cetoglutarato a partir de aminoácidos. El α -cetoglutarato es el punto de entrada de varios aminoácidos de cinco carbonos que primero se convierten en glutamato.

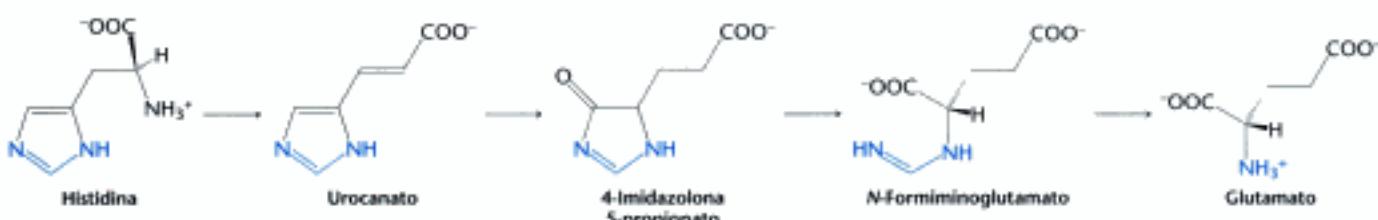


Figura 23.25 Degradación de la histidina. Conversión de la histidina en glutamato.

La *glutamina* se hidroliza a glutamato y NH_4^+ por la acción de la *glutaminasa*. La *prolina* y la *arginina* se convierten a su vez en el γ -semialdehído glutámico, que después se oxida a glutamato (Figura 23.26).

El succinil-CoA es el punto de entrada para varios aminoácidos no polares

El succinil-CoA es un punto de entrada para algunos de los átomos de carbono de la *metionina*, *isoleucina* y *valina*. El *propionil-CoA* y después el *metilmalonil-CoA* son intermediarios en la degradación de estos tres aminoácidos no polares (Figura 23.27). El mecanismo para la interconversión del *propionil-CoA* y el *metilmala-*

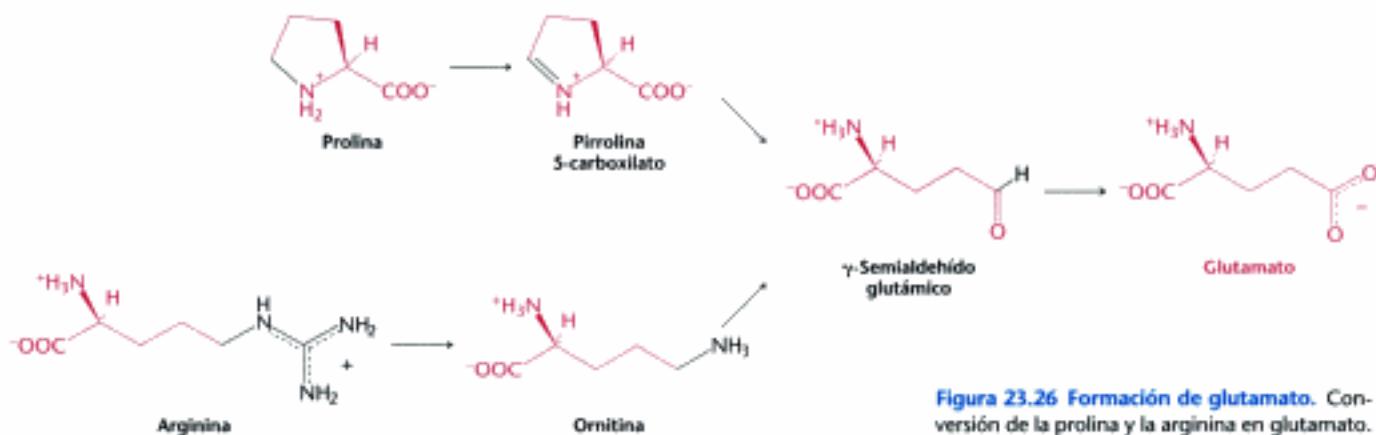


Figura 23.26 Formación de glutamato. Conversión de la prolina y la arginina en glutamato.

Ionil-CoA se trató en la página 629. Esta vía de propionil-CoA a succinil-CoA también se emplea en la oxidación de los ácidos grasos que tienen número impar de átomos de carbono (p. 627).

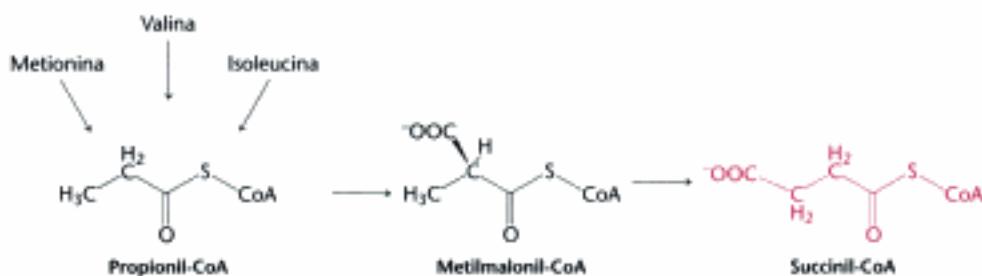
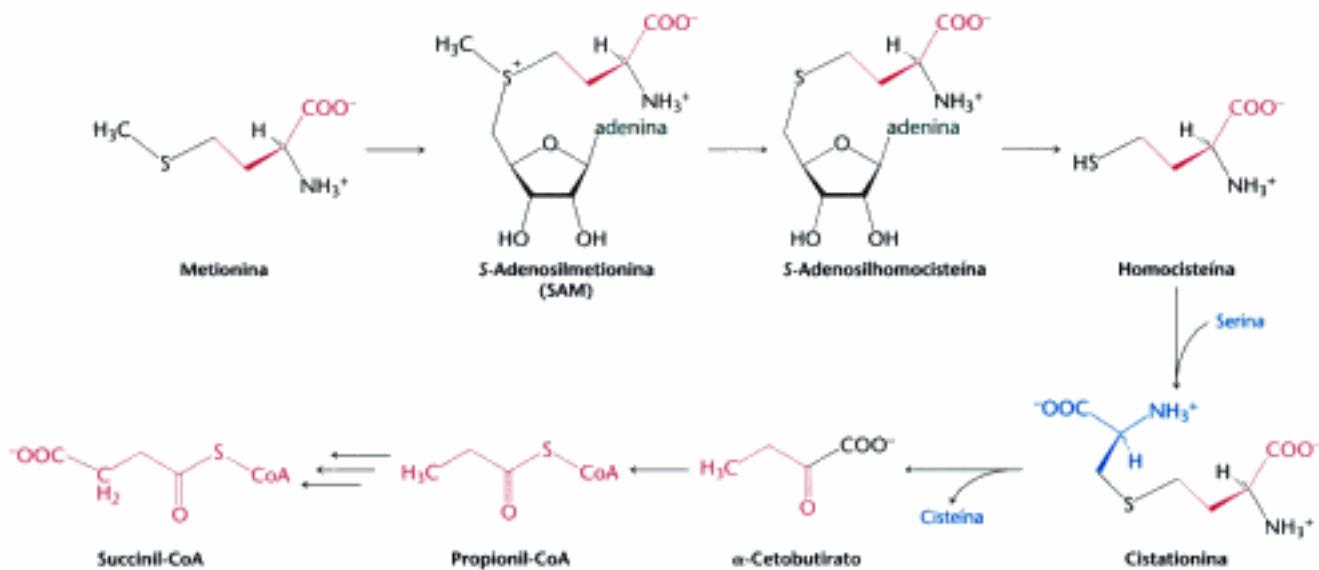


Figura 23.27 Formación de succinil-CoA. Conversión de la metionina, isoleucina y valina en succinil-CoA.

La degradación de la metionina requiere la formación de un donante de metilos clave, la S-adenosilmetionina

La metionina se convierte en succinil-CoA en nueve etapas (Figura 23.28). La primera de ellas es la adenilación de la metionina para formar *S*-adenosilmetionina (SAM), un dador de metilos común de la célula (p. 691). La pérdida del metilo y la desadenilación conducen a la homocisteína, que se convierte finalmente en α -ceto-*butirato*. El complejo enzimático α -cetoácido deshidrogenasa descarboxila oxidativamente al α -cetoácido hasta propionil-CoA, que se transforma en succinil-CoA como se describió en la página 627.

Figura 23.28 Metabolismo de la metionina. Vía para la conversión de la metionina en succinil-CoA. La *S*-adenosilmetionina, que se forma a lo largo de esta vía, es una molécula importante para la transferencia de grupos metilo.

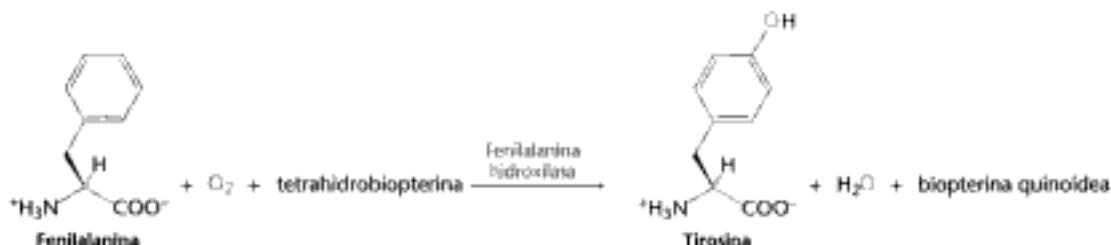


Hidden page

isoleucina origina acetil-CoA y propionil-CoA, mientras que la valina libera CO₂ y propionil-CoA. Como ya se ha comentado anteriormente (Capítulo 15), el número de reacciones en el metabolismo es elevado, pero el número de *clases* de reacciones es relativamente pequeño. La degradación de la leucina, valina e isoleucina son una brillante ilustración de la simplicidad y elegancia que subyacen en el metabolismo.

Para la degradación de los aminoácidos aromáticos se requieren oxigenasas

La degradación de los aminoácidos aromáticos rinde como productos finales el acetacetato, el fumarato y el piruvato. La degradación de los aminoácidos aromáticos no es tan sencilla como la de los aminoácidos previamente estudiados. Para los aminoácidos aromáticos *se utiliza oxígeno molecular para romper un anillo aromático*. La degradación de la fenilalanina comienza con su hidroxilación a tirosina, reacción catalizada por la *fenilalanina hidroxilasa*. Este enzima se denomina *monooxigenasa* (*u oxidasa de función mixta*) porque *uno de los átomos del O₂* aparece en el producto resultante y el otro en el H₂O.



Aquí el reductor es la *tetrahidrobiopterina*, un transportador de electrones que no hemos estudiado anteriormente y que deriva del cofactor *biopterina*. Puesto que la biopterina se sintetiza en el organismo, no es una vitamina. La tetrahidrobiopterina se forma inicialmente por reducción de la dihidrobiopterina por el NADPH en una reacción catalizada por la *dihidrofolato reductasa* (Figura 23.29). La forma quinoidal de la dihidrobiopterina se produce en la hidroxilación de la fenilalanina. Esta se reduce nuevamente a tetrahidrobiopterina mediante NADPH en una reacción catalizada por la *dihidropteridina reductasa*. La suma de las reacciones catalizadas por la fenilalanina hidroxilasa y la dihidropteridina reductasa es:



Obsérvese que estas reacciones también pueden utilizarse para sintetizar tirosina a partir de fenilalanina.

La etapa siguiente en la degradación de la fenilalanina y la tirosina es la transaminación de la tirosina a *p-hidroxifenilpiruvato* (Figura 23.30). Este α-cetoácido reacciona después con el O₂ para formar *homogentisato*. El enzima que cataliza esta compleja reacción, la *p-hidroxifenilpiruvato hidroxilasa*, se conoce como *dioxigenasa* porque incorpora los *dos átomos del O₂* en el producto resultante, uno en el

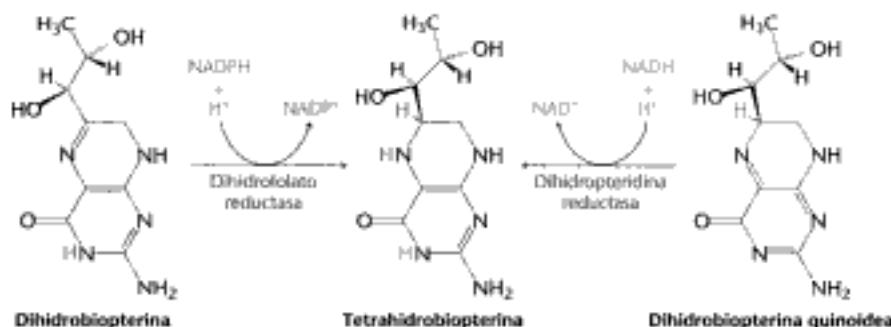
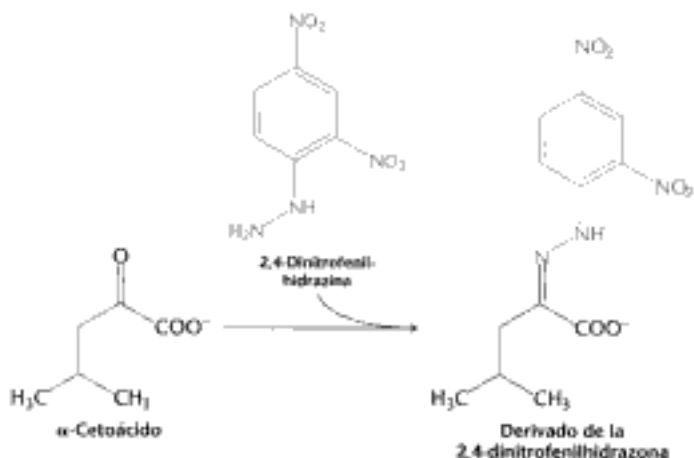


Figura 23.29 Formación de la tetrahidrobiopterina, un importante portador de electrones. La tetrahidrobiopterina puede formarse por reducción de cualquiera de las dos formas de la dihidrobiopterina.

Hidden page

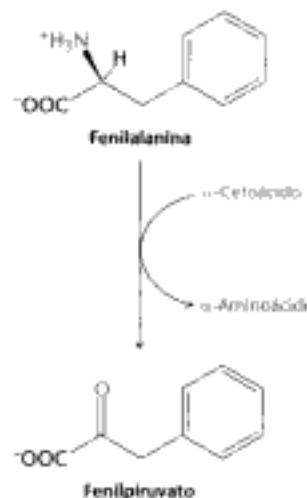
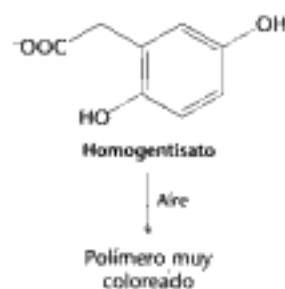
homogentisato oxidasa. En 1902, Archibald Garrod demostró que la alcaptonuria se transmite como un único carácter mendeliano recesivo. Además, descubrió que el homogentisato es un intermediario normal de la degradación de la fenilalanina y la tirosina (véase la Figura 23.30), y que dicho ácido se acumula en la alcaptonuria debido a que su degradación está bloqueada. Concluyó diciendo que "la ruptura del anillo bencénico en el metabolismo normal se realiza mediante la acción de un enzima especial que en la alcaptonuria congénita está ausente". El homogentisato se acumula y se excreta por la orina, la cual se oscurece al cabo de un cierto tiempo por la oxidación y polymerización del homogentisato a una sustancia del tipo de las melaninas.

Aunque la alcaptonuria es una enfermedad relativamente benigna, no es éste el caso de otros errores del metabolismo de los aminoácidos. En la *enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce*, la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos derivados de la valina, isoleucina y leucina está bloqueada porque la deshidrogenasa de cadenas ramificadas falta o es defectuosa. Por consiguiente, las concentraciones de estos α -cetoácidos y de los aminoácidos ramificados que los originan están notablemente elevados en sangre y orina. De hecho, la orina de estos pacientes tiene el olor del jarabe de arce, de ahí el nombre de la enfermedad (también llamada *cetoadiduria de cadenas ramificadas*). Esta enfermedad conduce normalmente a retraso mental y físico a menos que el paciente reciba una dieta pobre en valina, isoleucina y leucina desde el principio de su vida. La enfermedad puede detectarse fácilmente en los recién nacidos tratando las muestras de orina con 2,4-dinitrofenilhidrazina, que reacciona con los α -cetoácidos para formar derivados de la 2,4-dinitrofenilhidrazone. El diagnóstico definitivo puede hacerse por espectroscopía de masas.



La *fenilcetonuria* es quizás la enfermedad del metabolismo de los aminoácidos mejor conocida. La fenilcetonuria se debe a una *carencia o deficiencia de la fenilalanina hidroxilasa* o, más raramente, de su cofactor tetrahidrobiopterrina. La *fenilalanina se acumula en todos los líquidos corporales debido a que no puede transformarse en tirosina*. Normalmente, las tres cuartas partes de las moléculas de fenilalanina se convierten en tirosina y la otra cuarta parte se incorpora a las proteínas. En la fenilcetonuria, al estar bloqueada la vía principal, las concentraciones típicas de fenilalanina en sangre son al menos 20 veces superiores a las normales. Otros destinos minoritarios de la fenilalanina en los individuos normales, tales como la transformación en fenilpiruvato, se hacen predominantes en las personas fenilcetoníricas. En realidad, la descripción inicial de la fenicetonuria en 1934 se realizó al observar la reacción del fenilpiruvato en la orina con FeCl_3 , que la vuelve de color verde-oliva.

Casi todos los individuos con fenilcetonuria no tratados sufren un grave retraso mental. De hecho, alrededor del 1% de los pacientes de las instituciones mentales son fenilcetoníricos. El peso del cerebro de estos individuos está por debajo de lo normal, la mielinización de sus nervios es defectuosa y sus reflejos son hiperactivos. La esperanza de vida de los individuos fenilcetoníricos no tratados se acorta drásticamente. La mitad de dichos enfermos mueren antes de los veinte años, y las tres



Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

16. *Serina racemasa.* El sistema nervioso contiene una cantidad importante de D-serina, que se origina a partir de L-serina mediante la serina racemasa, un enzima dependiente de PLP. Proponer un mecanismo para esta reacción. ¿Cuál es la constante de equilibrio de la reacción L-serina \rightleftharpoons D-serina?

Problemas de integración del capítulo

17. *Doble deber.* Las señales de degradación normalmente se localizan en regiones proteicas que también facilitan las interacciones proteína-proteína. Explicar por qué puede ser útil esta coexistencia de dos funciones en el mismo dominio.

18. *Elección de combustible.* A los pocos días de comenzar un ayuno, la excreción de nitrógeno se acelera a un nivel mayor de lo normal. A las pocas semanas, la velocidad de excreción de nitrógeno cae a un nivel más bajo y continúa a esta velocidad. Sin embargo, cuando los depósitos de grasa se han vaciado, la excreción de nitrógeno aumenta a un nivel superior.

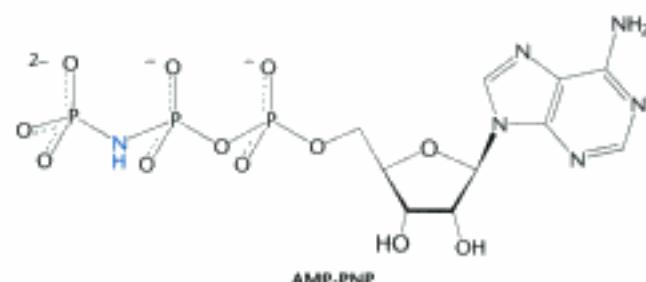
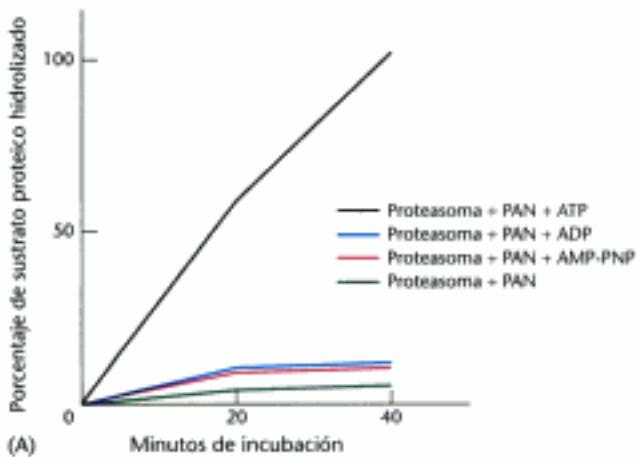
- ¿Qué sucesos desencadenan el aumento inicial de excreción de nitrógeno?
- ¿Por qué decrece la excreción de nitrógeno después de varias semanas de ayuno?
- Explicar el aumento de la excreción de nitrógeno cuando se han vaciado los depósitos de grasa.

19. *Degradoación de la isoleucina.* La isoleucina se degrada a acetil-CoA y succinil-CoA. Sugerir una secuencia de reacciones plausible para esta vía degradativa basada en las reacciones mencionadas en el texto.

Problema de interpretación de datos

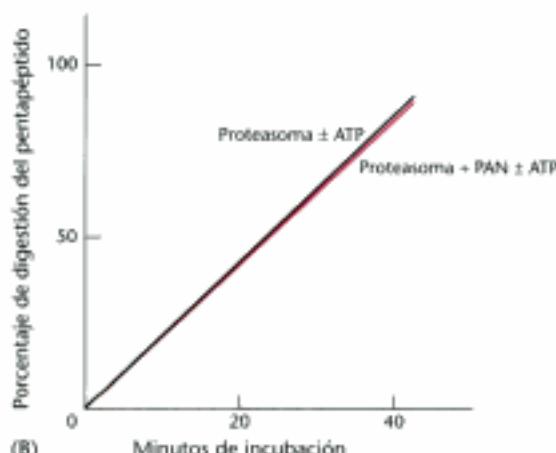
20. *Otra mano que ayuda.* En los eucariotas, el componente 20S del proteasoma, en conjunción con el componente 19S, degrada a las proteínas ubiquitinadas con la hidrólisis de una molécula de ATP. Las arqueas carecen de ubiquitina y del proteasoma 26S, pero contienen un proteasoma 20S. Algunas arqueas también tienen una ATPasa que es homóloga a la ATPasa del componente 19S de los eucariotas. A partir de la arquea *Thermoplasma*, se aisló esta actividad ATPasa como un complejo de 650 kd (denominado PAN), y se llevaron a cabo experimentos para determinar si PAN podría aumentar la actividad del proteasoma 20S del *Thermoplasma* así como de otros proteasomas 20S.

Se midió la degradación proteica en función del tiempo y de la presencia de varias combinaciones de compuestos. La gráfica A muestra los resultados.



- ¿Cuál es el efecto de PAN sobre la actividad del proteasoma de arqueas en ausencia de nucleótidos?
- ¿Cuál es el requerimiento de nucleótidos para la digestión de proteínas?
- ¿Qué evidencia sugiere que para la digestión se necesita la hidrólisis de ATP, y no sólo su presencia?

Se llevó a cabo un experimento similar con un pequeño péptido como sustrato para el proteasoma en vez de una proteína. Los resultados obtenidos se representan en la gráfica B.



- ¿Cómo difieren los requerimientos para la digestión del péptido de los de la digestión de la proteína?
- Sugerir algunas razones para la diferencia.

Se estudió después la capacidad de PAN de la arquea *Thermoplasma* para conseguir la degradación de proteínas por parte de los proteasomas 20S de la arquea *Methanosparsina* y de músculo de conejo.

PORCENTAJE DE DIGESTIÓN DEL SUSTRATO PROTEICO
(FUENTE DE PROTEASOMA 20S)

Añadidos	Thermoplasma	Methanosparsina	Músculo de conejo
Ninguno	11	10	10
PAN	8	8	8
PAN + ATP	100	40	30
PAN + ADP	12	9	10

[Datos de P. Zwickl, D. Ng, K. M. Woo, H.-P. Klein y A. L. Goldberg. An archaeal ATPase, homologous to ATPase in the eukaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. *J. Biol. Chem.* 274(1999): 26008-26014.]

- ¿Puede aumentar el PAN de *Thermoplasma* la digestión proteica de los proteasomas procedentes de otros organismos?
- ¿Cuál es la trascendencia de la estimulación del proteasoma de músculo de conejo por el PAN de *Thermoplasma*?

Hidden page

Hidden page

Hidden page

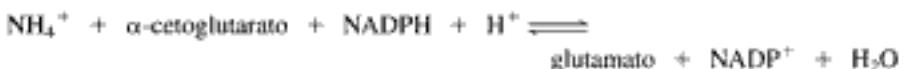
Hidden page

nitrógeno del cofactor FeMo. El cofactor FeMo es el lugar donde se fija el nitrógeno. Probablemente, el lugar donde tiene lugar la reducción del nitrógeno se localiza en una de las caras de este cofactor. Las reacciones de transferencia de electrones procedentes de las agrupaciones P tienen lugar de forma concertada con la unión de iones hidrógeno al nitrógeno a medida que éste se va reduciendo. Se están llevando a cabo estudios más avanzados para dilucidar el mecanismo de esta extraordinaria reacción.

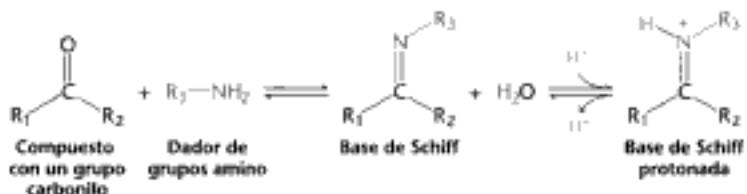
El ion amonio se incorpora a un aminoácido por medio de glutamato y glutamina

La siguiente etapa en la asimilación del nitrógeno por parte de las biomoléculas es la incorporación del NH_4^+ a los aminoácidos. En este sentido, el *glutamato* y la *glutamina* desempeñan un papel crucial. El grupo α -amino de la mayoría de los aminoácidos procede del grupo α -amino del glutamato por transaminación (p. 656). La glutamina, el otro dador importante de nitrógeno, aporta su átomo de nitrógeno de la cadena lateral a la biosíntesis de una amplia gama de compuestos importantes, entre los que se encuentran los aminoácidos triptófano e histidina.

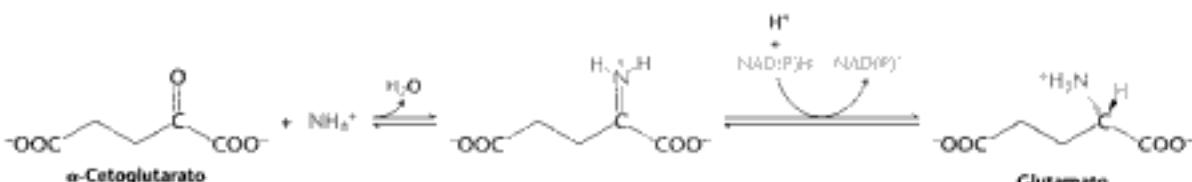
El glutamato se sintetiza a partir de NH_4^+ y α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, por medio de la *glutamato deshidrogenasa*. Ya nos hemos encontrado con este enzima en la degradación de los aminoácidos (p. 656). Recorremos que en el catabolismo el oxidante es el NAD^+ , mientras que en la biosíntesis el reductor es el NADPH. La glutamato deshidrogenasa es atípica porque no diferencia entre el NADH y el NADPH, por lo menos en algunas especies.



La reacción tiene lugar en dos etapas. En primer lugar, se forma una base de Schiff entre el amoniaco y el α -cetoglutarato. La formación de una base de Schiff entre compuestos con grupos amino y compuestos con grupos carbonilo es una reacción clave que tiene lugar en muchas de las etapas de la biosíntesis y degradación de aminoácidos.



Las bases de Schiff se pueden protonar fácilmente. En la segunda etapa, la base de Schiff protonada se reduce mediante la transferencia de un ion hidruro procedente del NADPH y se forma glutamato.



Esta reacción es fundamental porque determina la estereoquímica del átomo de carbono α (configuración absoluta S) del glutamato. El enzima se une al sustrato α -cetoglutarato de manera que el hidruro transferido a partir del NAD(P)H se incorpora de forma que se genera el isómero L del glutamato (Figura 24.4). Como veremos más adelante, otros aminoácidos establecen esta estereoquímica por medio de reacciones de transaminación basadas en el piridoxal fosfato.

Gracias a la actividad de la *glutamina sintetasa*, se incorpora un segundo ion amonio al glutamato para formar glutamina. Esta amidación está dirigida por la hidróli-

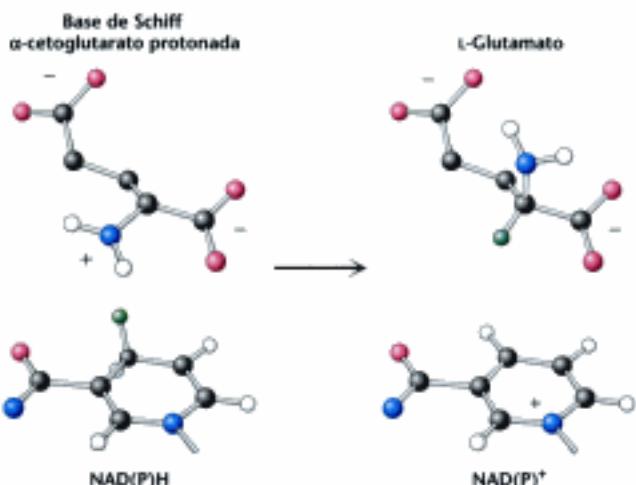
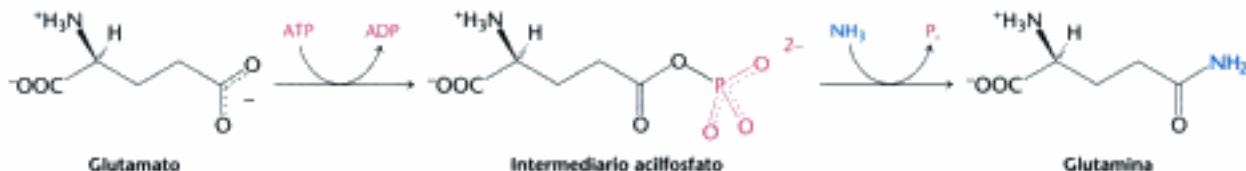


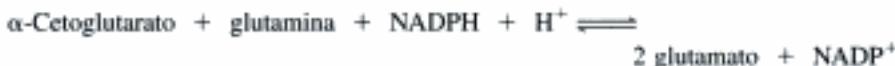
Figura 24.4 Establecimiento de la quiralidad. En el centro activo de la glutamato deshidrogenasa, la transferencia de un hidruro (en color verde) desde el NAD(P)H hacia una determinada cara de la base de Schiff protonada y aquiral del α -cetoglutarato establece la configuración L del glutamato.

sis del ATP. El ATP participa directamente en la reacción fosforilando la cadena lateral del glutamato para formar un intermediario acilfosfato que, posteriormente, reacciona con el amoniaco para formar glutamina.

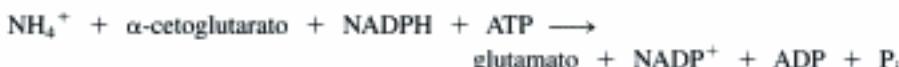


Sólo después de haberse formado el intermediario acilfosfato se origina en el enzima un lugar al que se une el amoniaco con gran afinidad. Se necesita un lugar específico al que se una el amoniaco para evitar un ataque por parte del agua que hidroliza al intermediario y desperdicie una molécula de ATP. La regulación de la glutamina sintetasa desempeña un papel fundamental a la hora de controlar el metabolismo del nitrógeno (Sección 24.3).

La glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintetasa se encuentran en todos los organismos. La mayoría de los procariotas también contienen un enzima que no está emparentado evolutivamente con los anteriores, la *glutamato sintasa*, que cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato α glutamato. El dador de nitrógeno es la glutamina.



En el interior del enzima se hidroliza la cadena lateral de la glutamina para originar amoniaco, un aspecto recurrente durante todo el metabolismo del nitrógeno. *Cuando el NH₄⁺ escasea, la mayor parte del glutamato se origina mediante la acción secundaria de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa.* La suma de estas reacciones es:



Adviértase que esta estequiometría y la de la reacción de la glutamato deshidrogenasa se diferencian por el hecho de que se hidroliza ATP. ¿Por qué a veces los procaríotas utilizan esta vía más costosa? La respuesta es que el valor de la K_M de la glutamato deshidrogenasa para el NH_4^+ es elevada ($\sim 1 \text{ mM}$) y, por tanto, este enzima no está saturado cuando el NH_4^+ escasea. Por el contrario, la afinidad de la glutamina sintetasa hacia el NH_4^+ es muy elevada. Por tanto, cuando el amoníaco escasea, la hidrólisis del ATP es necesaria.

Hidden page

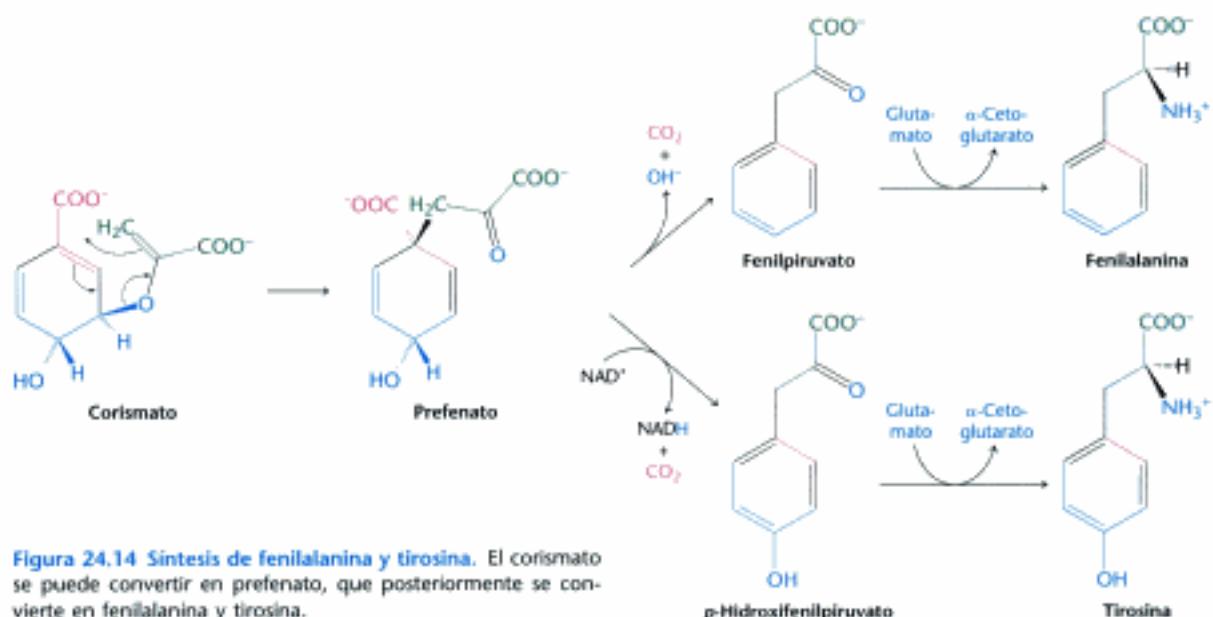


Figura 24.14 Síntesis de fenilalanina y tirosina. El corismato se puede convertir en prefenato, que posteriormente se convierte en fenilalanina y tirosina.

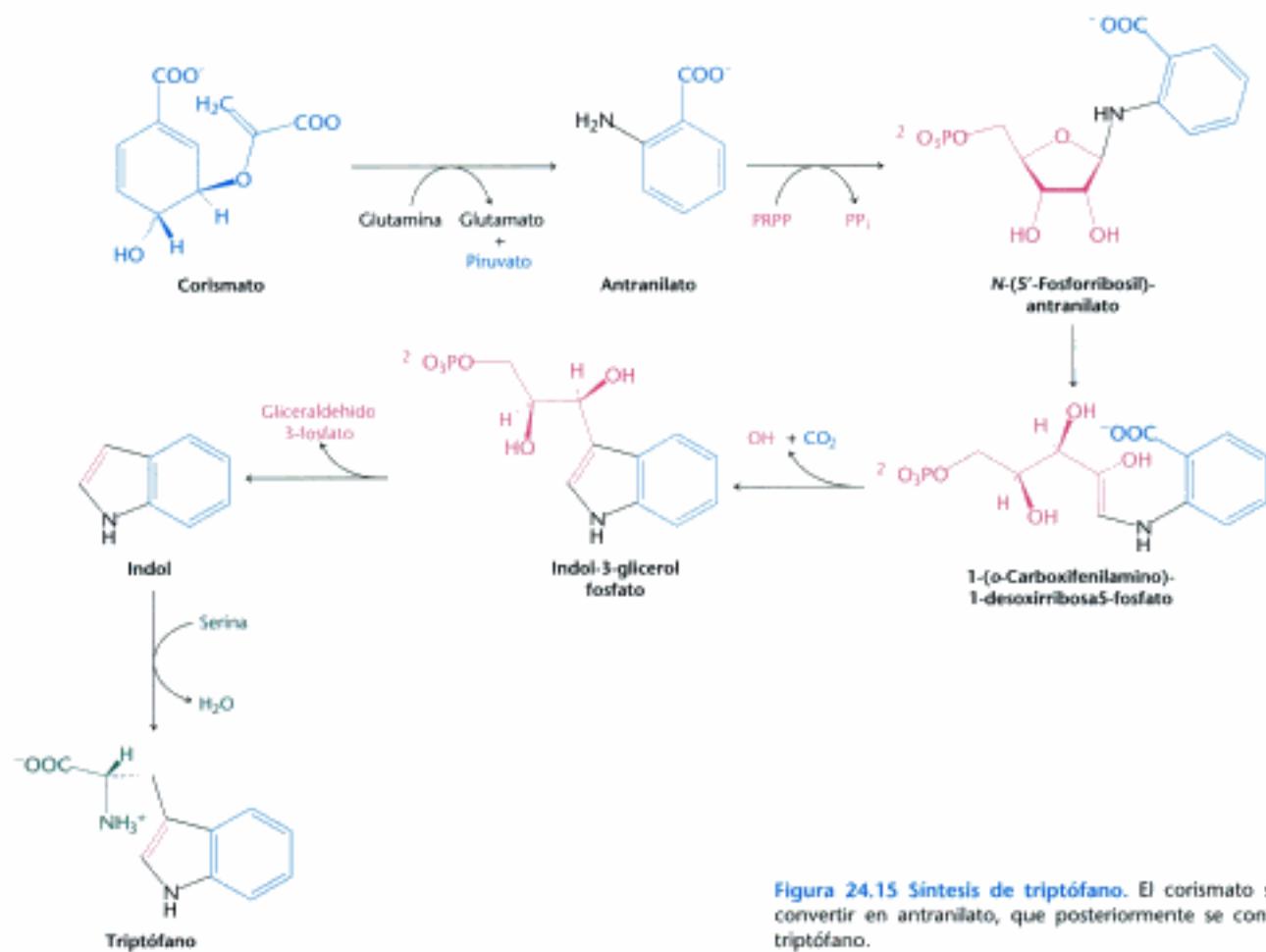


Figura 24.15 Síntesis de triptófano. El corismato se puede convertir en antranilato, que posteriormente se convierte en triptófano.

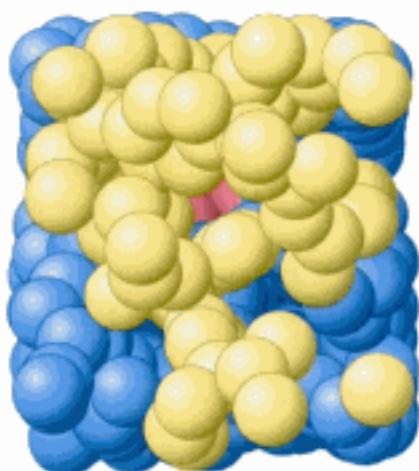
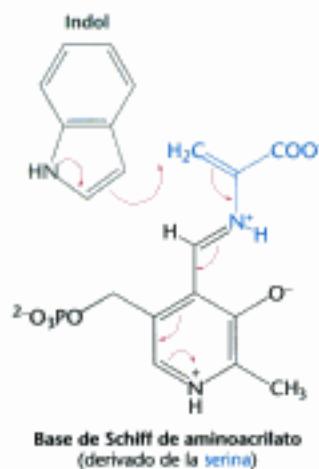


Figura 24.17 Canalización del sustrato. Un túnel de 25 Å conecta el centro activo de la subunidad α de la triptófano sintetasa (en amarillo) con el cofactor PLP (en rojo) del centro activo de la subunidad β (en azul).

una forma activada de la ribosa fosfato. El PRPP también es un intermediario importante en la síntesis de histidina, de nucleótidos de pirimidina y de nucleótidos de purina (pp. 712 y 714). El átomo C-1 de la ribosa-5-fosfato se une al átomo de nitrógeno del antranilato en una reacción dirigida por la liberación e hidrólisis del pirofosfato. El componente ribosa del fosforribosilantranilato experimenta un reordenamiento que da lugar al 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-desoxirribulosa 5-fosfato. La deshidratación y posterior descarboxilación de este intermediario genera indol-3-glicerol fosfato, cuya escisión origina indol. A continuación, el indol reacciona con la serina para formar triptófano. En estas etapas finales, que son catalizadas por la triptófano sintetasa, se extrae la cadena lateral del indol-3-glicerol fosfato en forma de gliceralehído 3-fosfato y se reemplaza con el esqueleto carbonado de la serina.

La triptófano sintetasa ilustra la canalización de sustratos durante la catálisis enzimática

El enzima *triptófano sintetasa* de *E. coli*, un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, se puede disociar en dos subunidades α y en un dímero β_2 (Figura 24.16). La subunidad α cataliza la formación de indol a partir de indol-3-glicerol fosfato, mientras que cada subunidad β presenta un centro activo que contiene PLP y que cataliza la condensación del indol y la serina para formar triptófano. La serina forma una base de Schiff con este PLP que, a continuación, se deshidrata para dar lugar a la *base de Schiff de aminoacrilato*. Este reactivo intermedio es atacado por el indol, dando lugar al triptófano. La estructura tridimensional global de este enzima difiere de la de la aspartato aminotransferasa y de la de otros enzimas que utilizan PLP y que ya se han estudiado.

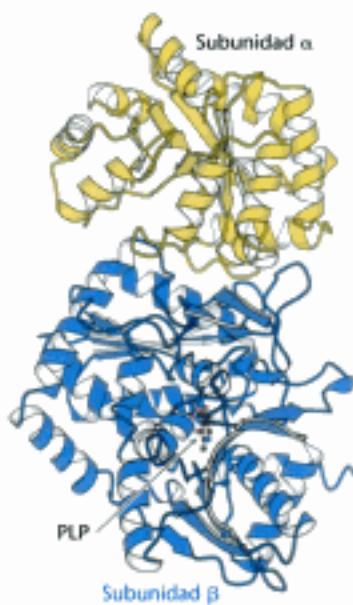
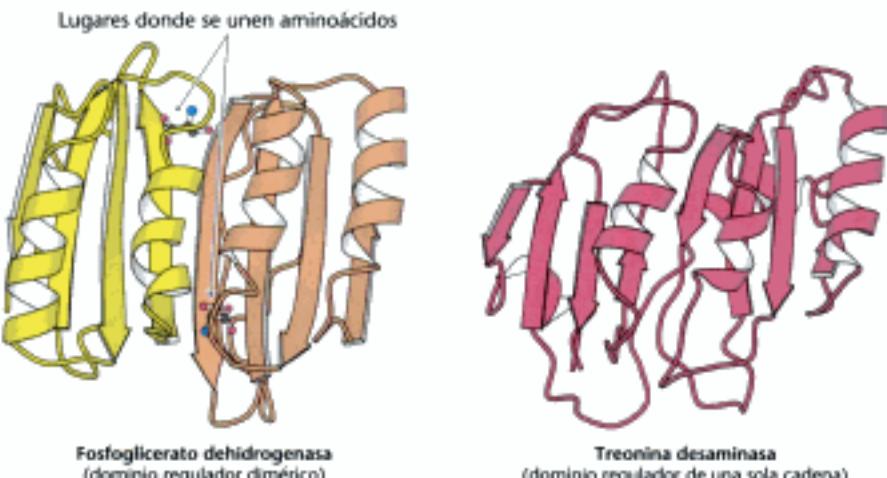


Figura 24.16 Estructura de la triptófano sintetasa. Estructura del complejo formado por una subunidad α y una subunidad β . El PLP se une a la subunidad β . Nótese que el piridoxal fosfato (PLP) se une a un lugar muy profundo de la subunidad β , a una distancia considerable de la subunidad α . [Tomado de 1BKS.pdb.]

La síntesis de triptófano plantea un reto. El indol, una molécula hidrofóbica, atraviesa las membranas fácilmente y la célula podría perderlo si se permitiese un alejamiento del enzima por difusión. Este problema se resuelve de una forma ingeniosa. Existe un conducto de 25 Å de longitud que conecta el centro activo de la subunidad α con el de la subunidad β adyacente en el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Figura 24.17). De este modo, el indol puede difundir de un centro activo al otro sin liberarse al disolvente que le rodea. Mediante experimentos de marcaje isotópico se ha demostrado que el indol formado en la subunidad α no abandona el enzima si la serina está presente. Además, las dos reacciones parciales están coordinadas. La subunidad α no genera indol a menos que el aminocítrato, que es muy reactivo, no se encuentre listo y esperando en la subunidad β . Vemos aquí un claro ejemplo de *canalización de sustrato*.

Hidden page

 **Figura 24.20 Un dominio regulador recurrente.** El dominio regulador formado por dos subunidades de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa tiene una estructura parecida a la del dominio regulador de cadena única de la treonina desaminasa. Obsérvese que ambas estructuras presentan cuatro α -hélices y ocho estructuras β en posiciones parecidas. El análisis de las secuencias ha puesto de manifiesto que este dominio regulador al que se unen aminoácidos también está presente en otros enzimas. [Tomado de 1PSD y 1TDJ.pdb.]



también se activa alostéricamente por la valina. Por tanto, este enzima se inhibe por el producto final de la vía que inicia y se activa por el producto final de una vía competitiva. Este mecanismo permite equilibrar las cantidades de los distintos aminoácidos que se sintetizan.

 El dominio regulador de la treonina desaminasa tiene una estructura muy parecida a la del dominio regulador de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (Figura 24.20). En este enzima, los dominios reguladores de dos subunidades interaccionan para formar una unidad reguladora dimérica a la que se une la serina, de modo que el enzima tetramérico contiene dos unidades reguladoras de este tipo. Cada unidad es capaz de unirse a dos moléculas de serina. En la treonina desaminasa, los dos dominios reguladores se fusionan en una única unidad con dos lugares diferenciados para la unión a aminoácidos, uno para la isoleucina y otro para la valina. El análisis de las secuencias pone de manifiesto que existen dominios reguladores parecidos en otros enzimas que sintetizan aminoácidos. *Las semejanzas sugieren que los procesos de retroinhibición podrían haber surgido en la evolución mediante la unión de dominios reguladores específicos a los dominios catalíticos de los enzimas biosintéticos.*

Multiplicidad enzimática. El paso comprometido puede estar catalizado por dos o más enzimas con distintas propiedades reguladoras. Por ejemplo, la fosforilación del aspartato es el paso comprometido en la biosíntesis de treonina, metionina y lisina. En *E. coli* hay tres aspartato quinasas distintas que catalizan esta reacción (Figura 24.21). Las secuencias de los dominios catalíticos de estos enzimas presentan una identidad de aproximadamente el 30%. Aunque los mecanismos de la catálisis son prácticamente idénticos, sus actividades se regulan de distinta forma: uno de los enzimas no está sujeto a retroinhibición, otro se inhibe por treonina y el tercero se inhibe por lisina. Por tanto, es posible que mediante la duplicación de genes que codifican enzimas biosintéticos surjan a lo largo de la evolución sofisticadas formas de regulación.



Figura 24.21 Estructura de los dominios de tres aspartoquinasas. Cada una de ellas cataliza el paso comprometido en la biosíntesis de un aminoácido distinto: metionina (arriba), treonina (centro) y lisina (abajo). Tienen un dominio catalítico común, pero se diferencian por sus dominios reguladores.

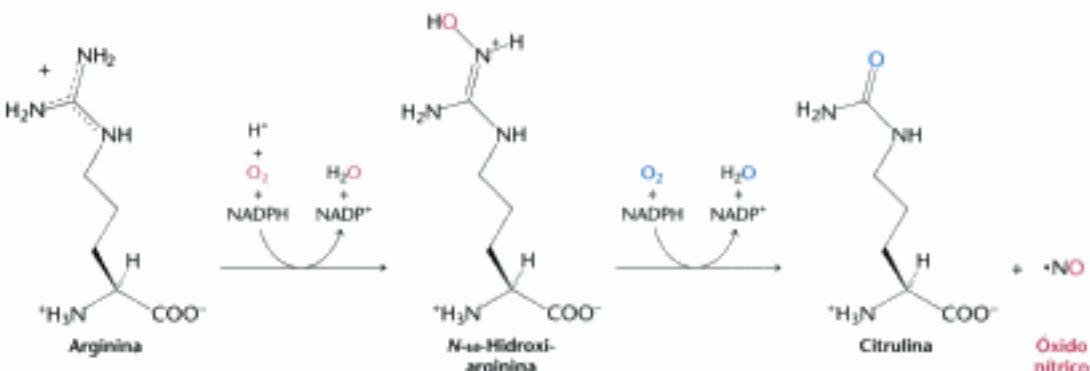


Hidden page

Hidden page

Hidden page

Figura 24.28 Formación de óxido nítrico. El NO se genera por la oxidación de la arginina.



Marcaje con ^{15}N : El relato de un pionero

“Haciendo de cobaya”

... En 1944 emprendí, junto con David Rittenberg, una investigación sobre la renovación de las proteínas de la sangre en humanos. Con este fin, sintetizé 66 g de glicina marcada en un 35% con ^{15}N , un isótopo cuyo coste fue de \$1000. El 12 de Febrero de 1945 comencé a ingerir la glicina marcada. Como no conocíamos los efectos de dosis relativamente grandes de este isótopo estable del nitrógeno y como creímos que su máxima incorporación a las proteínas podría lograrse mediante la administración de glicina de forma continua, ingerí dosis de 1 g de glicina a intervalos de una hora durante 66 horas seguidas... A intervalos predeterminados se extrajo sangre y, tras ser tratada convenientemente, se procedió a determinar la concentración de ^{15}N de varias proteínas sanguíneas.”

—DAVID SHEMIN

Bioessays 10 (1989):30



Figura 24.29 Marcaje del hemo. Los resultados de los estudios de marcaje isotópico han desvelado la procedencia de los átomos del hemo.

El óxido nítrico, una molécula mensajera de vida media muy breve, se forma a partir de la arginina

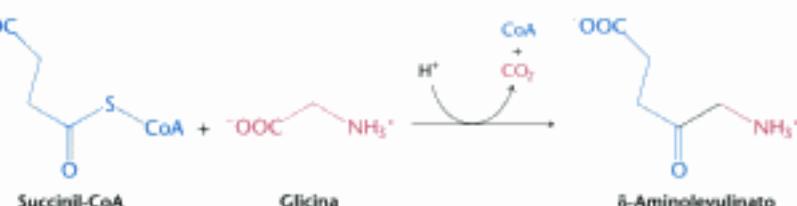
En muchos procesos de transducción de señales en vertebrados, el óxido nítrico (NO) es un importante mensajero. Por ejemplo, el NO estimula la biogénesis de mitocondrias. Este radical libre en estado gaseoso se genera de forma endógena a partir de la arginina mediante una reacción compleja catalizada por la óxido nítrico sintasa. La síntesis de óxido nítrico requiere NADPH y O_2 (Figura 24.28). El óxido nítrico actúa uniéndose y activando a la guanilato ciclasa soluble, un enzima importante en los procesos de transducción de señales (Sección 32.3). Este enzima es homólogo de la adenilato ciclasa pero presenta un dominio que contiene un grupo hemo, al que se une el NO.

Las porfirinas se sintetizan a partir de glicina y succinil-coenzima A

Los resultados de los experimentos de marcaje isotópico llevados a cabo por David Shemin y sus colaboradores pusieron de manifiesto, por primera vez, la participación de un aminoácido en la biosíntesis de los anillos de porfirina de los grupos hemo y de las clorofilas. En 1945, demostraron que los átomos de nitrógeno del grupo hemo quedaban marcados tras la ingesta de [^{15}N]-glicina por parte de seres humanos (siendo el propio Shemin el primero en hacer la prueba), mientras que la ingesta de [^{15}N]-glutamato provocaba un marcaje muy escaso.

Utilizando ^{14}C , que justo entonces había comenzado a comercializarse, descubrieron que en los eritrocitos nucleados de pollo, 8 átomos de carbono del grupo hemo procedían del átomo de carbono α de la glicina y ninguno procedía del átomo de carbono del grupo carboxilo. Los resultados de estudios posteriores demostraron que los otros 26 átomos de carbono del grupo hemo pueden proceder del acetato. Además, el ^{14}C del acetato marcado en el grupo metilo aparecía en 24 de estos carbonos, mientras que el ^{14}C del acetato marcado en el grupo carboxilo sólo aparecía en los otros 2 (Figura 24.29).

Este patrón de marcaje tan peculiar llevó a Shemin a sugerir que la condensación de la glicina con un compuesto de succinilo activado daba lugar a un precursor del grupo hemo. De hecho, la primera etapa de la biosíntesis de las porfirinas de mamíferos consiste en la condensación de la glicina y el succinil-CoA para formar δ -aminolevulinato.



Esta reacción está catalizada por la δ -aminolevulinato sintasa, un enzima que contiene PLP y que se encuentra en las mitocondrias.

Hidden page

dos de sus cadenas laterales de propionato en grupos vinilo da lugar a la *protoporfirina IX*. Por último, la conjugación con hierro da lugar al *grupo hemo*, el grupo prostético de proteínas como la mioglobina, hemoglobina, catalasa, peroxidasa y citocromo *c*. La inserción de la forma *ferrosa* del hierro está catalizada por la *ferroquielatasa*. En el plasma, el hierro se transporta por medio de la *transferrina*, una proteína que se une a dos hierros en forma férrica y que, en los tejidos, se almacena en el interior de las moléculas de *ferritina*. La amplia cavidad interna de la ferritina (~80 Å de diámetro) puede albergar hasta 4500 iones férricos (Sección 31.4).

En condiciones normales, el eritrocito humano tiene una vida de unos 120 días, como quedó demostrado por primera vez a partir de la evolución temporal del ^{15}N de la hemoglobina del propio Shemin, tras ingerir [^{15}N]-glicina. La primera etapa de la degradación del grupo hemo es la ruptura de su puente α -metino para formar el pigmento de color verde *biliverdina*, un tetrapirrol de cadena abierta. Posteriormente, el puente de metino central de la biliverdina es reducido por la *biliverdina reductasa* para formar *bilirrubina*, un pigmento de color rojo (Figura 24.31). El cambio de color de un hematoma ilustra de manera muy gráfica estas reacciones de degradación.

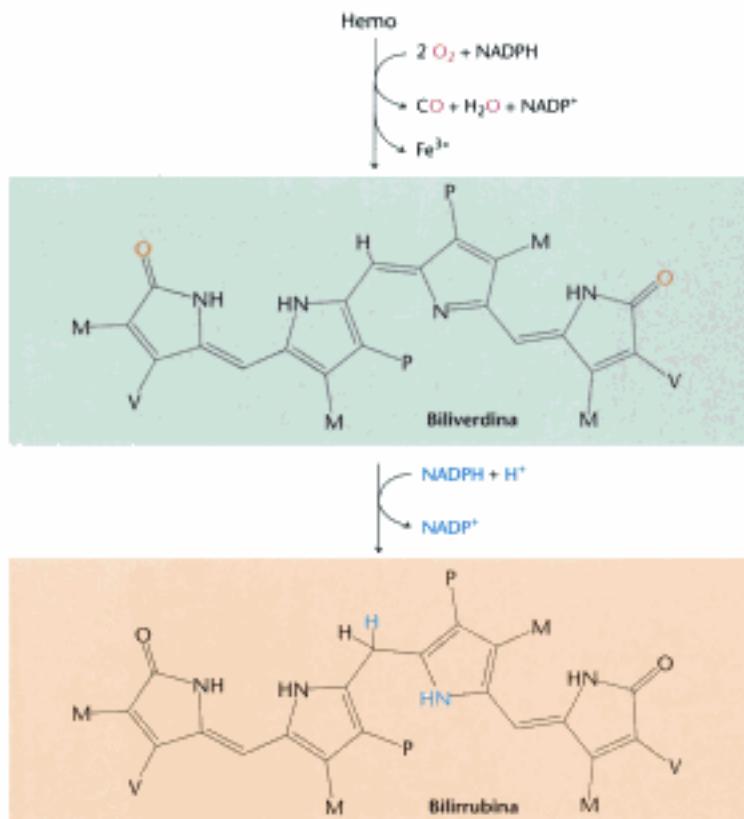


Figura 24.31 Degradación del hemo. La formación de biliverdina y bilirrubina, los productos de la degradación del hemo, es la causante del color de los hematomas. Abreviaturas: M, metilo; V, vinilo.

Algunos trastornos congénitos del metabolismo de la porfirina provocan su acumulación

Las *porfirias* son trastornos, congénitos o adquiridos, provocados por un defecto en los enzimas de las vías biosintéticas del grupo hemo. La porfirina se sintetiza tanto en los eritroblastos como en el hígado y los trastornos se pueden localizar en cualquiera de los dos sitios. La *porfiria eritropoyética congénita*, por ejemplo, destruye prematuramente los eritrocitos. Esta enfermedad tiene su origen en un déficit de la cosintasa. En esta porfiria, la síntesis de la cantidad necesaria de uroporfirinógeno III está asociada a la producción de grandes cantidades de uroporfirinógeno I, el isómero simétrico inútil. También se acumulan uroporfirina I, coproporfirina I y otros derivados simétricos. La orina de los pacientes que padecen esta

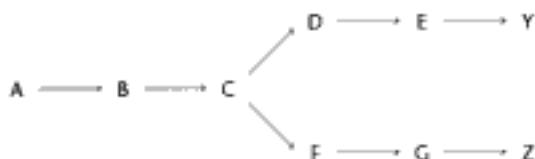
Hidden page

Hidden page

Hidden page

10. *Síntesis directa.* ¿Cuál de los 20 aminoácidos se puede sintetizar directamente mediante una reacción de transaminación de un intermediario metabólico muy frecuente?

11. *Líneas de comunicación.* En el siguiente ejemplo de una vía ramificada, proponer un esquema de retroinhibición que dé lugar a la producción de cantidades iguales de Y y Z.



12. *Retroinhibición acumulatoria.* Consideremos la vía ramificada del problema 11. La primera etapa común ($A \rightarrow B$) está parcialmente inhibida por ambos productos finales, actuando cada uno de forma independiente. Supongamos que una elevada concentración de Y disminuye la velocidad del proceso $A \rightarrow B$ de 100 a 60 s^{-1} y que una elevada concentración de Z disminuye la velocidad de 100 a 40 s^{-1} . ¿Cuál sería la velocidad en presencia de concentraciones elevadas tanto de Y como de Z?

Problemas de mecanismos

13. *Formación de etileno.* Proponer un mecanismo para la conversión de S-adenosilmetionina en 1-aminociclopentano-1-carboxilato (ACC) mediante la ACC sintasa, un enzima que contiene PLP. ¿Cuál es el otro producto?

14. *Imagen especular de la serina.* El tejido cerebral contiene gran cantidad de D-serina, que se forma a partir de la L-serina por medio de la serina racemasa, un enzima que contiene PLP. Proponer un mecanismo para la interconversión de L y D-serina. ¿Cuál es la constante de equilibrio para la reacción L-serina \rightleftharpoons D-serina?

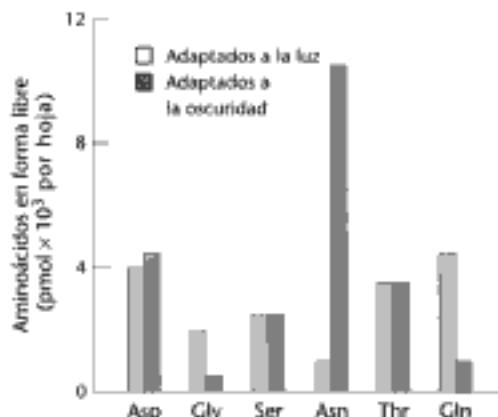
Problemas de Integración del Capítulo

15. *Conexiones.* ¿Cómo se vería afectada la producción de energía en una célula por un aumento en la síntesis de aspartato y glutamato? ¿Cómo respondería la célula a esta situación?

16. *Se necesita protección.* Supongamos que una mutación en una bacteria da lugar a una reducción en la actividad de la metionina adenosiltransferasa, el enzima responsable de la síntesis de SAM a partir de metionina y ATP. Predecir cómo afectaría esta situación a la estabilidad del DNA de la bacteria mutada.

Problema de Integración de Capítulos y de Interpretación de datos

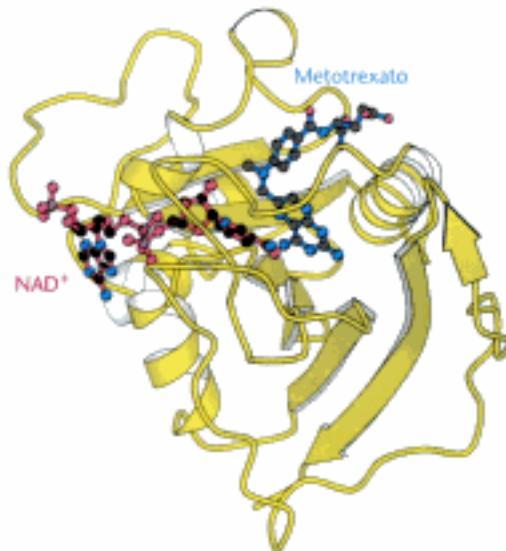
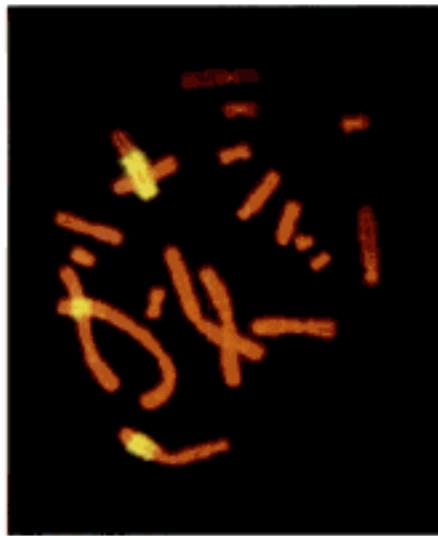
17. *Efectos de la luz.* El gráfico adjunto muestra la concentración de las formas libres de varios aminoácidos tanto en plantas adaptadas a la luz como en plantas adaptadas a la oscuridad.



[Tomado de B. B. Buchanan, W. Grussem y R. L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (American Society of Plant Physiology, 2000), Fig. 8.3, p. 363.]

- De los aminoácidos mostrados, ¿cuáles son los más afectados por la adaptación luz–oscuridad?
- Sugerir una posible explicación bioquímica para las diferencias observadas.
- El espárrago blanco, una delicia gastronómica, es el resultado de cultivar la planta del espárrago en la oscuridad. ¿Cuál es el compuesto químico que, en su opinión, incrementa el sabor del espárrago blanco?

Biosíntesis de nucleótidos



Los nucleótidos son necesarios para el crecimiento y replicación celular. Un enzima clave para la síntesis de un nucleótido es la dihidrofolato reductasa (a la derecha). Las células que crecen en presencia de metotrexato, un inhibidor de la reductasa, reaccionan aumentando el número de copias del gen de la reductasa. Las regiones de color amarillo brillante que pueden verse en tres de los cromosomas de la micrografía de fluorescencia (a la izquierda), que han estado creciendo en presencia de metotrexato, contienen cientos de copias del gen de la reductasa. [(Izquierda) Por cortesía de la Dra. Barbara Trask y del Dr. Joyce Hamlin.]

En muchos procesos vitales resulta esencial un amplio suministro de nucleótidos. En primer lugar, los nucleótidos son los *precursores activados de los ácidos nucleicos*. Como tales, son necesarios para la replicación del genoma y la transcripción de la información genética en RNA. En segundo lugar, un nucleótido de adenina, el ATP, es la *divisa energética universal*. Un nucleótido de guanina, el GTP, también actúa como fuente de energía para un grupo más selecto de procesos biológicos. En tercer lugar, derivados de nucleótidos como la UDP-glucosa *participan en procesos biosintéticos* como la síntesis de glucógeno. En cuarto lugar, los nucleótidos son *componentes esenciales de las vías de transducción de señales*. Los nucleótidos cíclicos como el AMP cíclico y el GMP cíclico son segundos mensajeros que transmiten señales tanto en el interior de una célula como entre células distintas. El ATP es el dador de los grupos fosforilo transferidos por las proteína quinasas.

En este capítulo continuamos el camino iniciado en el Capítulo 24, donde se describía la incorporación a los aminoácidos del nitrógeno procedente de fuentes inorgánicas como el nitrógeno gaseoso. Los aminoácidos glicina y aspartato son las plataformas sobre las cuales se ensamblan los sistemas cíclicos presentes en los nucleótidos. Además, durante la formación de nucleótidos, el aspartato y la cadena lateral de la glutamina actúan como dadores de grupos NH₂.

Contenido

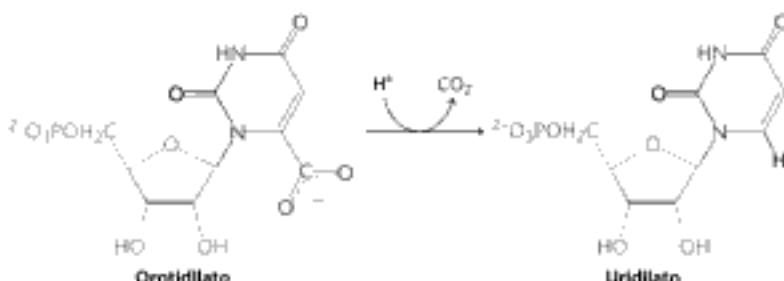
- 25.1 En la síntesis de novo, el anillo de pirimidina se construye a partir de bicarbonato, aspartato y glutamina
- 25.2 Las bases púricas se pueden sintetizar de novo o se pueden reciclar mediante vías de recuperación
- 25.3 Los desoxirribonucleótidos se sintetizan por reducción de ribonucleótidos mediante un mecanismo en el que intervienen radicales
- 25.4 Las etapas clave de la biosíntesis de nucleótidos se regulan mediante retroinhibición
- 25.5 Alteraciones en el metabolismo de los nucleótidos pueden provocar situaciones patológicas

Hidden page

Hidden page

Hidden page

gida por la hidrólisis del pirofosfato. El enzima que cataliza esta adición, la *fosforribosiltransferasa de pirimidinas*, es homólogo a otras fosforribosiltransferasas que adicionan diversos grupos al PRPP para formar los demás nucleótidos. A continuación, el orotidilato se descarboxila dando lugar a *uridilato* (*UMP*), uno de los principales nucleótidos de pirimidina precursores del RNA. Esta reacción está catalizada por la *orotidilato descarboxilasa*.



La orotidilato descarboxilasa es uno de los enzimas más eficientes que se conocen. En su ausencia, la descarboxilación es extremadamente lenta; se estima que tiene lugar una vez cada 78 millones de años; en presencia del enzima, el proceso ocurre aproximadamente una vez por segundo; ¡la velocidad es 10^{17} veces más rápida!

Los nucleótidos mono, di y trifosfato son interconvertibles

¿Cómo se forma la citidina, el otro ribonucleótido de pirimidina mayoritario? Se sintetiza a partir de la base uracilo del UMP, pero la síntesis sólo puede ocurrir una vez que el UMP se ha convertido en UTP. Recordemos que los difosfatos y trifosfatos son las formas activas de los nucleótidos tanto en la biosíntesis como en las conversiones energéticas. Los nucleósidos monofosfato se convierten en nucleósidos trifosfato por etapas. En primer lugar, los nucleósidos monofosfato se convierten en difosfato por medio de *nucleósido monofosfato quinasas* específicas que utilizan ATP como dador de grupos fosforilo. Por ejemplo, la *UMP quinasa* fosforila al UMP para formar UDP.

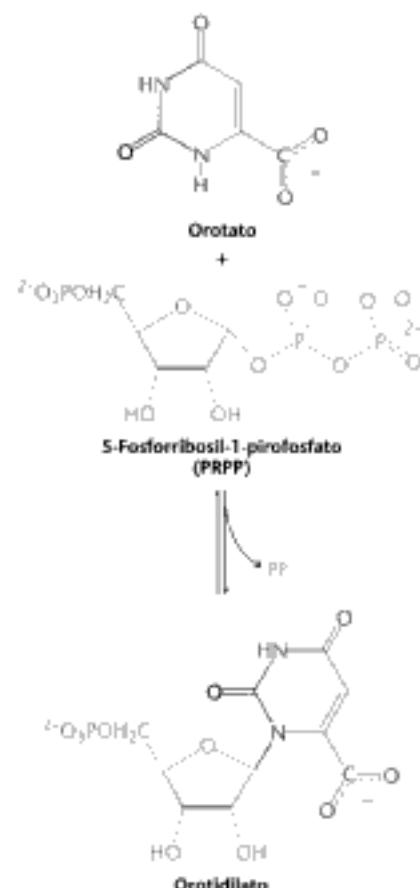
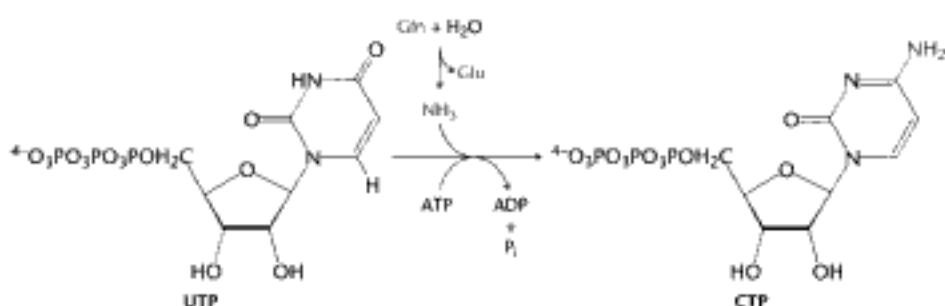


Los nucleósidos difosfato y trifosfato son interconvertibles gracias a la *nucleósido difosfato quinasa*, un enzima de escasa especificidad, a diferencia de las monofosfato quinasas. X e Y pueden representar a cualquier ribonucleósido o incluso a cualquier desoxirribonucleósido:



La CTP se forma mediante aminación de UTP

Una vez formada la uridina trifosfato, se puede transformar en *citidina trifosfato* reemplazando un grupo carbonilo por un grupo amino.

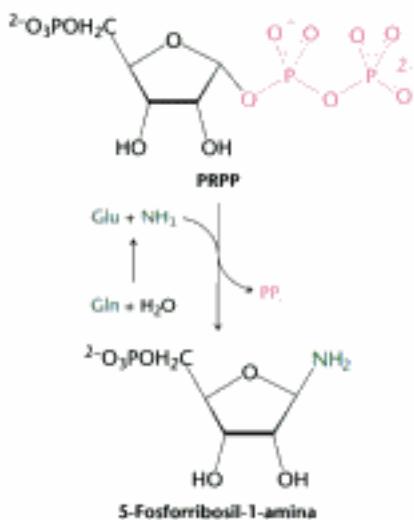
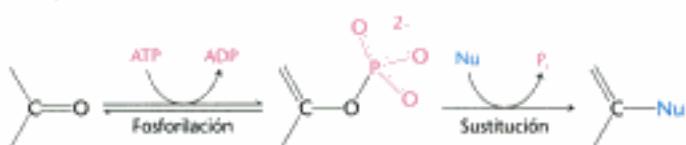


Hidden page

bamilfosfato sintetasa, el amoniaco generado en el centro activo donde se hidroliza la glutamina atraviesa un conducto que le lleva al PRPP sin tener que ser liberado al medio circundante.

El anillo de purina se ensambla mediante etapas sucesivas en las que la activación por fosforilación va seguida de una sustitución

 Se necesitan otros nueve pasos para ensamblar el anillo de purina. Sorprendentemente, los seis primeros pasos son reacciones análogas. La mayor parte de estas etapas está catalizada por enzimas que contienen dominios de sujeción del ATP homólogos a los de la carbamilfosfato sintetasa. *Cada etapa consiste en la activación por fosforilación de un átomo de oxígeno unido a carbono (generalmente un átomo de oxígeno de un grupo carbonilo), seguida de la sustitución del grupo fosforilo por amoniaco o por un grupo amino que actúa como un nucleófilo (Nu).*



La biosíntesis *de novo* de purinas tiene lugar del siguiente modo (Figura 25.6).

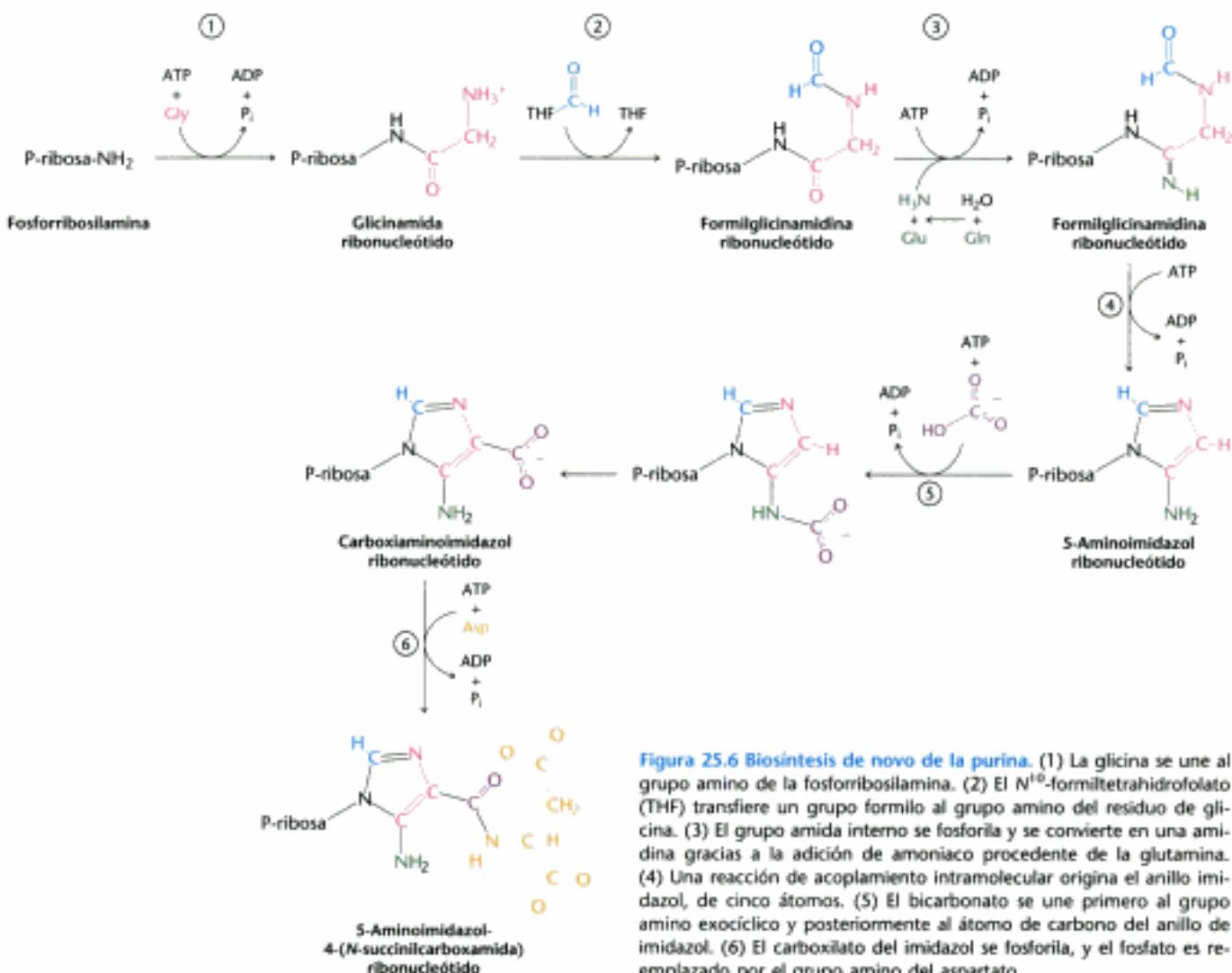


Figura 25.6 Biosíntesis de *de novo* de la purina. (1) La glicina se une al grupo amino de la fosforribosilamina. (2) El N^{10} -formiltetrahidrofolato (THF) transfiere un grupo formilo al grupo amino del residuo de glicina. (3) El grupo amida interno se fosforila y se convierte en una amida gracias a la adición de amoniaco procedente de la glutamina. (4) Una reacción de acoplamiento intramolecular origina el anillo imidazol, de cinco átomos. (5) El bicarbonato se une primero al grupo amino exocíclico y posteriormente al átomo de carbono del anillo de imidazol. (6) El carboxilato del imidazol se fosforila, y el fosfato es reemplazado por el grupo amino del aspartato.

Hidden page

Hidden page

átomo de oxígeno del grupo carbonilo recién formado. Posteriormente, el amoníaco generado por la hidrólisis de glutamina reemplaza al grupo AMP para formar guanilato, en una reacción catalizada por la *GMP sintasa*. Hay que destacar el hecho de que la síntesis de adenilato requiere GTP, mientras que la síntesis de guanilato requiere ATP. Este uso recíproco de los nucleótidos por parte de las vías genera importantes posibilidades de regulación (Sección 25.4).

25.3 Los desoxirribonucleótidos se sintetizan por reducción de ribonucleótidos mediante un mecanismo en el que intervienen radicales



Volvamos ahora a la síntesis de desoxirribonucleótidos. Estos precursores del DNA se forman mediante la reducción de ribonucleótidos; concretamente, el grupo hidroxilo en posición 2' del componente ribosa se sustituye por un átomo de hidrógeno. Los sustratos son ribonucleótidos difosfato, y el reductor final es el NADPH. El enzima *ribonucleótido reductasa* es el responsable de la reacción de reducción de los cuatro ribonucleótidos. Las ribonucleótido reductasas de organismos distintos constituyen un conjunto extraordinariamente diverso de enzimas. Sin embargo, los resultados de minuciosos estudios han puesto de manifiesto que comparten un mismo mecanismo de reacción, y las características de sus estructuras tridimensionales indican que estos enzimas son homólogos. Nos centraremos en el enzima del organismo aerobio *E. coli*, ya que es el que mejor se conoce.

Mecanismo: un radical tirosilo es fundamental para la actividad de la ribonucleótido reductasa

La ribonucleótido reductasa de *E. coli* consta de dos subunidades: R1 (un dímero de 87 kd) y R2 (un dímero de 43 kd). La subunidad R1 contiene el centro activo, así como dos centros de control alostérico (Sección 25.4). Esta subunidad contiene tres residuos de cisteína conservados y un residuo de glutamato, y los cuatro participan en la reducción de ribosa a desoxirribosa (Figura 25.9). El papel de la subunidad R2 durante la catálisis consiste en generar un radical libre con propiedades extraordinarias en cada una de sus dos cadenas. Cada cadena R2 contiene un *radical tirosilo estable* con un electrón desapareado deslocalizado sobre su anillo aromático (Figura 25.10). Este radical libre tan atípico se genera gracias a un *centro de hierro* cercano que consta de dos iones férricos (Fe^{3+}) conectados mediante un ion óxido (O^{2-}).

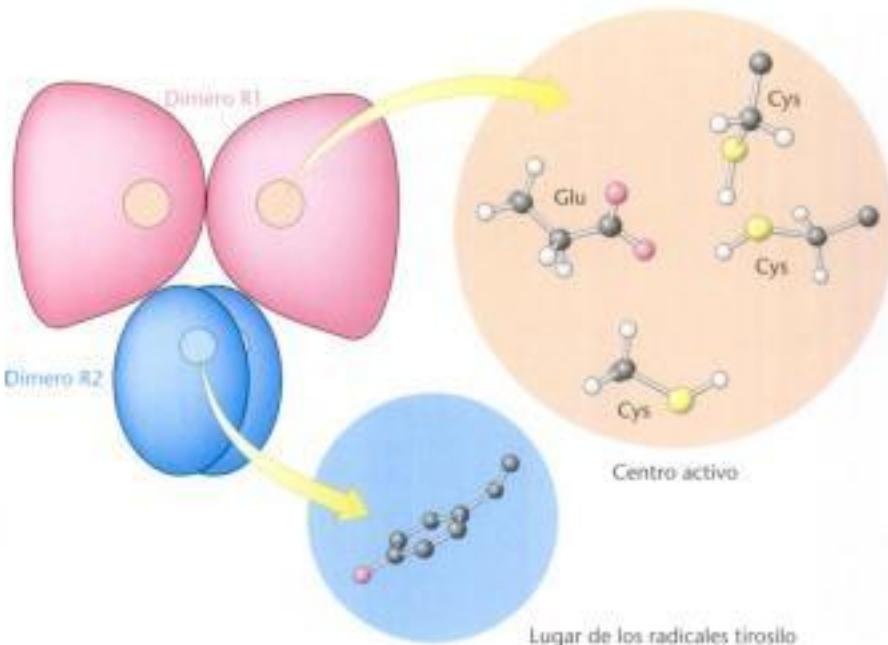


Figura 25.9 Ribonucleótido reductasa. La ribonucleótido reductasa reduce los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos en su centro activo, que contiene tres residuos de cisteína fundamentales y un residuo de glutamato. Cada subunidad R2 contiene un radical tirosilo, que acepta un electrón procedente de uno de los residuos de cisteína del centro activo para dar inicio a la reacción de reducción. Las dos subunidades R1 se agrupan para formar un dímero, al igual que las dos subunidades R2.

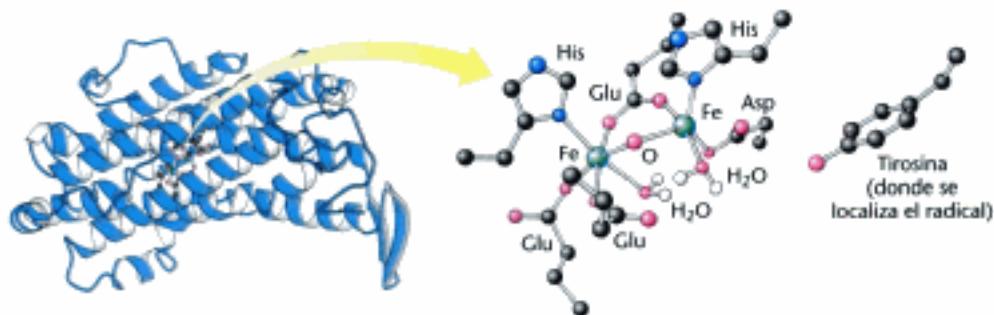


Figura 25.10 Subunidad R2 de la ribonucleótido reduc-tasa. Esta subunidad contiene un radical libre estable localizado sobre un residuo de tirosina. Este radical se genera por la reacción del oxígeno en un lugar cercano que contiene dos átomos de hierro (que no se muestra en la figura). Dos subunidades R2 se agrupan para formar un dímero. [Tomado de 1RIB.pdb.]

Durante la síntesis de un desoxirribonucleótido, el OH unido al C-2' del anillo de ribosa se sustituye por H, por lo que conserva la configuración del átomo de carbono en posición C-2' (Figura 25.11).

1. La reacción comienza con la transferencia de un electrón procedente del residuo de cisteína de R1 al radical tirosilo de R2. La pérdida de un electrón genera un *radical cisteintioilo* muy reactivo en el interior del centro activo de R1.

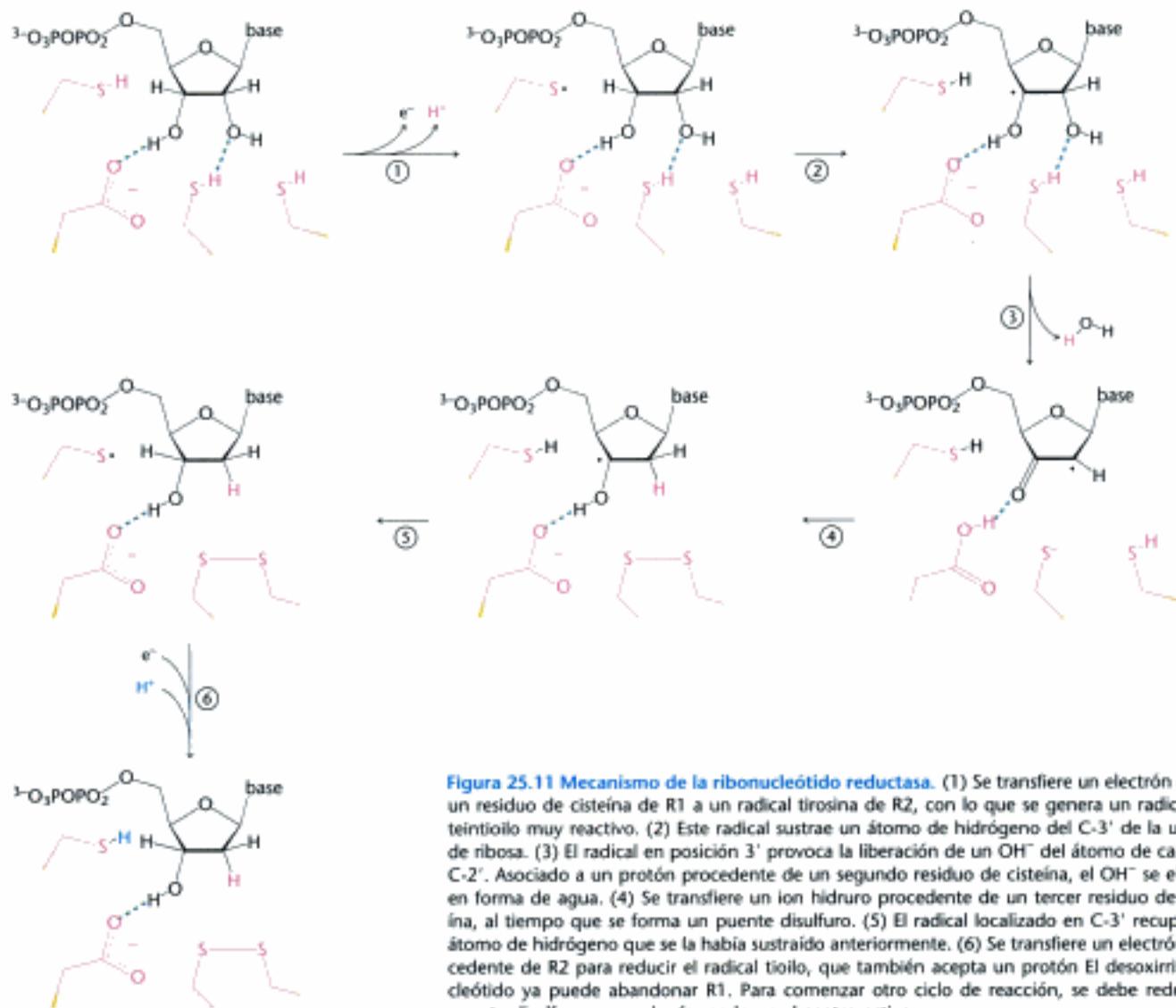


Figura 25.11 Mecanismo de la ribonucleótido reductasa. (1) Se transfiere un electrón desde un residuo de cisteína de R1 a un radical tirosina de R2, con lo que se genera un radical cisteintioilo muy reactivo. (2) Este radical sustrae un átomo de hidrógeno del C-3' de la unidad de ribosa. (3) El radical en posición 3' provoca la liberación de un OH^- del átomo de carbono C-2'. Asociado a un protón procedente de un segundo residuo de cisteína, el OH^- se elimina en forma de agua. (4) Se transfiere un ion hidruro procedente de un tercer residuo de cisteína, al tiempo que se forma un puente disulfuro. (5) El radical localizado en C-3' recupera el átomo de hidrógeno que se la había sustraído anteriormente. (6) Se transfiere un electrón procedente de R2 para reducir el radical tioilo, que también acepta un protón. El desoxirribonucleótido ya puede abandonar R1. Para comenzar otro ciclo de reacción, se debe reducir el puente disulfuro que se ha formado en el centro activo.

Hidden page

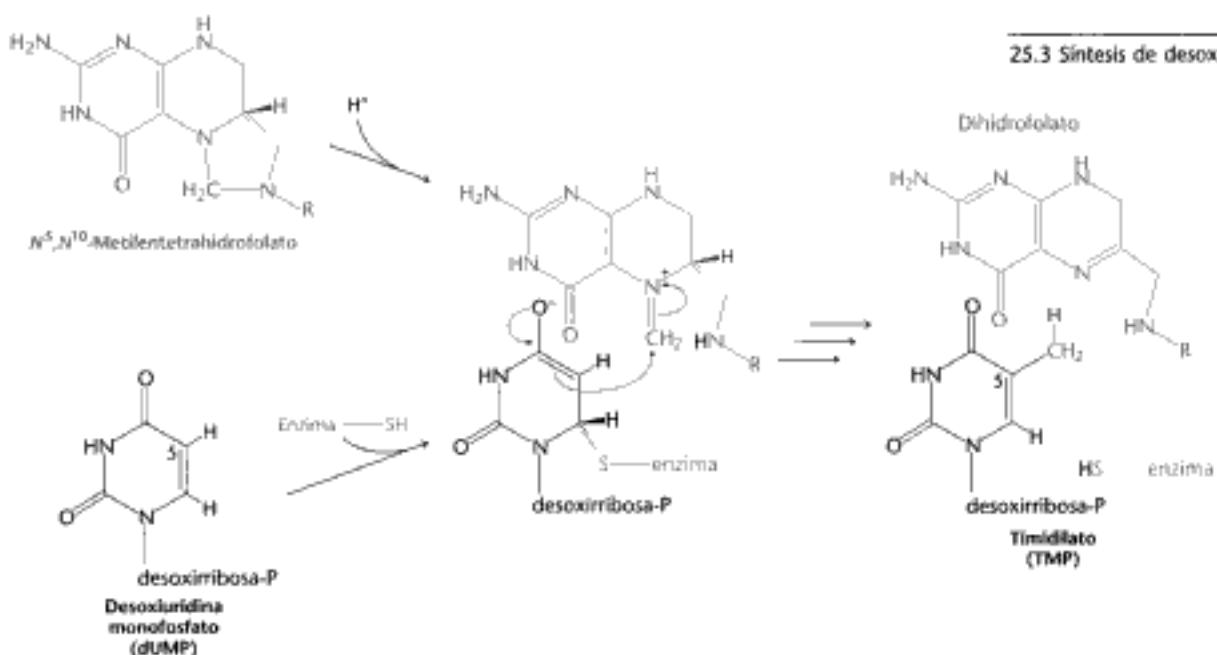
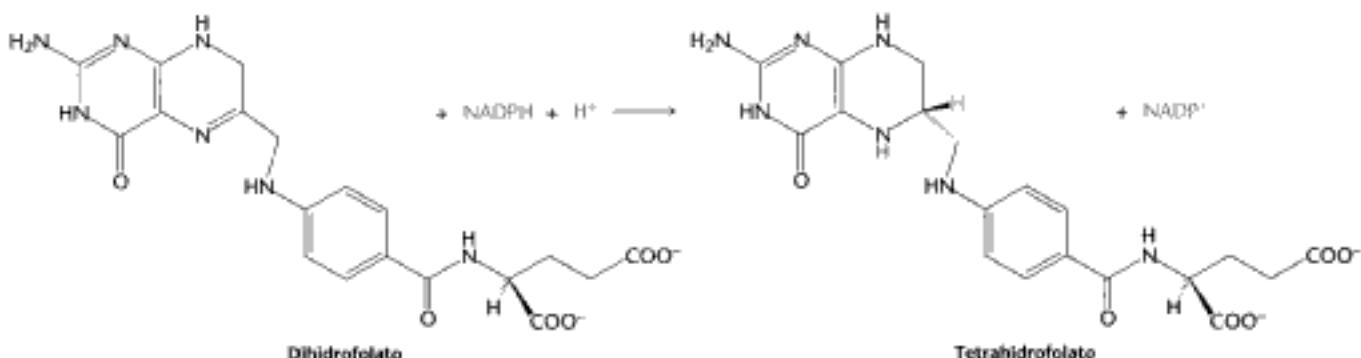


Figura 25.12 Síntesis de timidilato. La timidilato sintasa cataliza la adición de un grupo metilo (procedente del *N*⁵,*N*¹⁰-metilentetrahydrofolato) al dUMP para formar TMP. La adición de un tiolato procedente del enzima activa al dUMP. La apertura del anillo de cinco átomos del derivado del THF predispone al grupo metileno para un ataque nucleófilo por parte del dUMP activado. La reacción se completa mediante la transferencia de un ion hidruro para formar dihidrofolato.

ataque del dUMP activado sobre el grupo metileno forma el nuevo enlace carbono–carbono. Posteriormente, el intermediario así formado se convierte en el producto: se transfiere un ion hidruro procedente del anillo del tetrahydrofolato para convertir el grupo metileno en un grupo metilo y se sustrae un protón del átomo de carbono al que se encuentra unido el grupo metilo para eliminar la cisteína y regenerar el anillo aromático. El derivado del tetrahydrofolato pierde su grupo metileno y un ion hidruro, con lo que se oxida a dihidrofolato. Para sintetizar más timidilato se tiene que regenerar el tetrahydrofolato.

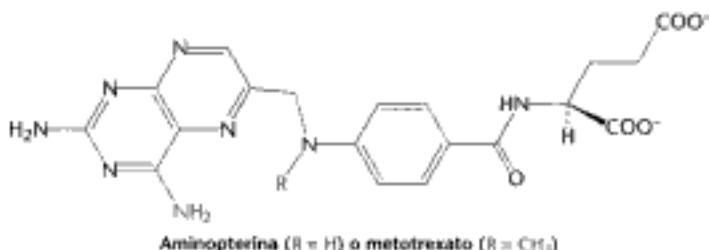
La dihidrofolato reductasa cataliza la regeneración del tetrahidrofolato, un transportador de fragmentos monocarbonados

El tetrahidrofolato se regenera a partir del dihidrofolato que se produce durante la síntesis del timidilato. Esta regeneración se lleva a cabo por medio de la *dihidrofolato reductasa*, que utiliza NADPH como reductor.



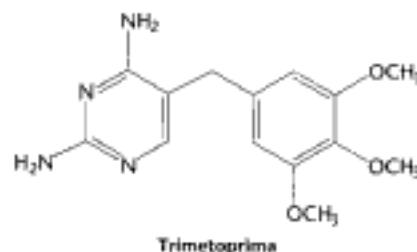
Se trasfiere un ion hidruro directamente desde el anillo de nicotinamida del NADPH al anillo de pteridina del dihidrofolato. Para facilitar la transferencia del hidruro, el dihidrofolato unido y el NADPH se mantienen muy cerca el uno del otro.

Hidden page



El metotrexato es un fármaco de gran valor para el tratamiento de muchos tumores de crecimiento rápido, como es el caso de la leucemia aguda o el coriocarcinoma, un cáncer que se produce en células de la placenta. Sin embargo, el metotrexato mata a las células que se están replicando rápidamente, sean malignas o no. Las células madre de la médula ósea, las células epiteliales del tubo digestivo y los folículos pilosos son sensibles a la acción de este antagonista del folato y dan cuenta de sus efectos secundarios perniciosos, entre los que se pueden incluir el debilitamiento del sistema inmunitario, náuseas y pérdida del cabello.

Los análogos del folato como la *trimetoprima* presentan una intensa actividad antibacteriana y antiprotozoaria. La trimetoprima se une a la dihidrofolato reductasa de mamíferos con una afinidad 10^5 veces menor que a las reductasas de los microorganismos sensibles. Pequeñas diferencias en las hendiduras donde se localizan los centros activos de esos enzimas explican esta actividad antimicrobiana tan selectiva. Para tratar infecciones se utiliza frecuentemente una mezcla de trimetoprima y sulfametoaxazol (un inhibidor de la síntesis de folato).



25.4 Las etapas clave de la biosíntesis de nucleótidos se regulan mediante retroinhibición

La biosíntesis de nucleótidos se regula mediante retroinhibición, de manera parecida a la regulación de la biosíntesis de aminoácidos (Sección 24.3). Estas vías de regulación aseguran que los diversos nucleótidos se produzcan en las cantidades precisas.

La biosíntesis de la pirimidina se regula mediante la aspartato transcarbamilasa

La aspartato transcarbamilasa, uno de los enzimas clave en la regulación de la biosíntesis de pirimidinas en bacterias, se describió con detalle en el Capítulo 10. Recordemos que la ATCase se inhibe por CTP, el producto final de la biosíntesis de pirimidinas y se activa por el ATP.



La carbamilfosfato sintetasa también es un punto donde tiene lugar la retroinhibición, tanto en procariotas como en eucariotas.

La síntesis de los nucleótidos de purina se controla por retroinhibición en varios lugares

El esquema de la regulación de los nucleótidos de purina es más complejo que el de los nucleótidos de pirimidina (Figura 25.15).

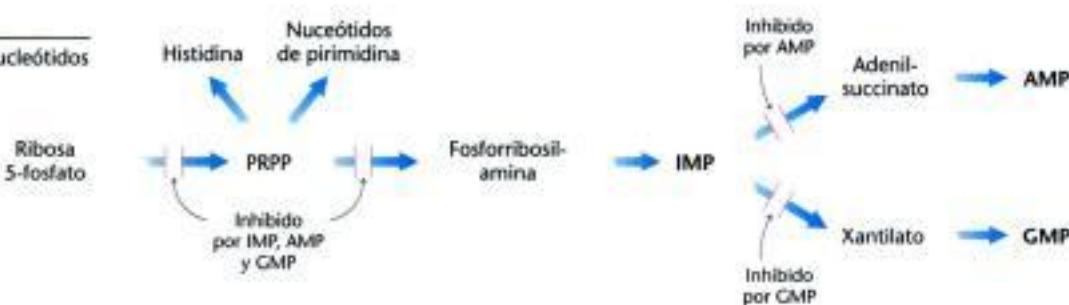


Figura 25.15 Control de la biosíntesis de purinas. La retroinhibición controla tanto la velocidad global de la biosíntesis de purinas como el equilibrio entre la producción de AMP y GMP.

1. En la biosíntesis de nucleótidos de purina, el paso comprometido consiste en la conversión de PRPP en fosforribosilamina mediante la *glutamina fosforribosil-aminotransferasa*. Este importante enzima se retroinhibe por muchos ribonucleótidos de purina. Es de destacar el hecho de que el AMP y el GMP, los productos finales de la vía, actúan de manera sinérgica a la hora de inhibir la amidotransferasa.
2. El inosinato es el punto donde la síntesis se bifurca hacia el AMP o hacia el GMP. *Las reacciones que tienen lugar a partir del inosinato son puntos de retroinhibición.* El AMP inhibe la conversión del inosinato en adenilsuccinato, su precursor inmediato. Analogamente, el GMP inhibe la conversión de inosinato en xantilato, su precursor inmediato.
3. Como ya se ha indicado, el GTP es un sustrato para la síntesis de AMP mientras que el ATP es un sustrato para la síntesis de GMP. Estas *relaciones recíprocas entre los sustratos* tienden a mantener el equilibrio entre la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y de guanina.

La síntesis de desoxirribonucleótidos se controla mediante la regulación de la ribonucleótido reductasa

La reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos se controla de manera precisa mediante interacciones alóstéricas. Cada polipéptido de la subunidad R1 de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* aeróbica presenta dos centros alóstéricos: uno de ellos controla la *actividad global* del enzima, mientras que el otro regula la *especificidad del sustrato* (Figura 25.16). La actividad catalítica global de la ribonucleótido reductasa disminuye cuando se le une dATP, una señal que indica abundancia de desoxirribonucleótidos. La unión del ATP anula esta retroinhibición. La unión de dATP o ATP al centro de control de la especificidad del sustrato intensifica la re-

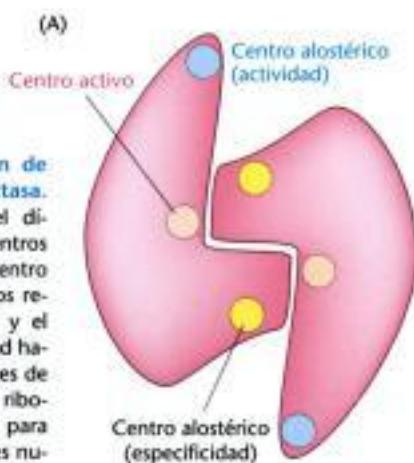


Figura 25.16 Regulación de la ribonucleótido reductasa. (A) Cada subunidad del dímero R1 contiene dos centros alóstéricos, además del centro activo. Uno de los centros regula la actividad global y el otro regula la especificidad hacia el sustrato. (B) Patrones de regulación que exhibe la ribonucleótido reductasa para cada uno de los diferentes nucleosidos difosfato.



Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Kappock, T. J., Ealick, S. E. y Stubbe, J. 2000. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:567-572.
- Galperin, M. Y. y Koonin, E. V. 1997. A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci.* 6:2639-2643.
- Jordan, A. y Reichard, P. 1998. Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:71-98.
- Seegmiller, J. E. 1989. Contributions of Lesch-Nyhan syndrome to the understanding of purine metabolism. *J. Inherited Metab. Dis.* 12:184-196.

Biosíntesis de pirimidina

- Rauschel, F. M., Thoden, J. B., Rheinhardt, G. D. y Holden, H. M. 1998. Carbamoyl phosphate synthetase: A crooked path from substrates to products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:624-632.
- Huang, X., Holden, H. M. y Rauschel, F. M. 2001. Channelling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 70:149-180.
- Begley, T. P., Appleby, T. C. y Ealick, S. E. 2000. The structural basis for the remarkable proficiency of ecto-5'-monophosphate decarboxylase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:711-718.
- Trant, T. W. y Temple, B. R. 2000. The chemistry of the reaction determines the invariant amino acids during the evolution and divergence of ecto-5'-monophosphate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 275:28675-28681.
- Lee, L., Kelly, R. E., Pisman-Landis, S. C. y Evans, D. R. 1985. Oligomeric structure of the multifunctional protein CAD that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:6802-6806.

Biosíntesis de purina

- Thoden, J. B., Firestone, S., Nixon, A., Benkovic, S. J. y Holden, H. M. 2000. Molecular structure of *Escherichia coli* PurT-encoded glycaminamide ribonucleotide transformylase. *Biochemistry* 39:8791-8802.
- McMillan, F. M., Caugnon, M., White, A., Hedstrom, L., Petsko, G. A. y Ringe, D. 2000. Crystal structure at 2.4 Å resolution of *Borrelia burgdorferi* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: Evidence of a substrate-induced hinged-lid motion by loop 6. *Biochemistry* 39:4533-4542.
- Levdikov, V. M., Barynin, V. V., Grebenko, A. I., Melik-Adamyan, W. R., Lamzin, V. S. y Wilson, K. S. 1998. The structure of SAICAR synthase: An enzyme in the *de novo* pathway of purine nucleotide biosynthesis. *Structure* 6:363-376.
- Smith, J. L., Zaluzec, E. J., Wery, J. P., Niu, L., Switzer, R. L., Zalkin, H. y Satow, Y. 1994. Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* 264:1427-1433.
- Weber, G., Nagai, M., Natsumeda, Y., Ichikawa, S., Nakamura, H., Eble, J. N., Jayaram, H. N., Chen, W. N., Paulik, E. y Hoffman, R. 1991. Regulation of *de novo* and salvage pathways in chemotherapy. *Adv. Enzyme Regul.* 31:45-67.

Ribonucleótido reductasas

- Eklund, H., Uhlin, U., Farneback, M., Logan, D. T. y Nordlund, P. 2001. Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77:177-268.
- Reichard, P. 1997. The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem. Sci.* 22:81-85.
- Stubbe, J. 2000. Ribonucleotide reductases: The link between an RNA and a DNA World? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:731-736.
- Logan, D. T., Andersson, J., Sjöberg, B. M. y Nordlund, P. 1999. A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* 283:1499-1504.

Tauer, A. y Benner, S. A. 1997. The B₁₂-dependent ribonucleotide reductase from the archaeobacterium *Thermoplasmata acidiphila*: An evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:53-58.

- Stubbe, J., Nocera, D. G., Yee, C. S. y Chang, M. C. 2003. Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: Long-range proton-coupled electron transfer? *Chem. Rev.* 103:2167-2201.
- Stubbe, J. y Riggs-Gelso, P. 1998. Harnessing free radical: Formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* 23:438-443.

Timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa

- Schnell, J. R., Dyson, H. J. y Wright, P. E. 2004. Structure, dynamics and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33:119-140.
- Li, R., Sirawaraporn, R., Chotunsub, P., Sirawaraporn, W., Wooden, J., Athappilly, F., Turley, S. y Hol, W. G. 2000. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J. Mol. Biol.* 295:307-323.
- Liang, P. H. y Anderson, K. S. 1998. Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidilate synthase-dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 37:12195-12205.
- Miller, G. P. y Benkovic, S. J. 1998. Stretching exercises: Flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. *Chem. Biol.* 5:R105-R113.
- Blakley, R. L. 1995. Eukaryotic dihydrofolate reductase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 70:23-102.
- Carreras, C. W. y Sami, D. V. 1995. The catalytic mechanism and structure of thymidilate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 64:721-762.
- Schweitzer, B. J., Dicker, A. P. y Bertino, J. R. 1990. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* 4:2441-2452.
- Bystroff, C., Oatley, S. J. y Kraut, J. 1990. Crystal structures of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: The NADP⁺ holoenzyme and the folate-NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state. *Biochemistry* 29:3263-3277.

Alteraciones de la biosíntesis de nucleótidos

- Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. (Eds.) 1995. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (7th Ed. pp. 1655-1840). McGraw-Hill.
- Nyhan, W. L. 1997. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inherited Metab. Dis.* 20:171-178.
- Wong, D. F., Harris, J. C., Naidu, S., Yokoi, F., Marenco, S., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., Bryan, R. N., Gjedde, A., Kuhar, M. J. y Breese, G. R. 1996. Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5539-5543.
- Resta, R. y Thompson, L. F. 1997. SCID: The role of adenosine deaminase deficiency. *Immuno. Today* 18:371-374.
- Davidson, B. L., Pushparaj, M., Kelley, W. N. y Patel, T. D. 1989. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: The molecular defect in a patient with gout (HPRTAshville). *J. Biol. Chem.* 264:520-525.
- Sculley, D. G., Dawson, P. A., Emerson, B. T. y Gordon, R. B. 1992. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. *Hum. Genet.* 90:195-207.
- Neychev, V. K. y Mitev, V. I. 2004. The biochemical basis of the neurobehavioral abnormalities in the Lesch-Nyhan syndrome: A hypothesis. *Med. Hypotheses* 63:131-134.
- Daly, L. E., Kirke, P. N., Molloy, A., Weir, D. G. y Scott, J. M. 1995. Folate levels and neural tube defects: Implications for prevention. *JAMA* 274:1698-1702.

Problemas

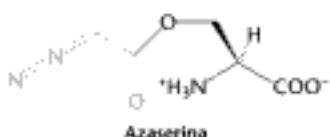
1. *Ribosa fosfato activada.* Escribir una ecuación ajustada para la síntesis de PRPP a partir de glucosa siguiendo la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato.

2. *Construcción de una pirimidina.* Escribir una ecuación ajustada para la síntesis de orotato a partir de glutamina, CO₂ y aspartato.

3. *Identificación del donante.* ¿Cuál es el reactivo activado durante la biosíntesis de cada uno de estos compuestos?

- (a) Fosforribosilamina
- (b) Carbamiloaspartato
- (c) Orotidilato (a partir del orotato)
- (d) Fosforribosilnucleotido

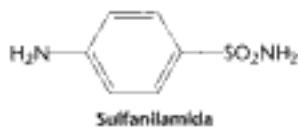
4. *Inhibición de la biosíntesis de purinas.* Las amidotransferasas se inhiben por el antibiótico azaserina (*O*-diazoacetil-L-serina), que es un análogo de la glutamina.



En células tratadas con azaserina, ¿qué intermediarios de la biosíntesis de purinas se acumularían?

5. *El costo de la metilación.* Escribir una ecuación ajustada para la síntesis de TMP a partir de dUMP y que esté acoplada a la conversión de serina en glicina.

6. *Acción de las sulfamidas.* La sulfanilamida y otras sulfamidas parecidas inhiben el crecimiento bacteriano a la vez que se produce una acumulación de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido. Esta inhibición revierte tras la adición de *p*-aminobenzoato.



Proponer un mecanismo para el efecto inhibidor de la sulfanilamida.

7. *Un donante generoso.* ¿Qué importantes reacciones biosintéticas utilizan PRPP?

8. *El medio HAT.* Las células mutantes incapaces de sintetizar nucleótidos mediante las vías de recuperación son herramientas muy útiles en biología molecular y celular. Supongamos que la célula A carece de la timidina quinasa, el enzima que cataliza la fosforilación de la timidina para formar timidilato y que la célula B carece de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

(a) Las células A y B no proliferan en un medio *HAT*, que contenga hipoxantina, aminopterina o ametopterina (metotrexato) y timidina. Sin embargo, la célula C, formada mediante la fusión de las células A y B sí crece en este medio. ¿Por qué?

(b) Supongamos que queremos introducir genes foráneos en la célula A. Diseñar un sencillo método para diferenciar las células que han captado el DNA foráneo de las que no.

9. *Buscar los átomos marcados.* Supongamos que se cultivan células en presencia de aminoácidos cuyos carbonos α se han marcado

con ¹³C. Identificar los átomos de la citosina y de la guanina que estarán marcados con ¹³C.

10. *A dos bandas.* Los seres humanos contienen dos carbamilofosfato sintetasas distintas. Una utiliza la glutamina como sustrato mientras que la otra utiliza amoníaco. ¿Cuáles son las funciones de estos dos enzimas?

11. *Terapia suplementaria.* En algunos casos, se administra allopurinol a pacientes con leucemia aguda sometidos a tratamiento con fármacos anticancerígenos. ¿Por qué se utiliza el allopurinol?

12. *Un enzima discapacitado.* Los dos átomos de oxígeno de la cadena lateral del aspartato 27 del centro activo de la dihidrofolato reductasa forman puentes de hidrógeno con el anillo de pteridina de los folatos. La importancia de esta interacción se puso de manifiesto gracias a los estudios realizados con dos mutantes en esta posición, Asn 27 y Ser 27. A 25 °C, la constante de disociación del metotrexato era de 0,07 nM en el caso de la proteína nativa, 1,9 nM en el mutante Asn 27 y 210 nM en el mutante Ser 27. Calcular la energía libre estándar para la unión del metotrexato a estas tres proteínas. ¿Cuál es la disminución en la energía de unión que resulta de cada mutación?

13. *Corrección de deficiencias.* Supongamos que encontramos una persona que carece de un enzima necesario para la síntesis de IMP. ¿Qué tratamiento debería recibir?

14. *Nitrógeno marcado.* Se efectúa la biosíntesis de purinas en presencia de [¹⁵N]-aspartato y se purifica el GTP y el ATP recién formados. ¿Qué posiciones aparecerán marcadas en los dos nucleótidos?

15. *Cambio de inhibidor.* El tratamiento de la xantina oxidasa con allopurinol da lugar a la formación de un nuevo compuesto que resulta ser un inhibidor del enzima extraordinariamente potente. Proponer una estructura para este compuesto.

Problemas de mecanismos

16. *Iguales pero distintos.* Escriba los mecanismos para la conversión de fosforribosilamina en glicinamida ribonucleótido y de xantilato en guanilato.

17. *Cerrar el anillo.* Proponer un mecanismo para la conversión de 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido en inosinato.

Problemas de integración de capítulos

18. *¡Están en todas partes!* Los nucleótidos desempeñan diversas funciones en la célula. Dar un ejemplo de un nucleótido que participe en las funciones o procesos siguientes:

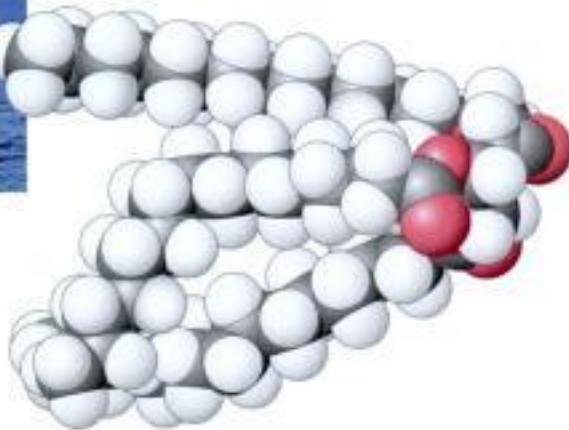
- (a) Segundo mensajero
- (b) Transferencia de grupos fosforilo
- (c) Activación de carbohidratos
- (d) Activación de grupos acetilo
- (e) Transferencia de electrones
- (f) Secuenciación del DNA
- (g) Quimioterapia
- (h) Efector alostérico

Hidden page

Biosíntesis de lípidos de membrana y de esteroides



Las grasas tales como la molécula de triacilglicerol (abajo) se utilizan ampliamente para almacenar el exceso de energía a fin de utilizarla más tarde o para satisfacer otros fines, ilustrados por la grasa de aislamiento de la ballena. La tendencia natural de las grasas a existir en formas prácticamente libres de agua hace que estas moléculas sean convenientes para estas funciones. [(Izquierda) Francoise Cahier/Photo Researchers.]



Contenido

- 26.1 El fosfatidato es un intermediario común en la síntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles
- 26.2 El colesterol se sintetiza a partir de acetil-coenzima A en tres etapas
- 26.3 La compleja regulación de la biosíntesis del colesterol tiene lugar a varios niveles
- 26.4 Entre los derivados importantes del colesterol se incluyen las sales biliares y las hormonas esteroideas

En este capítulo se estudia la biosíntesis de tres componentes importantes de las membranas biológicas: fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol (Capítulo 12). También se considerará aquí la síntesis de triacilgliceroles ya que su vía de síntesis se solapa con la de los fosfoglicéridos. El colesterol es de interés tanto como componente de las membranas como precursor de varias moléculas señal, entre las que se encuentran las hormonas esteroideas progesterona, testosterona, estrógeno y cortisol.

El colesterol se transporta en la sangre por medio de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y las células pueden captarlo por medio de un receptor de LDL ubicado en su superficie. El transporte y la captación del colesterol ilustran con brillantez un mecanismo recurrente para la entrada en las células de metabolitos y moléculas señal. La carencia del receptor de la LDL en la *hipercolesterolemia familiar* (una enfermedad genética) conduce a unas concentraciones de colesterol en sangre marcadamente elevadas, a depósitos de colesterol en los vasos sanguíneos y a ataques cardíacos en la niñez. En realidad, el colesterol está implicado en el desarrollo de la aterosclerosis aun en los individuos sin defectos genéticos. De este modo, la regulación de la síntesis y del transporte del colesterol puede ofrecer una visión de conjunto especialmente clara sobre el papel que nuestros conocimientos de bioquímica desempeñan en la medicina.

Hidden page



En principal órgano de síntesis de triacilgliceroles es el hígado. Desde el hígado, los triacilgliceroles se transportan a los músculos para convertirse en energía o a los adipocitos para almacenarse.

La síntesis de fosfolípidos requiere un intermediario activado

La síntesis de lípidos de membrana continúa en el retículo endoplásmico. La síntesis de fosfolípidos requiere la combinación de un diacilglicérido con un alcohol. Como en la mayoría de las reacciones anabólicas, uno de los componentes debe activarse. En este caso, dependiendo de la fuente de los reactantes, cualquiera de los dos componentes puede hacerlo.

Síntesis a partir de diacilglicerol activado. La vía de síntesis *de novo* comienza con la reacción del fosfatidato con la citidina trifosfato (CTP) para formar el diacilglicero activado, es decir, la *citidina difosfodiacylglycerol* (*CDP-diacilglicerol*) (Figura 26.2). Como otras muchas biosíntesis, esta reacción resulta favorecida por la hidrólisis del pirofosfato.

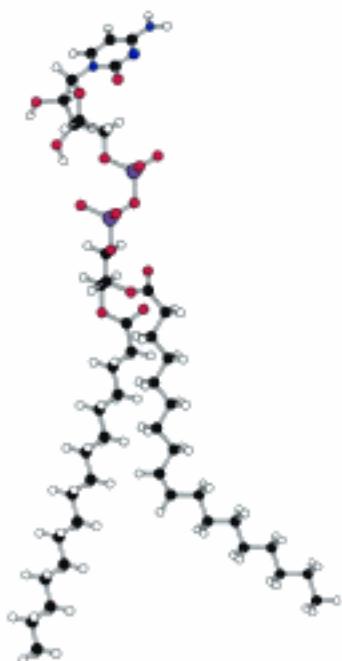
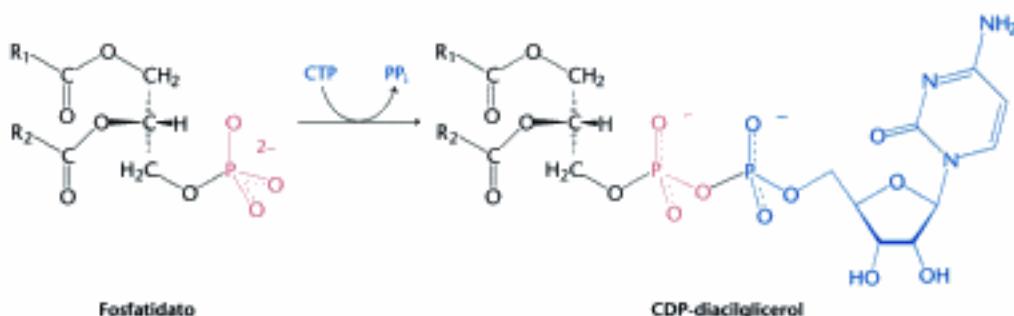
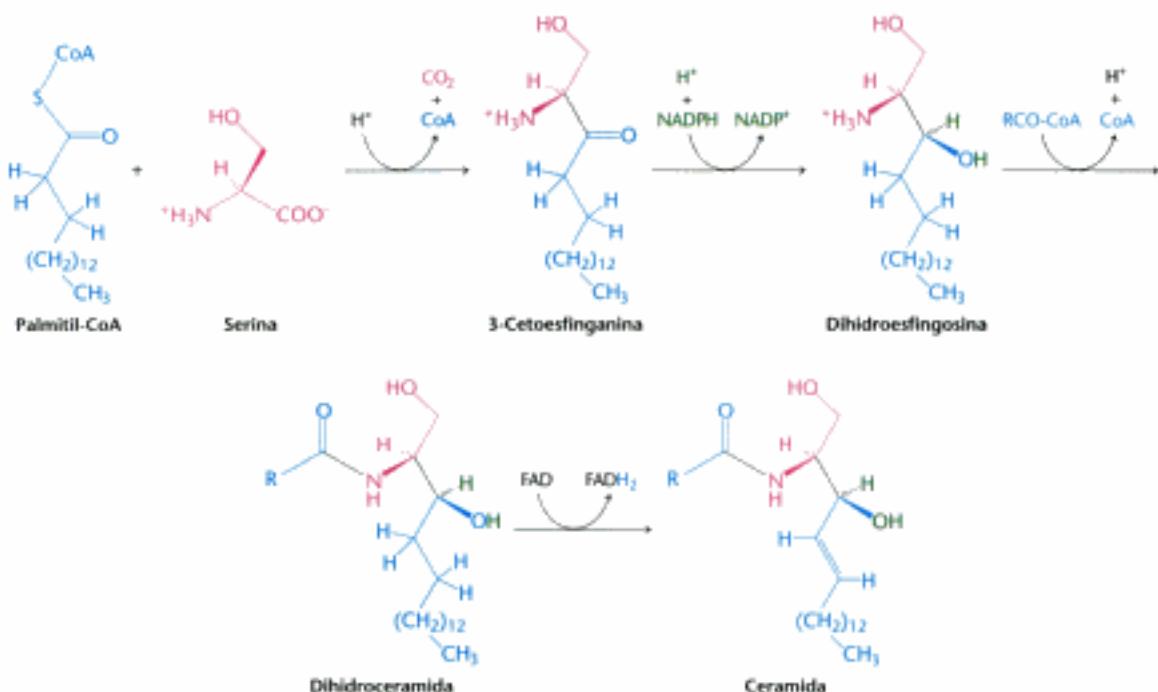


Figura 26.2 Estructura del CDP-diacilglicerol. Este intermediario clave de la síntesis de fosfolípidos consta de fosfatidato y CMP unidos por un enlace pirofosfato.

Hidden page

Hidden page



En todos los esfingolípidos, el grupo amino de la esfingosina está acilado (Figura 26.3). El grupo hidroxilo terminal también está sustituido. En la *esfingomielina*, que es un componente de la vaina de mielina que recubre muchas fibras nerviosas, el sustituyente es la fosforilcolina, procedente de la fosfatidilcolina. En los *cerebrósidos*, el sustituyente es glucosa o galactosa. El dador de azúcar es la UDP-glucosa o la UDP-galactosa.

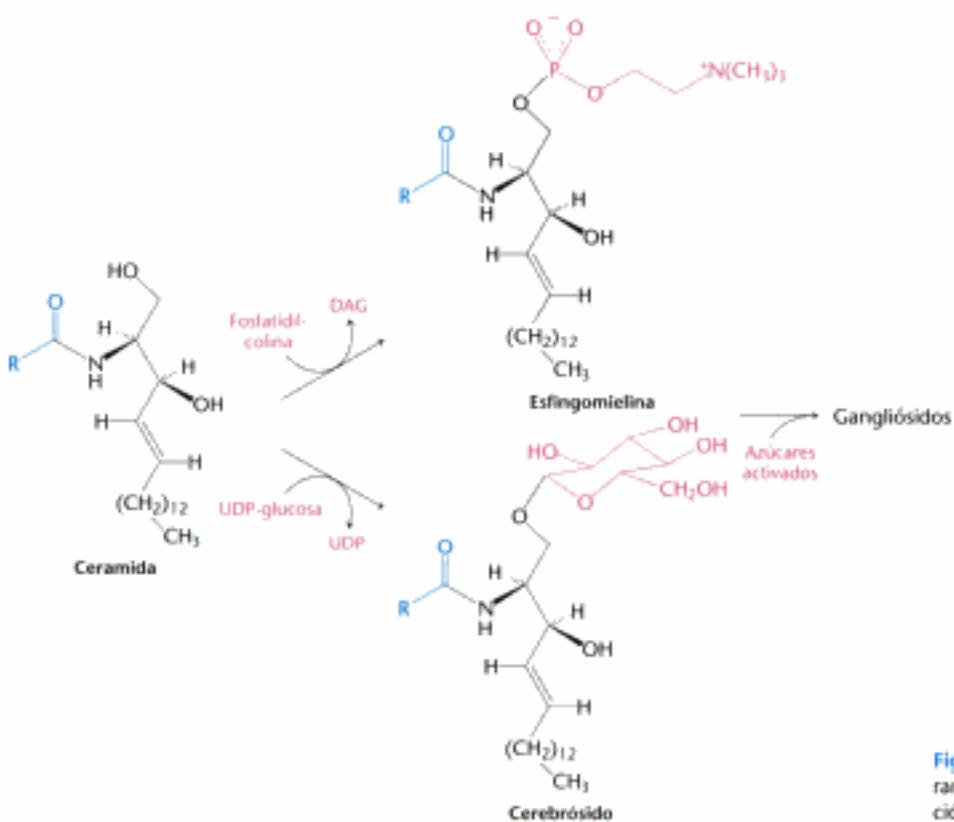


Figura 26.3 Síntesis de esfingolípidos. La ceramida es el punto de partida para la formación de la esfingomielina y los gangliósidos.

Hidden page

Hidden page

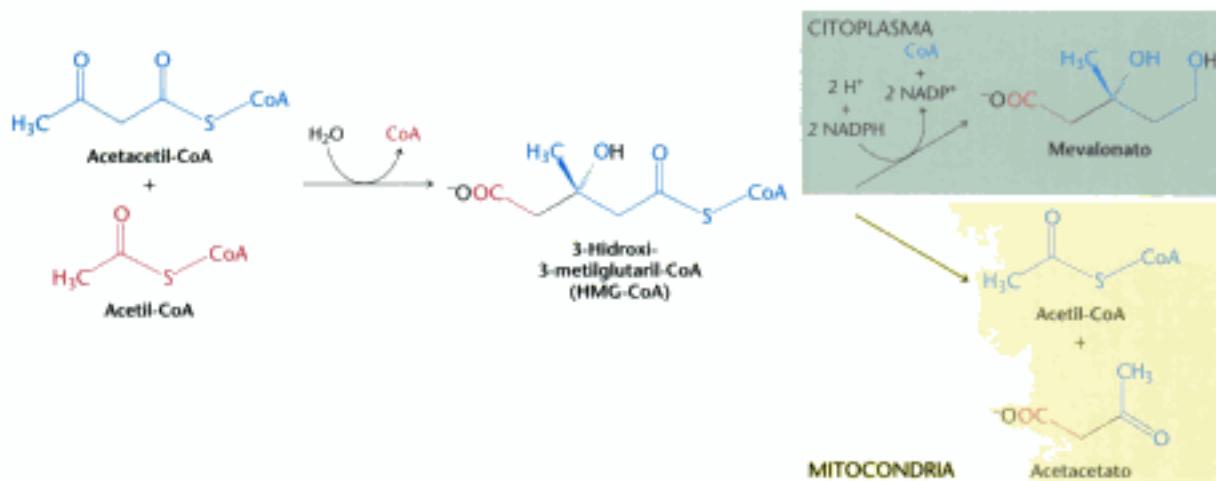


Figura 26.7 Destinos del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. En el citoplasma, el HMG-CoA se convierte en mevalonato. En la mitocondria, se convierte en acetil-CoA y acetacetato.

La HMG-CoA reductasa es una proteína integral de membrana del retículo endoplasmico.

El mevalonato se convierte en *3-isopentilpirofosfato* en tres reacciones consecutivas que requieren ATP (Figura 26.8). En el último paso la liberación de CO_2 conduce a isopentilpirofosfato, una unidad de isopreno activada que es un precursor clave en la síntesis de muchas biomoléculas importantes en todos los reinos de la vida.

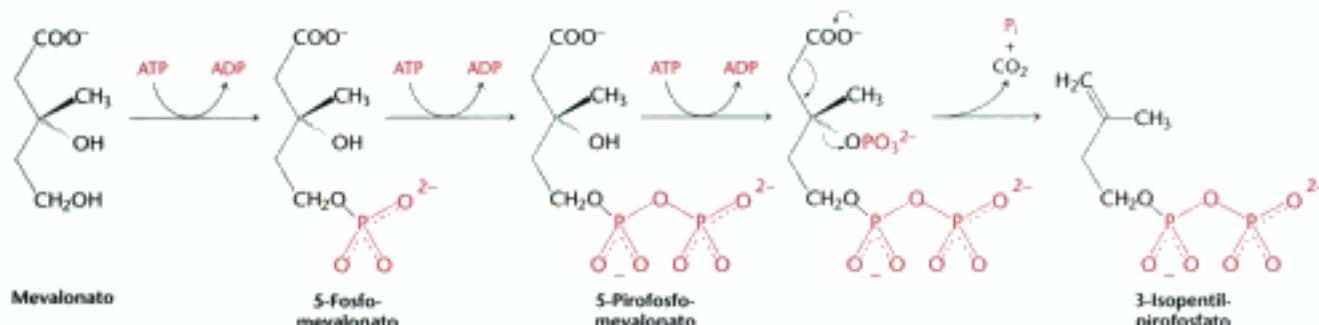
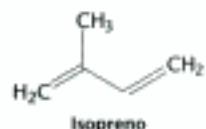


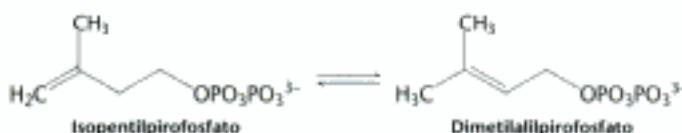
Figura 26.8 Síntesis de isopentilpirofosfato. Este intermediario activado se forma a partir de mevalonato en tres etapas, la última de las cuales incluye una descarboxilación.

El escualeno (C_{30}) se sintetiza a partir de seis moléculas de isopentilpirofosfato (C_5)

El escualeno se sintetiza a partir de isopentilpirofosfato mediante la secuencia de reacciones



Esta etapa de la síntesis de colesterol comienza con la isomerización del *isopentilpirofosfato* hasta *dimetilalilpirofosfato*.



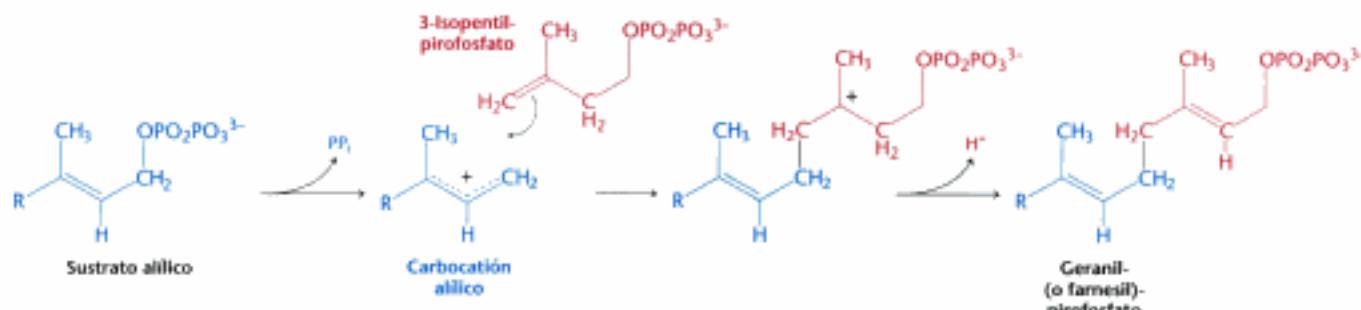
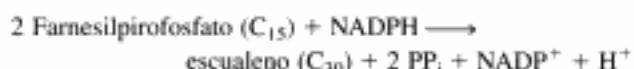


Figura 26.9 Mecanismo de condensación en la síntesis de colesterol. Mecanismo de la unión de dimetilalilpirofosfato e isopentilpirofosfato para formar geranilpirofosfato. Este mismo mecanismo es el que se emplea para añadir un nuevo isopentilpirofosfato para la formación de farnesilpirofosfato.

Estas dos unidades isoméricas C₅ se condensan para formar un compuesto C₁₀: el isopentilpirofosfato ataca a un ion carbonio alílico originado a partir de dimetilalilpirofosfato para formar *geranilpirofosfato* (Figura 26.9). La misma clase de reacción se repite de nuevo: el geranilpirofosfato se transforma en un ion carbonio alílico, que es atacado por el isopentilpirofosfato. El compuesto resultante C₁₅ se llama *farnesilpirofosfato*. El mismo enzima, la *geraniltransferasa*, cataliza cada una de estas condensaciones.

El último paso de la síntesis de *escualeno* es una condensación reductora cola-a-cola de dos moléculas de farnesilpirofosfato, catalizada por el enzima del retículo endoplasmático *escualeno sintasa*.



Las reacciones que permiten convertir las unidades C₅ en escualeno, un isoprenoide C₃₀, están resumidas en la Figura 26.10.

El escualeno se cicla para formar colesterol

La etapa final de la biosíntesis de colesterol comienza con la ciclación del escualeno (Figura 26.11). En primer lugar el escualeno se activa para convertirse en epóxido de escualeno (2,3-oxidoescualeno) en una reacción que utiliza O₂ y NADPH. Posteriormente, el epóxido de escualeno se cierra formando *lanosterol* por medio de la *oxidoescualeno ciclase*. Esta extraordinaria transformación procede de una manera concertada. El enzima mantiene al epóxido de escualeno en una conformación apropiada e inicia la reacción protonando al oxígeno del epóxido. El carbocatión formado se reorganiza espontáneamente para producir lanosterol. El lanosterol se convierte en colesterol, en un proceso de múltiples pasos.

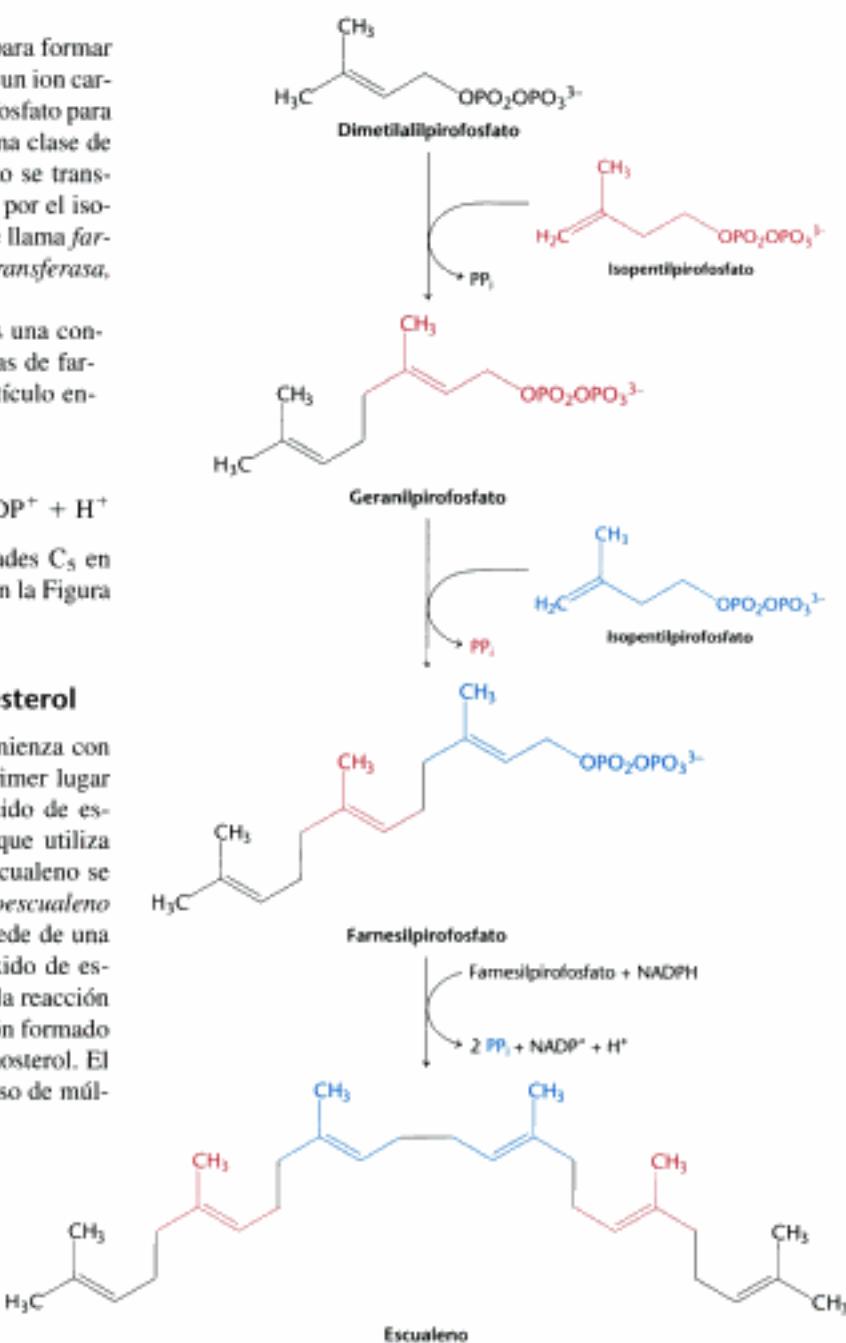


Figura 26.10 Síntesis del escualeno. Se condensan una molécula de dimetilalilpirofosfato con dos moléculas de isopentilpirofosfato para formar farnesilpirofosfato. El ensamblaje cola-con-cola de dos moléculas de farnesilpirofosfato origina escualeno.

Hidden page

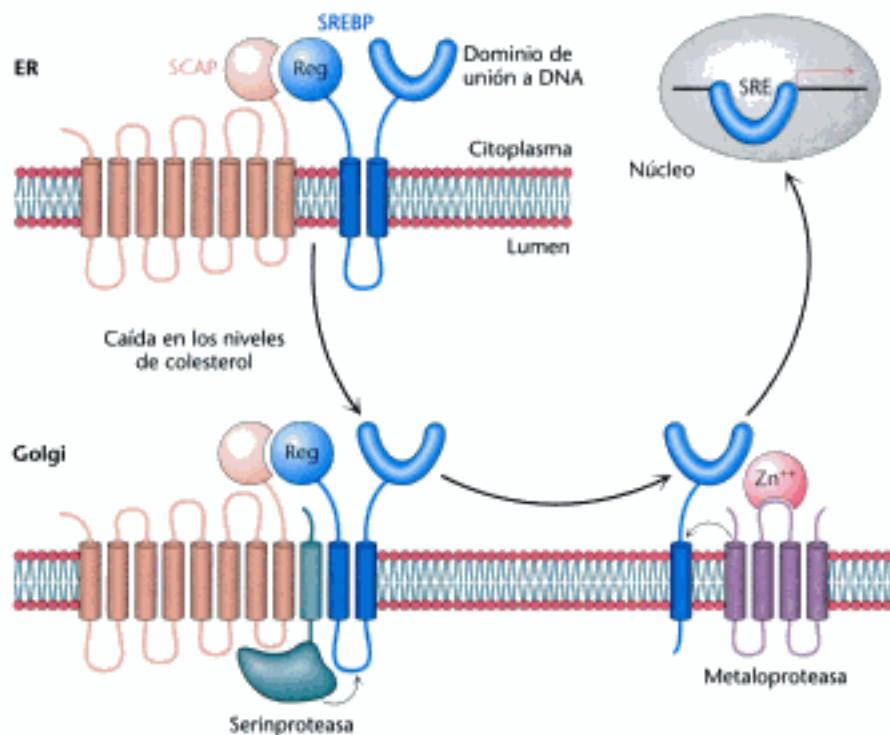


Figura 26.13 La vía SREBP. La SREBP reside en el retículo endoplásmico, donde se une a SCAP por medio de su dominio regulador (Reg). Cuando los niveles de colesterol caen, SCAP y SREBP se desplazan al complejo Golgi donde SREBP sufre sucesivas escisiones proteolíticas por una serinproteasa y una metaloproteasa. El dominio de unión al DNA liberado se desplaza al núcleo para la unión al DNA liberado se desplaza al núcleo para alterar la expresión genética. [Adaptado de una ilustración aportada por los Dres. Michael Brown y Joseph Golstein.]

bloquea la liberación proteolítica de la SREBP y se degrada rápidamente la SREBP que está en el núcleo. Estos dos eventos detienen la transcripción de los genes de la vía biosintética del colesterol.

2. La velocidad de la traducción del mRNA de la reductasa se inhibe por metabolitos no esteroles derivados del mevalonato, así como por el colesterol de la dieta.

3. La degradación de la reductasa está controlada de modo riguroso. El enzima es bipartito: su dominio citoplasmático lleva a cabo la catálisis, y su dominio de membrana detecta las señales que conducen a su degradación. El dominio de membrana puede sufrir un cambio en su estado de isomerización en respuesta al incremento de concentraciones de esteroles tales como el colesterol, haciendo que el enzima sea más susceptible a la proteólisis. En la proteasa que activa a la SREBP existen regiones sensibles a esteroles homólogos. La reductasa puede degradarse posteriormente por ubiquitinación y envío al proteasoma 26S. Mediante la combinación de estos tres mecanismos reguladores, la cantidad del enzima en la célula se puede regular más de 200 veces.

4. La fosforilación disminuye la actividad de la reductasa. Este enzima, como la acetil-CoA carboxilasa (que cataliza la etapa limitante de la síntesis de ácidos grasos, Sección 22.5), es desconectado por una proteína quinasa activada por AMP. De este modo, cuando la concentración de ATP es baja, la síntesis de colesterol cesa.

Como veremos en breve, los cuatro mecanismos de regulación están modulados por receptores sensibles a la presencia de colesterol en la sangre.

Las lipoproteínas transportan colesterol y triacilgliceroles por todo el organismo

El colesterol y los triacilgliceroles son transportados en los líquidos corporales en forma de *partículas lipoproteicas*. Cada partícula consta de un núcleo central formado por lípidos hidrofóbicos, rodeado de una envoltura formada por lípidos más polares y por proteínas. Los componentes proteicos de estos agregados macromoleculares tienen dos funciones: *solubilizan lípidos hidrofóbicos* y *contienen señales para las células diana* llamadas apoproteínas. Las apolipoproteínas se sintetizan y secretan por el hígado y el intestino. Las partículas lipoproteicas se clasifican según su densidad en sentido creciente (Tabla 26.1): *quilomicrones, remanentes de quilomicrones, VLDL, IDL y LDL*.

Hidden page

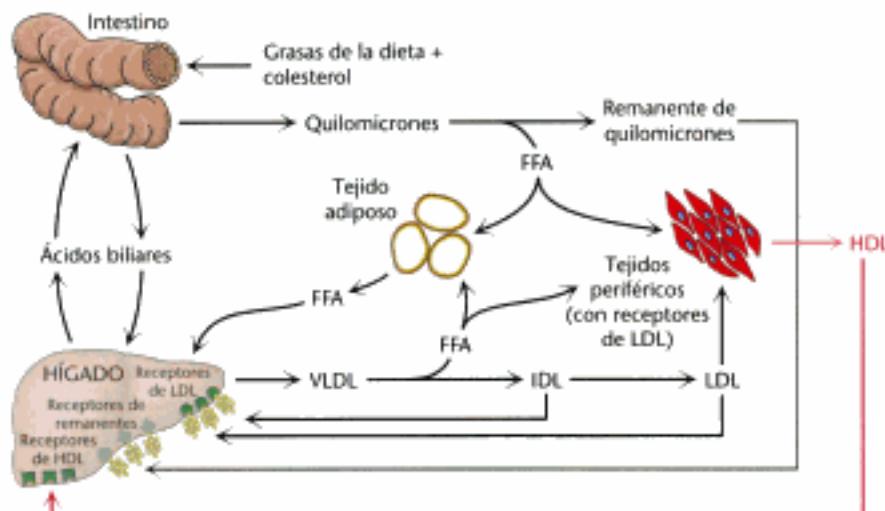


Figura 26.16 Una visión conjunta del metabolismo de las partículas lipoproteicas. Los ácidos grasos se abrevian como FFA ("free fatty acids"). [Tomado de J. G. Hardman (Ed.), L. L. Limbird (Ed.) y A. G. Gilman (Consult. Ed.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^a ed. (McGraw-Hill, 2001), p. 975, Fig. 36.1.]

nas, un proceso conocido como *transporte de colesterol inverso*. Una aciltransferasa presente en la HDL esterifica este colesterol, que es transferido a la VLDL o a la LDL por una proteína de transferencia específica o bien retorna al hígado por la propia HDL (Figura 26.16).

Las concentraciones sanguíneas de ciertas lipoproteínas pueden ser útiles para el diagnóstico

Las concentraciones altas de colesterol en suero son causa de enfermedad y muerte porque contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas en las arterias de todo el cuerpo. Este exceso de colesterol está presente en la forma de partículas de lipoproteína de baja densidad, el denominado "colesterol malo". La *lipoproteína de alta densidad* HDL (citada a veces como "colesterol bueno") actúa como una lanzadera que transporta el colesterol por todo el cuerpo. La HDL capta y esterifica el colesterol liberado por los tejidos periféricos y, posteriormente, transfiere los ésteres de colesterol al hígado o a los tejidos que emplean colesterol para sintetizar hormonas esteroideas. Estos tejidos captan a la HDL mediante un receptor específico. No se conoce la naturaleza exacta del efecto protector de las concentraciones de HDL; sin embargo, en la página 747 se estudiará un posible mecanismo.

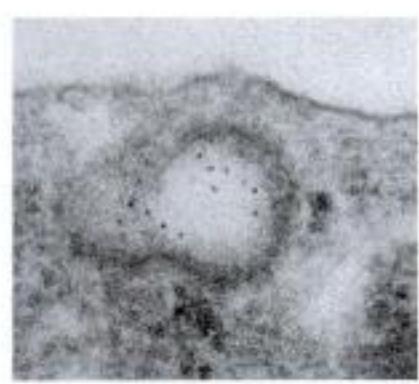
La relación entre el colesterol en la forma de lipoproteína de alta densidad, y el de la forma de LDL puede ser empleada para evaluar la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad cardíaca. Para una persona sana, la relación LDL/HDL es 3.5.

Las lipoproteínas de baja densidad desempeñan un papel clave en el metabolismo del colesterol

El metabolismo del colesterol debe regularse con precisión para prevenir la atherosclerosis. El modo de controlarlo en el hígado, el principal centro de síntesis del colesterol, ya se ha estudiado: el colesterol de la dieta reduce la actividad y la concentración de la 3-hidroxi-3-metilglutaryl-CoA reductasa, el enzima que cataliza la etapa limitante. Los resultados de los estudios realizados por Michael Brown y Joseph Goldstein han arrojado mucha luz sobre el control del metabolismo del colesterol en tejidos extrahepáticos. En general, las células distintas de las hepáticas e intestinales obtienen el colesterol del plasma, en vez de sintetizarlo *de novo*. En concreto, *su fuente principal de colesterol es la lipoproteína de baja densidad*. El proceso de captación de LDL, denominado *endocitosis mediada por receptor*, sirve como paradigma de la captación de muchas moléculas.



(A)



(B)

Figura 26.17 Endocitosis de la LDL unida a su receptor. (A) Micrografía electrónica que muestra a la LDL (conjugada con ferritina para su visualización, puntos oscuros) unida a una cavidad revestida en la superficie de una célula cultivada de fibroblasto humano. (B) Micrografía electrónica que muestra esta región invaginándose y fusionándose para formar una vesícula endocítica. [Tomadas de R. G. W. Anderson, M. S. Brown y J. L. Goldstein. *Cell* 10 (1977):351-364.]

Las etapas de la endocitosis de LDL mediada por receptor son las siguientes (véase la Figura 12.37).

1. La apolipoproteína B-100 de la superficie de una partícula de LDL se une a una proteína receptora específica de la membrana plasmática de las células extrahepáticas. Los receptores de LDL están localizados en zonas especializadas llamadas *vesículas revestidas* ("coated pits") que contienen una proteína especializada denominada *clatrina*.
2. El complejo receptor-LDL se introduce en la célula por *endocitosis*, es decir, la membrana plasmática contigua al complejo se invagina y luego se fusiona formando una vesícula endocítica (Figura. 26.17).
3. Estas vesículas que contienen LDL se fusionan posteriormente con los *lisosomas*, vesículas ácidas que poseen una amplia gama de enzimas degradativas. El componente proteico de la LDL se hidroliza para dar aminoácidos libres. Los ésteres de colesterol de la LDL se hidrolizan mediante una lipasa ácida lisosómica. El receptor de LDL regresa inalterado, normalmente por sí mismo, a la membrana plasmática. El ciclo para este proceso del receptor es de unos 10 minutos; durante su vida media, que es aproximadamente de un día, el receptor puede introducir muchas partículas de LDL en la célula.
4. *El colesterol no esterificado que se libera puede utilizarse para la biosíntesis de membranas.* También puede *reesterificarse para almacenarse dentro de la célula*. De hecho, el colesterol libre activa la *acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)*, el enzima que cataliza esta reacción. El colesterol reesterificado contiene principalmente oleato y palmitoleato, que son ácidos grasos monoinsaturados, a diferencia de los ésteres de colesterol en la LDL, que son ricos en linoleato, un ácido graso poliinsaturado (véase tabla 12.1). Es imprescindible que el colesterol se reesterifique, puesto que las concentraciones elevadas de colesterol no esterificado trastornan la integridad de las membranas celulares.

La propia síntesis del receptor de LDL está sujeta a retro-regulación. Los resultados de los estudios realizados con cultivos de fibroblastos demuestran que *cuando abunda el colesterol dentro de la célula, dejan de sintetizarse nuevos receptores de LDL, y así queda bloqueada la incorporación de más colesterol procedente de las LDL del plasma*. El gen que codifica el receptor de LDL, como sucede con el de la reductasa, está regulado por la SREBP, que se une a un elemento regulador de este roles que controla la velocidad de síntesis del mRNA.

El receptor de LDL es una proteína transmembrana con seis regiones funcionales diferentes

La secuencia de aminoácidos del receptor de LDL humano revela la estructura de mozaico de esta proteína de 115 kd, que consta de seis tipos de dominios diferentes (Figura 26.18). La región amino terminal del receptor maduro contiene una secuencia rica en cisteína de unos 40 residuos que se repite, con algunas variaciones, siete veces.

Un segundo dominio del receptor de LDL es homólogo a otro encontrado en el factor de crecimiento epidérmico (*EGF*, "epidermal growth factor"). Este dominio presenta tres repeticiones y entre la segunda y la tercera hay seis repeticiones de un tercer dominio, semejante a las hojas de la subunidad β de la transducina (p. 270). Las seis repeticiones forman una estructura tipo propulsor que contacta con uno de los dominios homólogos a la EGF (Figura 26.19). Un residuo de aspartato forma puentes de hidrógeno que sujetan cada hoja con el resto de la estructura. La exposición al entorno de pH ácido del lisosoma origina que las estructuras tipo propulsor interaccionen con el dominio de unión a LDL. Esta interacción desplaza a la LDL, la cual entonces resulta digerida por el lisosoma.

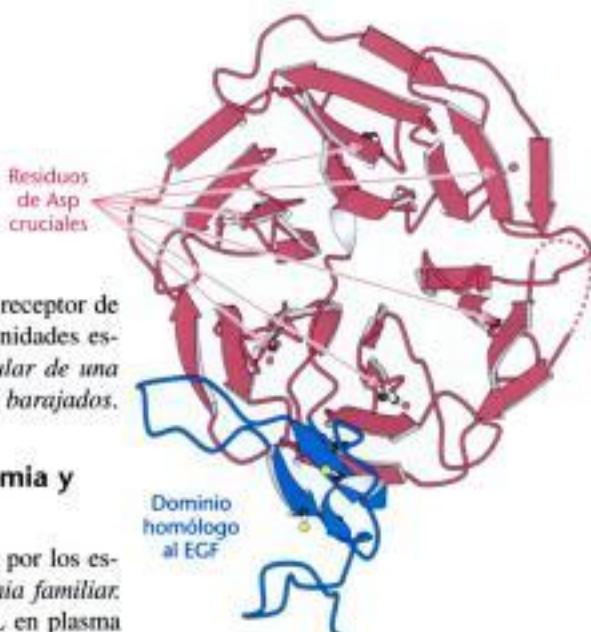


Figura 26.18 Dominios del receptor de LDL. Una representación esquemática de la secuencia de aminoácidos del receptor de LDL que muestra los seis tipos de dominios.

Los tres dominios finales están constituidos por una única copia cada uno. El cuarto dominio, muy rico en residuos de serina y treonina, contiene azúcares unidos mediante enlaces O. Estos oligosacáridos funcionan como puentes para mantener al receptor extendido por la membrana de modo que el dominio que une a la LDL resulte accesible a la LDL. La quinta clase de dominio consta de 22 residuos hidrofóbicos y atraviesa la membrana plasmática. La sexta y última clase de dominio consta de 50 residuos y emerge de la cara citoplasmática de la membrana, donde controla la interacción del receptor con las vesículas revestidas y participa en la endocitosis. El gen para el receptor de LDL consta de 18 exones, que se corresponden estrictamente con las unidades estructurales de la proteína. *El receptor de LDL es un ejemplo espectacular de una proteína-mosaico codificada por un gen que fue ensamblado por exones barajados.*

La carencia del receptor de LDL origina hipercolesterolemia y aterosclerosis

 La importancia fisiológica de los receptores de LDL fue revelada por los estudios pioneros de Brown y Goldstein sobre la *hipercolesterolemia familiar*. En esta anomalía genética, la concentración total de colesterol y de LDL en plasma es marcadamente elevada, como resultado de una mutación en un único *locus* autosómico. En los individuos homozigóticos, un valor típico de la colesterolemia es 680 mg dl^{-1} , a diferencia de los 300 mg dl^{-1} de los heterozigóticos (los análisis clínicos normalmente se expresan en miligramos por decilitro, que equivalen a miligramos por 100 mililitros). Se considera óptima una colesterolemia $< 200 \text{ mg dl}^{-1}$, pero la mayoría de la población tiene concentraciones más altas. *En la hipercolesterolemia familiar el colesterol se deposita en varios tejidos debido a la elevada concentración de colesterol-LDL en el plasma.* En piel y tendones aparecen prominentes nódulos de colesterol, llamados *xantomas*. La causa concreta es la oxidación de las LDL sanguíneas, que están en exceso, a las formas oxidadas de LDL (oxLDL). Las células del sistema inmunitario denominadas macrófagos captan las oxLDL y se hinchan hasta transformarse en células espumosas. Estas células espumosas se atascan en las paredes de los vasos sanguíneos y contribuyen a la formación de las placas ateroscleróticas que causan el estrechamiento de las arterias y provocan los ataques cardíacos (Figura 26.20). De hecho, *la mayoría de los homozigotos mueren de enfermedad arterial cardiaca en la infancia*. La enfermedad en los heterozigóticos (una de cada 500 personas) tiene un curso clínico más leve y más variable. Se ha encontrado una esterasa sérica que degrada los lípidos oxidados en asociación con las HDL. Posiblemente, la



 **Figura 26.19 Estructura del dominio propulsor.** Nótese la forma de propulsor de seis hojas de este dominio (en rojo). El dominio propulsor es adyacente al dominio homólogo a EGF (en azul) del receptor de LDL. [Tomado de 1IJQ.pdb.]

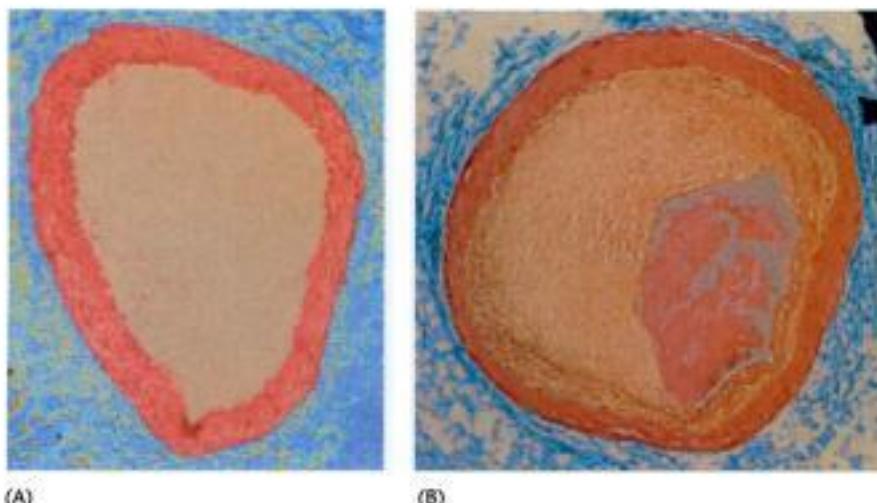


Figura 26.20 Efectos del exceso del colesterol. Sección transversal de (A) una arteria normal y (B) una arteria bloqueada por una placa rica en colesterol. [SPL/Photo Researchers.]

proteína asociada a las HDL destruye a las oxLDL, otorgando a las HDL la capacidad protectora contra la enfermedad coronaria.

El defecto molecular en la mayoría de los casos de hipercolesterolemia familiar es la carencia o la deficiencia de receptores funcionales para las LDL. Se han identificado las mutaciones de los receptores que alteran cada una de las etapas de la vía de la endocitosis. Los homozigotos casi no tienen receptores funcionales para las LDL, mientras que los heterozigotos tienen alrededor de la mitad del número normal. En consecuencia, la entrada de las LDL en las células del hígado y de otros tejidos está perturbada, lo que incrementa la concentración plasmática de LDL. Además, entran menos IDL en el hígado porque la entrada de la IDL también está mediada por el receptor de LDL. En consecuencia, las IDL permanecen en sangre más tiempo en los pacientes con hipercolesterolemia familiar que en la población normal, y la mayor parte de las IDL, en estos pacientes, se transforma en LDL. Todas las consecuencias deletéreas de la falta o insuficiencia de receptores para las LDL pueden atribuirse al subsiguiente incremento de colesterol-LDL en sangre.

El mantenimiento clínico de las concentraciones de colesterol puede comprenderse a nivel bioquímico

Los homozigotos con hipercolesterolemia familiar sólo pueden tratarse mediante trasplante de hígado. Para los heterozigotos y otros enfermos con concentraciones elevadas de colesterol resulta adecuada una terapia de aplicación más general. *El objetivo es reducir la cantidad de colesterol en la sangre mediante el estímulo del gen normal único para que produzca un número mayor de receptores de LDL que el acostumbrado.* Ya hemos estudiado que la producción de receptores de LDL está controlada por las necesidades celulares de colesterol. Por lo tanto, en esencia, la estrategia consiste en privar a la célula de las fuentes disponibles de colesterol. Cuando se requiere colesterol, aumenta la cantidad de mRNA para el receptor de LDL y así se encuentra más receptor en la superficie celular. Esta situación puede provocarse mediante dos abordajes complementarios. Primero, se inhibe la reabsorción intestinal de sales biliares. Las sales biliares son derivados del colesterol que facilitan la absorción del colesterol y la grasa de la dieta (p. 619). Segundo, se bloquea la síntesis *de novo* del colesterol.

La reabsorción de la bilis se impide mediante la administración oral de polímeros cargados positivamente, como la colestiramina, que se unen a las sales biliares que tienen carga negativa y, de este modo, éstas no se absorben. La síntesis de colesterol puede ser bloqueada eficazmente por un tipo de compuestos denominados *estatinas* (por ejemplo, la lovastatina, también llamada mevacor; Figura 26.21). Estos compuestos son potentes inhibidores competitivos ($K_i = 1 \text{ nM}$) de la HMG-CoA reductasa, el punto de control clave de la vía biosintética. Las concentraciones plasmáticas de colesterol disminuyen un 50% en muchos de los pacientes a los que se les administra lovastatina e inhibidores de la reabsorción de sales biliares. La lovastatina y otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa se utilizan ampliamente para reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol en las personas que padecen aterosclerosis, que es la mayor causa de muerte en las sociedades industrializadas. El desarrollo de las estatinas como fármacos eficaces se describirá después en el Capítulo 35.

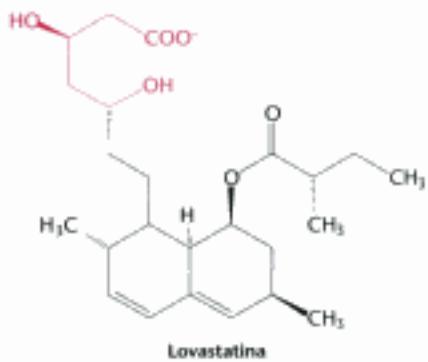
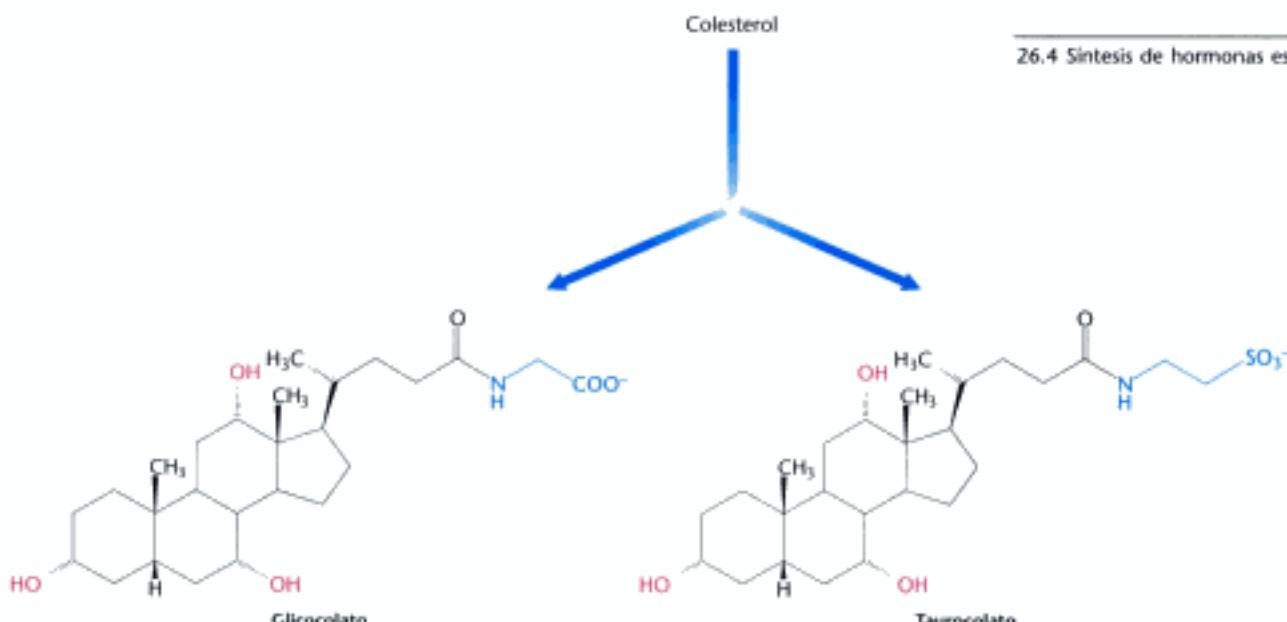


Figura 26.21 Lovastatina, un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa. Se muestra en rojo la parte de la estructura que se asemeja a la porción del 3-hidroxi-3-metilglutarilo.

26.4 Entre los derivados importantes del colesterol se incluyen las sales biliares y las hormonas esteroideas

El colesterol es un precursor de otras moléculas esteroideas importantes: las sales biliares, las hormonas esteroideas y la vitamina D.

Sales biliares. Como derivados polares del colesterol, las sales biliares son detergentes de una elevada efectividad, ya que contienen a la vez regiones polares y apolares. Las sales biliares se sintetizan en el hígado, se almacenan y concentran en la ve-



sícola biliar, y posteriormente se liberan al intestino delgado. Las sales biliares, los principales constituyentes de la bilis, *solubilizan los lípidos de la dieta* (p. 619). La solubilización incrementa el área superficial efectiva de los lípidos, lo que conlleva dos consecuencias: (1) se expone una mayor área superficial a la acción digestiva de las lipasas, y (2) los lípidos se absorben en el intestino con mayor facilidad. Las sales biliares también son los principales productos de degradación del colesterol. Las sales biliares glicocolato, la principal, y taurocolato se representan en la figura 26.22.

Hormonas esteroideas. El colesterol es el precursor de las cinco clases principales de *hormonas esteroideas*: progestágenos, glucocorticoïdes, mineralcorticoïdes, andrógenos y estrógenos (Figura 26.23). Estas hormonas son moléculas señal poderosas que regulan multitud de funciones del organismo. La *progesterona*, un *progestágeno*, prepara los revestimientos del útero para la implantación del óvulo fecundado. La progesterona también es esencial para el mantenimiento del embarazo. Los *andrógenos* (como la *testosterona*) son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de tipo masculino, mientras que los *estrógenos* (como la *estrona*) son necesarios para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de tipo femenino. Los estrógenos, junto con la progesterona, también participan en el ciclo ovárico. Los *glucocorticoïdes* (como el *cortisol*) promueven la gluconeogénesis y la formación del glucógeno, aumentan la degradación de grasas y proteínas, e inhiben la respuesta inflamatoria. Permiten que los animales respondan al estrés; de hecho, la ausencia de glucocorticoïdes puede resultar mortal. Los *mineralcorticoïdes* (principalmente la *aldosterona*) actúan sobre los túbulos distales del riñón donde incrementan de la reabsorción de Na⁺ y de la excreción de K⁺ e H⁺, lo que provoca un aumento del volumen y la presión sanguíneas. Los principales lugares de síntesis de estos tipos de hormonas son: el cuerpo lúteo para los progestágenos; los ovarios para los estrógenos; los testículos para los andrógenos; y la corteza suprarrenal para los glucocorticoïdes y los mineralcorticoïdes.

Las hormonas esteroideas se unen y activan a moléculas receptoras que sirven como factores de transcripción para regular la expresión de genes (Sección 31.3). Estas pequeñas moléculas relativamente similares son capaces de tener efectos muy diferentes debido a que las ligeras diferencias estructurales que existen entre ellas les permiten interaccionar con moléculas receptoras específicas.

Figura 26.22 Síntesis de sales biliares. Los grupos OH, en rojo, se han añadido al colesterol, así como los grupos mostrados en azul.

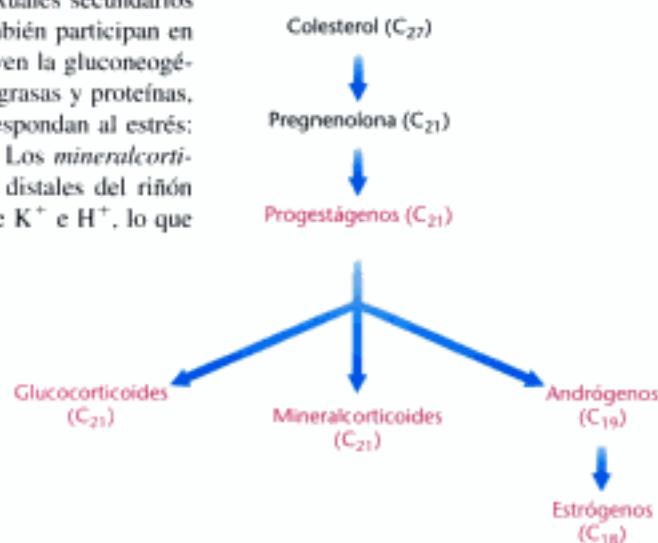


Figura 26.23 Relaciones biosintéticas entre los tipos de hormonas esteroideas y el colesterol.

Hidden page

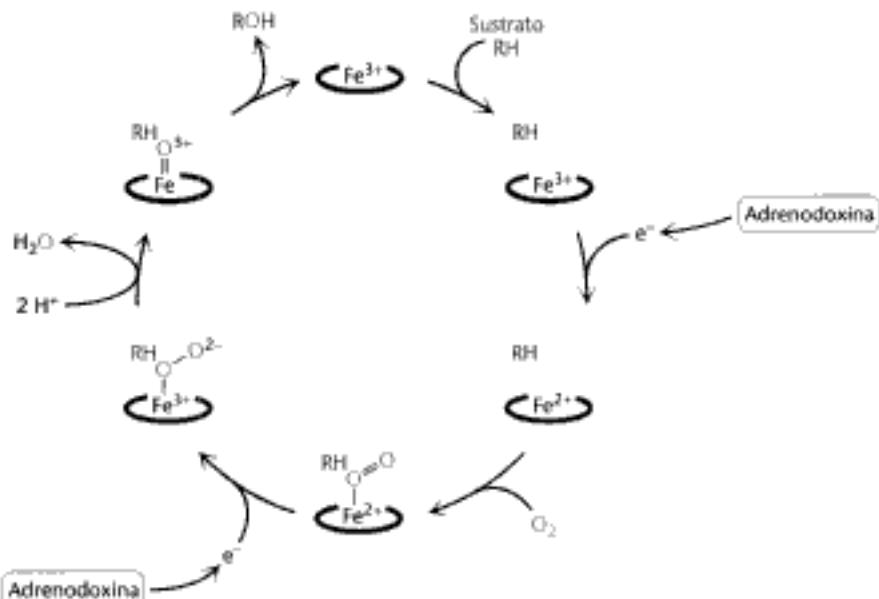


Figura 26.25 Mecanismo de los citocromos P450. Estos enzimas captan O_2 y emplean un átomo de oxígeno para hidroxilar sus sustratos.

La hidroxilación requiere la activación del oxígeno. En la síntesis de hormonas esteroideas y de sales biliares, la activación se consigue mediante un citocromo P450, una familia de citocromos que tienen un máximo de absorción de luz a 450 nm cuando forman complejos *in vitro* con monóxido de carbono exógeno. Estas proteínas ancladas en la membrana (~50 kd) contienen un grupo prostético hemo.

Debido a que las reacciones de hidroxilación promovidas por los enzimas P450 son reacciones de oxidación, a primera vista es sorprendente que también consuman el reductor NADPH. El NADPH transfiere sus electrones de elevado potencial a una flavoproteína que, a su vez, los dirige a la *adrenodoxina*, una proteína con hierro no hémico. La adrenodoxina transfiere un electrón que reduce la forma férrica (Fe^{3+}) del P450 a la forma ferrosa (Fe^{2+}) (Figura 26.25).

Sin la adición de este electrón, la P450 no se uniría al oxígeno. Recordemos que sólo la forma ferrosa de la hemoglobina se une al oxígeno (p. 185). A la unión del O_2 al hemo le sigue la aceptación de un segundo electrón procedente de la adrenodoxina. La aceptación de este segundo electrón provoca la escisión del enlace O–O. Uno de los átomos de oxígeno se protona y se libera como agua. El átomo de oxígeno que queda forma un intermediario ferrilo ($Fe=O$) altamente reactivo. Este intermediario extrae un átomo de hidrógeno del sustrato RH para dar lugar a R^{\bullet} . Este radical libre transitorio captura el grupo OH del átomo de hierro y forma ROH, el producto hidroxilado, devolviendo al átomo de hierro a su estado férrico.

El sistema citocromo P450 es omnipresente y realiza una función de protección

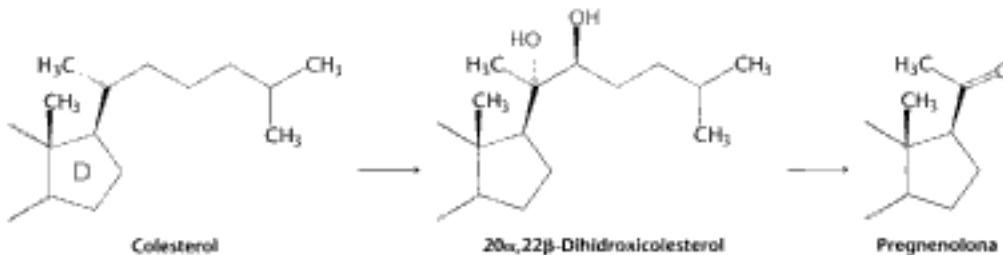
El sistema del citocromo P450, que en los mamíferos se localiza principalmente en el retículo endoplasmático del hígado e intestino delgado, es también importante para la *destoxicación de sustancias extrañas* (compuestos xenobióticos). Por ejemplo, la hidroxilación del fenobarbital, un barbitúrico, *aumenta su solubilidad y facilita su excreción*. Del mismo modo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que se ingieren al beber agua contaminada, se hidroxilan mediante el sistema P450, lo que les proporciona centros de conjugación con moléculas muy polares (por ejemplo, glucuronato o sulfato), las cuales incrementan notablemente la solubilidad de la molécula aromática modificada. Una de las funciones más relevantes del sistema del citocromo P450 en los seres humanos es su papel en el metabolismo

de los fármacos tales como la cafeína y el ibuprofeno (Capítulo 35). Algunos miembros del sistema citocromo P450 también metabolizan el etanol (Sección 27.5). La duración del efecto de muchos medicamentos depende de su velocidad de inactivación por el sistema P450. A pesar de su papel protector general en la eliminación de sustancias químicas extrañas, la acción del sistema P450 no siempre resulta beneficiosa. *Algunos de los más poderosos cancerígenos se generan in vivo a partir de compuestos inocuos mediante el sistema P450* en un proceso de *activación metabólica*. En las plantas, el sistema del citocromo P450 desempeña un papel en la síntesis de compuestos tóxicos así como en la de los pigmentos de las flores.

 El sistema del citocromo P450 es una super familia universal de monooxigenasas que está presente en las plantas, en los animales y en los procariotas. El genoma humano codifica más de 50 miembros de la familia, mientras que el genoma de la planta *Arabidopsis* codifica más de 250 miembros. Todos los miembros de esta amplia familia derivaron de la duplicación génica seguida de una posterior divergencia que generó una amplia gama de especificidades de sustrato. La especificidad de estos enzimas está codificada por regiones delimitadas de la estructura primaria, y la especificidad de sustrato de miembros relacionados estrechamente está definida a menudo por unos pocos residuos críticos o incluso por un solo aminoácido.

La pregnenolona, un precursor de otros muchos esteroides, se forma a partir del colesterol por ruptura de su cadena lateral

Las hormonas esteroideas contienen como máximo 21 átomos de carbono, mientras que el colesterol contiene 27. Así pues, la primera etapa en la síntesis de las hormonas esteroideas es la eliminación de una unidad de seis carbonos de la cadena lateral del colesterol para formar *pregnenolona*. La cadena lateral del colesterol se hidroxila en C-20 y después en C-22, lo cual va seguido de la ruptura del enlace entre estos átomos de carbono por la acción de una *desmolasasa*. En esta extraordinaria oxidación de seis electrones se consumen tres moléculas de NADPH y otras tres de O₂.



La progesterona y los corticosteroides se sintetizan a partir de la pregnenolona

La *progesterona* se sintetiza a partir de pregnenolona en dos etapas. El grupo 3-hidroxilo de la pregnenolona se oxida a 3-ceto, y el doble enlace Δ⁵ se isomeriza a Δ⁴ (Figura 26.26). El *cortisol*, el principal glucocorticoide, se sintetiza a partir de la progesterona por hidroxilaciones en C-17, C-21 y C-11; el C-17 debe hidroxilarse antes que el C-21, mientras que la hidroxilación del C-11 puede producirse en cualquier etapa. Los enzimas que catalizan estas hidroxilaciones son muy específicos, como lo demuestran algunas anomalías congénitas. La etapa inicial en la síntesis de la *aldosterona*, el principal mineralcorticoide, es la hidroxilación en C-21 de la progesterona. La desoxicorticosterona resultante se hidroxila en C-11. El grupo metilo angular C-18 se oxida entonces a aldehído, produciéndose la aldosterona.

Hidden page

testosterona, a través de sus efectos sobre el cerebro, es de suma importancia en el desarrollo del comportamiento sexual masculino. También es importante en el mantenimiento de los testículos y en el desarrollo de la masa muscular. Debido a esta última actividad, a la testosterona se le denomina *esteroides anabolizante*. La testosterona se reduce por la acción de la 5α -reductasa para formar *dihidrotestosterona* (DHT), un poderoso andrógeno embrionario que promueve el desarrollo y la diferenciación del fenotipo masculino. Los estrógenos se sintetizan a partir de los andrógenos por pérdida del grupo metilo angular C-19 y la formación de un anillo A aromático. La *estriona*, un estrógeno, deriva de la androstendiona, mientras que el *estradiol*, otro estrógeno, se forma a partir de la testosterona.

La vitamina D deriva del colesterol por la acción de la luz que rompe uno de sus anillos

El colesterol es también precursor de la vitamina D, que desempeña un papel esencial en el control del metabolismo del calcio y del fósforo. El *7-deshidrocolesterol* (*provitamina D₃*) se fotoliza por la *luz ultravioleta de la radiación solar* en *previtamina D₃*, que *espontáneamente* se *isomeriza* a *vitamina D₃* (Figura 26.28). La vitamina D₃ (*colecalciferol*) se convierte en *calcitriol* (1,25-dihidroxicolecalciferol), la hormona activa, mediante reacciones de hidroxilación que tienen lugar en el hígado y los riñones. Aunque no es un esteroide, la vitamina D actúa de una manera análoga: se une a un receptor, similar estructuralmente a los receptores de los esteroides, para formar un complejo que actúa como un factor de transcripción, que regula la expresión génica.

 La deficiencia de vitamina D en la infancia produce *raquitismo*, una enfermedad que se caracteriza por la calcificación inadecuada del cartílago y del hueso. El raquitismo fue tan corriente en el siglo XVII en Inglaterra que era conocido como

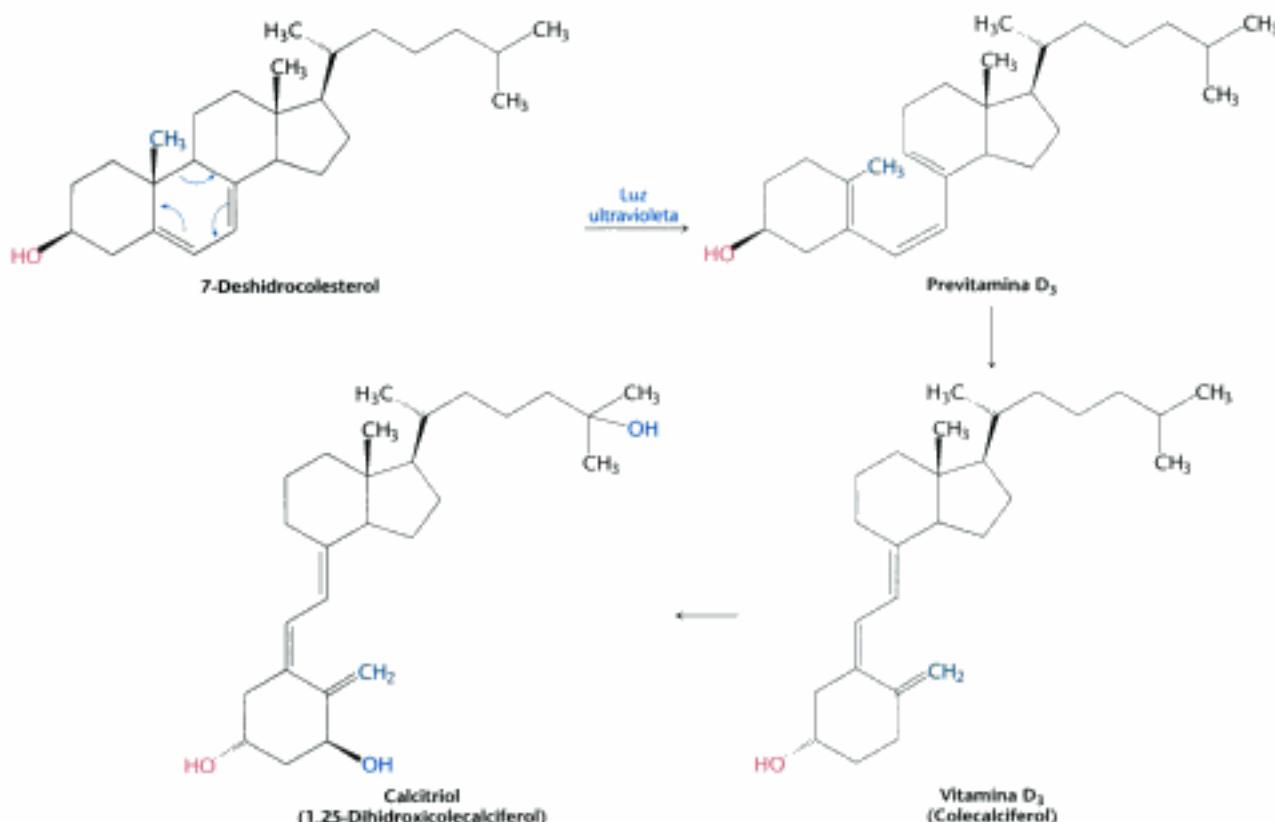


Figura 26.28 Síntesis de la vitamina D. Vía para la conversión del 7-deshidrocolesterol en vitamina D y posteriormente en calcitriol, que es la hormona activa.

Hidden page

controladas de modo riguroso. Además, la actividad de la reductasa está regulada por fosforilación.

Los triacilgliceroles que proceden del intestino se transportan mediante los quilomicrones y se hidrolizan mediante las lipasas que recubren los capilares de los tejidos diana. El colesterol y los otros lípidos que se encuentren en exceso con respecto a las necesidades del hígado se exportan en forma de lipoproteínas de muy baja densidad. Después de entregar su contenido en triacilgliceroles al tejido adiposo y a otros tejidos periféricos, las VLDL se transforman en lipoproteínas de densidad intermedia y más tarde en lipoproteínas de baja densidad. Las IDL y las LDL transportan ésteres de colesterol, principalmente linoleatos. Las células hepáticas y de los tejidos periféricos captan las LDL mediante endocitosis mediada por un receptor. El receptor de LDL, una proteína que atraviesa la membrana plasmática de estas células-diana, se une a las LDL y facilita su entrada en la célula. La ausencia del receptor de LDL, en la forma homoigótica de la hipercolesterolemia familiar, conduce a unas concentraciones de colesterol-LDL en plasma notoriamente elevadas, al depósito de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos y a ataques cardíacos en la niñez. La apolipoproteína B, una proteína muy grande, es un componente estructural clave de quilomicrones, VLDL y LDL. Las lipoproteínas de alta densidad transportan el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado.

26.4 Entre los derivados importantes del colesterol se incluyen las sales biliares y las hormonas esteroideas

Del colesterol derivan, además de las sales biliares que facilitan la digestión de los lípidos, las cinco clases más importantes de hormonas esteroideas: progestágenos, glucocorticoides, mineralcorticoides, andrógenos y estrógenos. Las hidroxilaciones por monooxigenasas P450 que utilizan NADPH y O₂ desempeñan un papel importante en la síntesis a partir del colesterol de las hormonas esteroideas y de las sales biliares. Los enzimas P450, una gran superfamilia, también participan en la destoxicificación de fármacos y otras sustancias extrañas.

La pregnenolona (C₂₁) es un intermediario clave en la síntesis de hormonas esteroideas. Este esteroide se forma por escisión de la cadena lateral del colesterol. La progesterona (C₂₁), sintetizada a partir de pregnenolona, es el precursor del cortisol y de la aldosterona. La hidroxilación y la ruptura de la cadena lateral de la progesterona dan lugar a la androstendiona, un andrógeno (C₁₉). Los estrógenos (C₁₈) se sintetizan a partir de los andrógenos por pérdida de un grupo metilo angular y por la formación de un anillo A aromático. La vitamina D, importante en el control del metabolismo del calcio y del fósforo, se forma a partir de un derivado del colesterol por acción de la luz.

Términos clave

- fosfatidato (p. 733)
- triacilglicerol (p. 733)
- fosfolípido (p. 734)
- citidina difosfodiaciélglycerol (CDP-diaciélglycerol) (p. 734)
- esfingolípido (p. 736)
- ceramida (*N*-acilesfingosina) (p. 736)
- cerebrósido (p. 737)
- gangliósido (p. 738)

- colesterol (p. 739)
- mevalonato (p. 739)
- 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) (p. 739)
- 3-isopentilpirofósfato (p. 740)
- proteína que se une al elemento regulador de esteroides (SREBP) (p. 742)
- partículas de lipoproteína (p. 743)
- lipoproteína de baja densidad (LDL) (p. 744)

- lipoproteína de alta densidad (HDL) (p. 744)
- transporte inverso del colesterol (p. 744)
- endocitosis mediada por receptor (p. 745)
- sales biliares (p. 748)
- hormonas esteroideas (p. 749)
- citocromo P450 monooxigenasa (p. 750)
- pregnenolona (p. 752)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Gimpl, G., Burger, K. y Fahrerholz, F. 2002. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.* 27:595-599.
- Oram, J. F. 2002. Molecular basis of cholesterol homeostasis: Lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol. Med.* 8:168-173.
- Vance, D. E. y Van den Bosch, H. 2000. Cholesterol in the year 2000. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:1-8.
- Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* 251 (5):58-66.
- Endo, A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid. Res.* 33:1569-1582.

Libros

- Vance, D. E. y Vance, J. E. (eds.). 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier.
- Striver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. (eds.). 1995. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (7th ed.). McGraw-Hill.

Fosfolípidos y esfingolípidos

- Hawiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. y Sandhoff, K. 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485:63-99.
- Lykidas, A. y Jackowski, S. 2000. Regulation of mammalian cell membrane biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 65:361-393.
- Carman, G. M. y Zeimeit, G. M. 1996. Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271:13293-13296.
- Henry, S. A. y Patton-Vogt, J. L. 1998. Genetic regulation of phospholipid metabolism: Yeast as a model eukaryote. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61:133-179.
- Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64:315-343.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M. y McIntyre, T. M. 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69:419-445.

Biosíntesis del colesterol y los esteroides

- Hampton, R. Y. 2002. Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:345-378.
- Kelley, R. L. y Herman, G. E. 2001. Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Genom. 2:299-341.*
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.
- Gardner, R., Shan, H., Matsuda, S. P. T. y Hampton, R. Y. 2001. An oxysterol-derived positive signal for 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase degradation in yeast. *J. Biol. Chem.* 276:8681-8694.
- Istvan, E. S. y Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292:1160-1164.
- Ness, G. C. y Chambers, C. M. 2000. Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224:8-19.
- Libby, P., Aikawa, M. y Schonbeck, U. 2000. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:299-309.
- Yokoyama, S. 2000. Release of cellular cholesterol: Molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:231-244.

Cronin, S. R., Khouri, A., Ferry, D. K. y Hampton, R. Y. 2000. Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cdc19/Spi1. *J. Cell Biol.* 148:915-924.

Edwards, P. A., Tabor, D., Kast, H. R. y Venkateswaran, A. 2000. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:103-113.

Istvan, E. S., Palmiter, M., Buchanan, S. K. y Deisenhofer, J. 2000. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: Insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* 19:819-830.

Taberner, L., Bochar, D. A., Rodwell, V. W. y Stauffacher, C. V. 1999. Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7167-7171.

Pass, D., Blacklow, S., Kim, P. S. y Berger, J. M. 1997. Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor module. *Nature* 388:691-693.

Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eick, M. J., Springer, T. A. y Blacklow, S. C. 2001. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat. Struct. Biol.* 8:499-504.

Lipoproteínas y sus receptores

- Jeon, H. y Blacklow, S. C. 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74:535-562.
- Brouillet, C. G., Amantharaman, G. M., Engler, J. A. y Borhani, D. W. 2001. Structural models of human apolipoprotein A-I: A critical analysis and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1531:4-46.
- Hevonen, T., Penttiläinen, M. O., Hyvonen, M. T., Kovanen, P. T. y Ala-Korpela, M. 2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:189-210.
- Silver, D. L., Jiang, X. C., Arai, T., Bruce, C. y Tall, A. R. 2000. Receptors and lipid transfer proteins in HDL metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902:103-111.
- Nimpf, J. y Schneider, W. J. 2000. From cholesterol transport to signal transduction: Low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:287-298.
- Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A. y Brouillet, C. G. 1997. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12291-12296.
- Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. y Agard, D. A. 1991. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252:1817-1822.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalton-Selkä, K., Walsh, A., Verity, J. G., Rubin, E. M. y Breslow, J. L. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353.

Activación del oxígeno y catálisis del P450

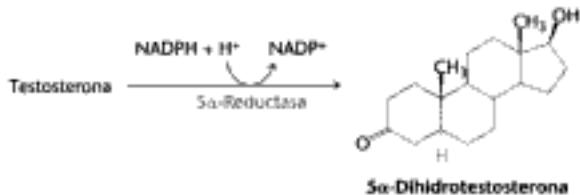
- Williams, P. A., Cosme, J., Vinkovic, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Vorheis, C., Tickle, I. J. y Jhoti, H. 2004. Crystal structure of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 305:683-686.
- Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. y McLellan, R. A. 1999. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: An opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:342-349.
- Nelson, D. R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369:1-10.
- Wong, L. L. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:263-268.

- Denison, M. S. y Whitlock, J. P., 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* 270:18175-18178.
- Poulos, T. L., 1995. Cytochrome P450. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:767-774.
- Vaz, A. D. y Conn, M. J., 1994. On the mechanism of action of cytochrome P450: Evaluation of hydrogen abstraction in oxygen-dependent alcohol oxidation. *Biochemistry* 33:6442-6449.

- Gonzalez, F. J. y Nebert, D. W., 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: Animal-plant "warfare", molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 6:182-186.

Problemas

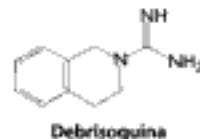
- Producción de grasa.** Escribir una ecuación equilibrada para la síntesis de un triacilglicerol, partiendo de glicerol y ácidos grasos.
- Producción de fosfolípidos.** Escribir una ecuación equilibrada para la síntesis de fosfatidiletanolamina por la vía de *novo*, partiendo de etanolamina, glicerol y ácidos grasos.
- Dadores activados.** ¿Cuál es el reactivo activado en cada una de estas biosíntesis?
 - Fosfatidilinositol a partir de inositol
 - Fosfatidiletanolamina a partir de etanolamina
 - Ceramida a partir de esfingosina
 - Esfingomicolina a partir de ceramida
 - Cerebrósido a partir del ceramida
 - Gangliósido G_{M1} a partir del gangliósido G_{M2}
 - Farnesilpirofosfato a partir de geranilpirofosfato.
- Marcajes reveladores.** ¿Cuál es la distribución del marcaje isotópico en la síntesis de colesterol a partir de cada uno de los siguientes precursores?
 - Mevalonato marcado con ¹⁴C en el átomo de carbono carboxílico
 - Malonil-CoA marcado con ¹⁴C en el átomo de carbono carboxílico.
- Hipercolesterolemia familiar.** Se han identificado varias clases de mutaciones en el receptor de LDL como causas de esta enfermedad. Supóngase que se tienen células de pacientes con distintas mutaciones, un anticuerpo específico para el receptor de LDL que pueda visualizarse con un microscopio electrónico y acceso a un microscopio electrónico. ¿Qué diferencias en la distribución del anticuerpo podrían esperarse encontrar en las células de los distintos pacientes?
- Corrección del RNA.** En el intestino se forma una versión reducida (apo B-48) de la apoproteína B, mientras que la proteína completa (apo B-100) se sintetiza en el hígado. Un codón de glutamina (CAA) se cambia por un codón de parada. Proponer un mecanismo simple para este cambio.
- Inspiración para diseñar fármacos.** Algunas acciones de los andrógenos están mediadas por la dihidrotestosterona, que se forma por reducción de la testosterona. Este paso final está catalizado por una 5 α -reductasa dependiente de NADPH.



Los varones cromosómicamente XY con una deficiencia genética de esta reductasa nacen con el conducto urogenital interno masculino

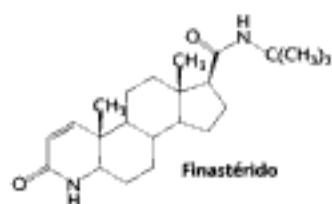
pero con genitales externos predominantemente femeninos. Estas personas normalmente son educadas como niñas. En la pubertad se masculinizan porque se elevan las concentraciones de testosterona. Los testículos de los hombres con esta deficiencia de reductasa son normales, mientras que la próstata permanece pequeña. ¿Cómo se debería emplear esta información para diseñar un fármaco que tratará la *hipertrofia prostática benigna*, una consecuencia común del proceso normal de envejecimiento en el hombre? La mayoría de los hombres mayores de 55 años sufren algún grado de agrandamiento prostático, que a menudo conduce a una obstrucción urinaria.

- Peculiaridades de los fármacos.** La debrisoquina, un agente bloqueante β -adrenérgico, se ha utilizado para tratar la hipertensión. La dosis óptima varía enormemente (de 20 a 400 mg diarios) en una población de pacientes. La orina de la mayoría de los pacientes que han tomado el fármaco contiene una concentración más alta de 4-hidrodebrisoquina. Sin embargo, aquellos más sensibles al fármaco (alrededor del 8% del grupo estudiado) excretan debrisoquina y muy poco de su 4-hidroxiderivado. Proponer una base molecular para esta peculiaridad farmacológica. ¿Por qué se debería ser cauto al dar otros fármacos a los pacientes que sean muy sensibles a la debrisoquina?



- Eliminación de aromas.** Muchas moléculas aromáticas son muy hidrofóbicas y se concentran en el epitelio olfatorio. Podrían dar una señal persistente con independencia de su concentración en el ambiente si no se modificaran con rapidez. Proponer un mecanismo para convertir los aromas hidrofóbicos en derivados solubles en agua que puedan ser eliminados con rapidez.

- Dificultades del desarrollo.** La propecia (finastérido) es un esteroide sintético que actúa como inhibidor competitivo específico de la 5 α -reductasa, el enzima responsable de la síntesis de dihidrotestosterona a partir de testosterona.



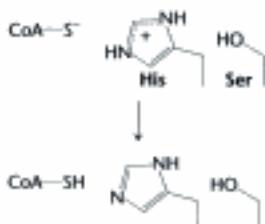
Actualmente se utiliza ampliamente para retrasar la pérdida de pelo habitual del varón. A las mujeres embarazadas se les advierte que eviten manipular este fármaco. ¿Por qué es de tan vital importancia que las mujeres embarazadas eviten el contacto con la propecia?

11. **Consecuencias del estilo de vida.** Los seres humanos y la planta *Arabidopsis* evolucionaron del mismo antepasado distante que poseía un número pequeño de genes del citocromo P450. Los seres humanos tienen aproximadamente 50 de estos genes, mientras que *Arabidopsis* tiene más de 250 de ellos. Proponer un papel para el gran número de isozimas del P450 en las plantas.

12. **Medicina personalizada.** El sistema del citocromo P450 metaboliza muchos fármacos clínicamente útiles. Aunque todos los seres humanos tienen el mismo número de genes de P450, existe un polimorfismo individual que altera la especificidad y eficacia de las proteínas codificadas por los genes. ¿Cómo podría ser clínicamente útil el conocimiento del polimorfismo individual?

Problemas de mecanismos

13. **Un fosfato que interfiere.** Durante la reacción global catalizada por la HMG-CoA reductasa, un residuo de histidina protona a un tiolato del coenzima A, CoAS⁻, generado en un paso previo.

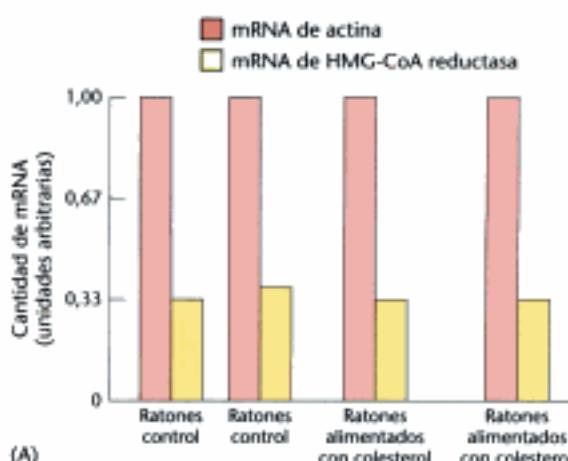


El residuo de serina próximo puede fosforilarse mediante la quinasa dependiente de AMP, lo que provoca una pérdida de actividad. Proponer una explicación del por qué la fosforilación del residuo de serina inhibe la actividad del enzima.

14. **Desmetilación.** Las metilaminas frecuentemente se desmetilan mediante los enzimas de la familia del citocromo P450. Proponer un mecanismo para la formación de metilamina a partir de dimetilamina, catalizada por el citocromo P450. ¿Cuál será el otro producto?

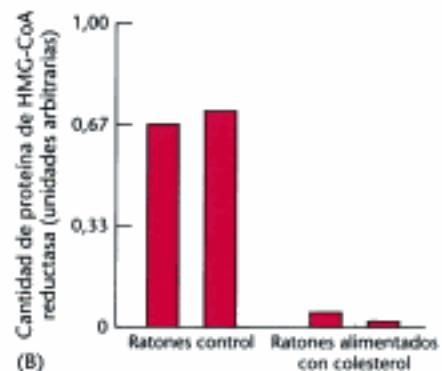
Problema de interpretación de datos e integración del capítulo

15. **Alimentación con colesterol.** Se repartieron unos ratones en cuatro grupos; dos de ellos se alimentaron con una dieta normal y los otros dos con una dieta rica en colesterol. Posteriormente se aislaron de los hígados el mRNA y la proteína de la HMG-CoA reductasa, y se cuantificaron. El gráfico A muestra los resultados del aislamiento del mRNA.



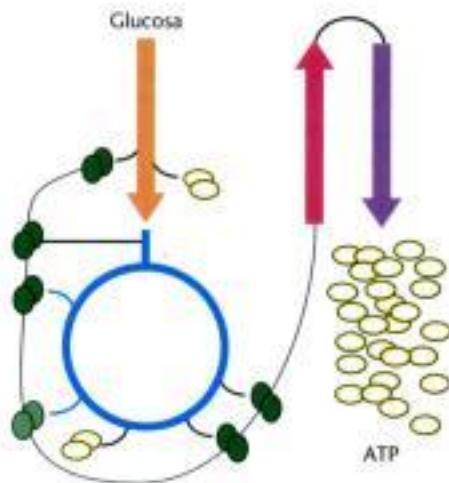
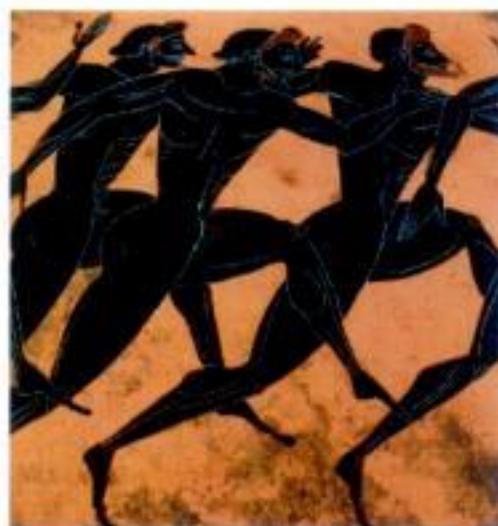
- (a) ¿Cuál es el efecto de la alimentación con colesterol sobre la cantidad de mRNA de HMG-CoA reductasa?
 (b) ¿Cuál es el propósito de aislar también el mRNA para la proteína actina, que no está bajo control del elemento regulador de los esteroles?

La proteína HMG-CoA reductasa se aisló por precipitación con un anticuerpo monoclonal para HMG-CoA reductasa. En el gráfico B se muestra la cantidad de proteína de HMG-CoA reductasa de cada grupo.



- (c) ¿Cuál es el efecto de la dieta de colesterol sobre la cantidad de proteína de HMG-CoA reductasa?
 (d) ¿Por qué este resultado es sorprendente a la luz de los resultados del gráfico A?
 (e) Sugerir una posible explicación para los resultados que se muestran en el gráfico B.

Integración del metabolismo



La imagen de la izquierda muestra un detalle de corredores en una ánfora griega pintada en el siglo VI A. C. Las hazañas del atletismo y otras requieren una elaborada integración metabólica para un asunto tan aparentemente simple como mantener los niveles de glucosa en sangre. El esquema superior representa la oxidación de la glucosa para producir ATP en un proceso que requiere la interrelación de la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Éstas son unas pocas de las muchas vías metabólicas que deben coordinarse para satisfacer las necesidades de la vida. [(Izquierda) Museo Metropolitano de Arte, Rogers Fund, 1914 (14.130.12). Copyright © 1977 por el Museo Metropolitano de Arte].

Contenido

- 27.1 El metabolismo consta de vías metabólicas fuertemente interconectadas
- 27.2 Cada órgano tiene un perfil metabólico característico
- 27.3 La toma de alimento y el ayuno inducen cambios metabólicos
- 27.4 La selección de combustibles durante el ejercicio viene determinada por la intensidad y la duración de la actividad
- 27.5 El etanol altera el metabolismo energético del hígado

Hemos realizado un examen individualizado de la bioquímica de las vías metabólicas, pero en los organismos vivos operan simultáneamente muchas vías. Cada una de ellas debe de ser capaz de percibir la situación de las demás y funcionar óptimamente para satisfacer las necesidades del organismo. ¿Cómo se coordina la intrincada red de reacciones metabólicas? En este capítulo se presentan algunos de los principios en los que se fundamenta la integración del metabolismo en los mamíferos. Comienza con una recapitulación de la estrategia del metabolismo y de los mecanismos frecuentes en su regulación. A continuación se estudian las interrelaciones de diversas vías en términos del flujo de moléculas por tres encrucijadas clave: glucosa 6-fosfato, piruvato y acetil-CoA. Se analizan las diferencias de los perfiles metabólicos del cerebro, músculo, tejido adiposo, riñón e hígado. Y finalmente se estudian cómo las interrelaciones entre estos tejidos se alteran en diversas perturbaciones metabólicas. Estas discusiones ilustrarán cómo el conocimiento bioquímico ilumina el funcionamiento del organismo.

27.1 El metabolismo consta de vías metabólicas fuertemente interconectadas

La estrategia básica del catabolismo es formar ATP, poder reductor y precursores para la biosíntesis. Revisemos brevemente estos temas centrales:

1. *El ATP es la divisa o unidad biológica universal de energía.* El elevado potencial para transferir fosforilos del ATP lo capacita para utilizarse como fuente de energía en la contracción muscular, el transporte activo, la amplificación de señales y la biosíntesis. En la célula, la hidrólisis de una molécula de ATP cambia la relación de equilibrio entre productos y sustancias reaccionantes de una reacción acoplada por un factor de aproximadamente 10^8 . De esta forma, *una secuencia de reacciones termodinámicamente desfavorable puede resultar muy favorable si se acopla a la hidrólisis de un número suficiente de moléculas de ATP*.

2. *El ATP se genera en la combustión de moléculas combustibles como la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos.* El intermediario común en la mayoría de estas oxidaciones es el acetil-CoA. Los átomos de carbono del fragmento acetilo se oxidan por completo a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico con formación simultánea de NADH y FADH_2 . Estos transportadores de electrones ceden sus electrones de elevado potencial a la cadena respiratoria. El subsiguiente flujo de electrones al O_2 origina el bombeo de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 27.1). El gradiente de protones se emplea con posterioridad para sintetizar ATP. La glicolisis también genera ATP, pero la cantidad formada es mucho menor que la producida en la fosforilación oxidativa. La oxidación de glucosa a piruvato genera 2 moléculas de ATP, mientras que si la glucosa se oxida por completo a CO_2 se generan 30 moléculas de ATP.

3. *El NADPH es el principal dador de electrones en las biosíntesis reductoras.* En la mayoría de las biosíntesis los productos están más reducidos que sus precursores y por eso se necesita, además de ATP, poder reductor. Los electrones de elevado potencial que se requieren para dirigir estas reacciones proceden normalmente del NADPH. La vía de las pentosas fosfato suministra la mayor parte del NADPH necesario.

4. *Las biomoléculas se construyen a partir de una serie pequeña de precursores.* La enorme variedad de moléculas de los seres vivos se sintetizan a partir de un número mucho menor de precursores. Las vías metabólicas, que generan ATP y NADH, también proporcionan precursores para la biosíntesis de moléculas complejas. Por ejemplo, el acetil-CoA, el intermediario común en la degradación de la mayoría de combustibles, proporciona fragmentos dicarbonados para un gran número de procesos biosintéticos, tales como la formación de ácidos grasos, prostaglandinas y colesterol. Por consiguiente, *las vías metabólicas centrales tienen el doble papel catabólico y anabólico*.

5. *Las vías biosintéticas y degradativas casi siempre son diferentes.* Así, por ejemplo, la vía de síntesis de ácidos grasos es diferente de la de su degradación. Esta separación posibilita que las vías biosintéticas y degradativas sean termodinámicamente favorables en todo momento. Una vía biosintética se convierte en exergónica si se acopla a la hidrólisis de un número suficiente de moléculas de ATP. La separación de vías biosintéticas y degradativas contribuye en gran medida a la efectividad del control del metabolismo.

En la regulación metabólica se repiten determinados mecanismos recurrentes

El anabolismo y el catabolismo deben coordinarse con precisión. El entramado de vías metabólicas percibe y responde a la información sobre la situación de sus vías componentes. La información puede percibirse y el metabolismo controlarse de diversas maneras.

27.1 Interconexión de las vías metabólicas

"Hay un momento para cada cosa y un tiempo para cada propósito bajo los cielos: un tiempo para nacer y un tiempo para morir; un tiempo para plantar y otro para cosechar lo plantado; un tiempo para matar y un tiempo para sanar; un tiempo para destruir y otro para construir."

ECCLESIASTÉS 3:1-3

Efecto Pasteur

Es la inhibición de la glicolisis por la respiración. Fue descubierta por Louis Pasteur al estudiar la fermentación en las levaduras. El consumo de carbohidratos es unas siete veces menor en condiciones aeróbicas que anaeróbicas. La inhibición de la fosfofructoquinasa por el citrato y el ATP es el principal responsable del efecto Pasteur.

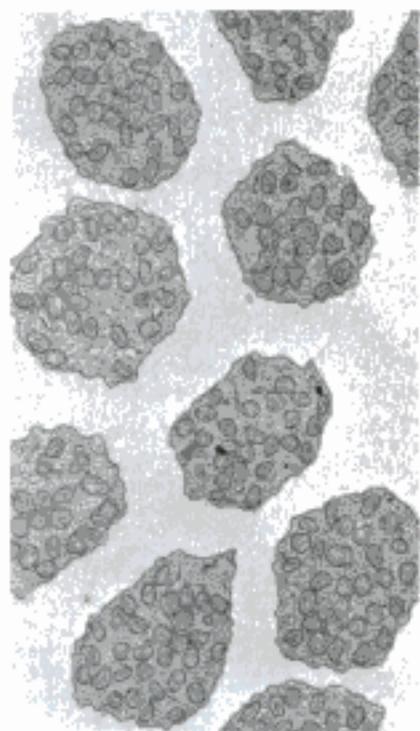


Figura 27.1 Micrografía electrónica de mitocondrias. Numerosas mitocondrias ocupan el segmento interno de los bastones de la retina. Estas células fotorreceptoras generan grandes cantidades de ATP y son muy dependientes del suministro continuo de O_2 . [Cortesía del Dr. Michael Hogan.]

Hidden page

La fosfofructoquinasa, que cataliza la etapa comprometida, es el centro de control más importante de la glicolisis. El ATP es tanto un sustrato en la transferencia del fosforilo catalizada por el enzima como una molécula reguladora de su actividad. Un nivel elevado de ATP inhibe a la fosfofructoquinasa (los centros alostéricos son diferentes de los centros de unión al sustrato y tienen una afinidad menor para el nucleótido). Este efecto inhibidor se estimula mediante el citrato y se revierte mediante AMP (Figura 27.4). Así pues, la velocidad de la glicolisis depende de las necesidades de ATP, indicadas por la relación ATP/AMP, y de la necesidad de precursores para la biosíntesis, indicada por el nivel de citrato. *En el hígado, el regulador más importante de la actividad de la fosfofructoquinasa es la fructosa 2,6-bisfosfato (F-2,6-BP).* Recordemos que el nivel de F-2,6-BP viene determinado por la actividad de la quinasa que lo forma a partir de la fructosa 6-fosfato y de la fosfatasa que hidroliza el grupo fosforilo de la posición 2 (p. 466). Cuando la glucemia es baja, una cascada de reacciones desencadenada por el glucagón conduce a una activación de la fosfatasa y a una inhibición de la quinasa. La disminución resultante del nivel de F-2,6-BP provoca la desactivación de la fosfofructoquinasa y, por tanto, el freno de la glicolisis, permitiendo que la glucosa no oxidada en el hígado se libere a la sangre para su uso por otros tejidos. La piruvato quinasa, que controla el flujo de la glicolisis, también es un centro importante de regulación. Resulta estimulada por la fructosa 1,6-bisfosfato, un producto de la reacción de la PFK, e inhibida por el ATP. En el hígado la cascada del cAMP estimulada por el glucagón fosforila a la piruvato quinasa, disminuyendo la actividad del enzima.

2. *Ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa.* Las reacciones de esta vía común para la oxidación de moléculas combustibles, como los carbohidratos, los aminoácidos y los ácidos grasos, tienen lugar en el interior de la mitocondria. La mayoría de los combustibles entran en el ciclo en forma de acetil-CoA. La oxidación completa de una unidad de acetilo por este ciclo genera una molécula de GTP, tres moléculas de NADH y una de FADH₂. Estos cuatro pares de electrones se transfieren al O₂ a través de la cadena de transporte de electrones, de lo cual resulta un gradiente de protones capaz de dirigir la síntesis de nueve moléculas de ATP. El NADH y el FADH₂ sólo pueden ceder sus electrones si simultáneamente el ADP se fosforila a ATP. *Este estricto acoplamiento, llamado control respiratorio, asegura que la velocidad del ciclo del ácido cítrico se ajuste a las necesidades de ATP.* La abundancia de ATP también disminuye la actividad de dos enzimas del ciclo: *isocitrato deshidrogenasa* y *α-cetoglutarato deshidrogenasa*. El ciclo del ácido cítrico tiene también una función anabólica. En coordinación con la piruvato carboxilasa, el ciclo suministra precursores para la biosíntesis, como el succinil-CoA para la formación de porfirinas y el citrato para la formación de ácidos grasos.

3. *Complejo piruvato deshidrogenasa.* Este complejo enzimático es un centro regulador clave debido a que constituye una conexión irreversible entre la glicolisis y el ciclo del ácido cítrico. El complejo piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión del piruvato en acetil-CoA. *Esta reacción, que tiene lugar dentro de la mitocondria, es una reacción decisiva en el metabolismo: compromete a los átomos de carbono de los carbohidratos y los aminoácidos para su oxidación en el ciclo del ácido cítrico o para la síntesis de lípidos.* El complejo piruvato deshidrogenasa está estrictamente regulado por múltiples interacciones alóstéricas y modificaciones covalentes. El piruvato se convierte rápidamente en acetil-CoA sólo si se necesita ATP o si se requieren los fragmentos dicarbonados para la síntesis de lípidos.

4. *Vía de las pentosas fosfato.* Esta secuencia de reacciones en el citoplasma consta de dos fases. La primera es la descarboxilación oxidativa de la glucosa 6-fosfato y su finalidad es la producción de NADPH para las biosíntesis reductoras y de ribosa 5-fosfato para la síntesis de nucleótidos. En la conversión de glucosa 6-fosfato en ribosa 5-fosfato se generan dos moléculas de NADPH. La etapa comprometida en esta

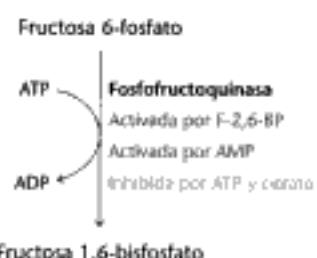


Figura 27.4 Regulación de la glicolisis. La fosfofructoquinasa es el enzima clave en la regulación de la glicolisis.



Figura 27.5 Regulación de la vía de las pentosas fosfato. La deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato es la etapa comprometida en la vía de las pentosas fosfato.

vía es la deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato. Esta reacción está controlada por el nivel de NADP^+ , el acceptor de electrones (Figura 27.5).

La segunda fase de la vía de las pentosas fosfato es el metabolismo reversible, no oxidativo, de azúcares fosforilados de cinco carbonos e intermediarios glicolíticos fosforilados de tres y seis carbonos. De este modo, por la rama no oxidativa se pueden derivar ribosas hacia la glicolisis para su catabolismo o generar ribosas a partir de intermediarios glicolíticos para procesos biosintéticos.

5. *Gluconeogénesis.* La glucosa puede sintetizarse en hígado y riñón a partir de precursores tales como lactato, glicerol y aminoácidos. El principal punto de entrada en esta vía es el piruvato, que se carboxila a oxalacetato en la mitocondria. El oxalacetato se metaboliza luego a fosfoenolpiruvato en el citoplasma. Otras dos características distintivas de la gluconeogénesis son las reacciones hidrolíticas que salvan las etapas irreversibles de la glicolisis. *La gluconeogénesis y la glicolisis están normalmente reguladas de forma recíproca, de modo que una de las dos vías está prácticamente detenida cuando la otra es muy activa.* Por ejemplo, el AMP inhibe y el citrato activa la fructosa 1,6-bisfosfatasa, un enzima clave de la gluconeogénesis, mientras que estas moléculas tienen efectos opuestos sobre la fosfofructoquinasa, controladora de la glicolisis (Figura 27.6). La F-2,6-BP también coordina estos procesos porque inhibe la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Así pues, cuando la glucosa abunda, el nivel elevado de F-2,6-BP activa la glicolisis e inhibe la gluconeogénesis.

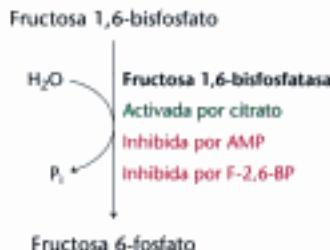


Figura 27.6 Regulación de la gluconeogénesis. La fructosa 1,6-bisfosfatasa es el principal enzima que controla la velocidad de la gluconeogénesis.

6. *Síntesis y degradación del glucógeno.* El glucógeno, un almacén de combustible fácilmente movilizable, es un polímero ramificado de residuos de glucosa (Figura 27.7). En la degradación del glucógeno, una fosforilasa cataliza la escisión del glucógeno por medio del ortofosfato para formar glucosa 1-fosfato, la cual se convierte con rapidez en glucosa 6-fosfato que prosigue su metabolización. En la síntesis de glucógeno, el intermediario activado es la UDP-glucosa, que se forma a partir de glucosa 1-fosfato y UTP. La glucógeno sintasa cataliza la transferencia de la glucosa de la UDP-glucosa al residuo de glucosa terminal del polímero en crecimiento. *La degradación y la síntesis de glucógeno están controladas de forma coordinada por una cascada de amplificación desencadenada por hormonas, de modo que la fosforilasa se activa cuando la sintasa se inactiva y viceversa.* Estos enzimas están regulados por fosforilación y por interacciones alóstéricas no covalentes.

7. *Síntesis y degradación de ácidos grasos.* Los ácidos grasos se sintetizan en el citoplasma mediante la adición de fragmentos dicarbonados a una cadena creciente anclada a una proteína portadora de acilos. El intermediario activo es el malonil-CoA, que se forma por carboxilación del acetil-CoA. Los grupos acetilo son transportados de la mitocondria al citoplasma en forma de citrato mediante la lanzaadera citrato-malato. En el citoplasma, el citrato se escinde generando acetil-CoA. Además, *en el citoplasma el citrato estimula a la acetil-CoA carboxilasa, el en-*

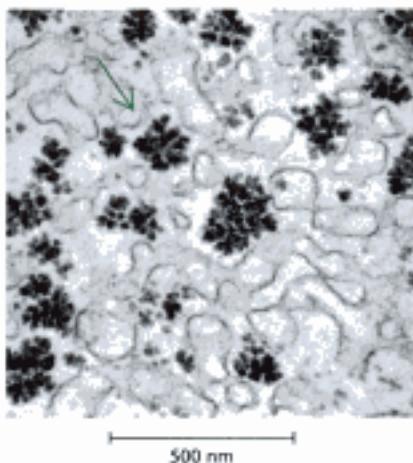


Figura 27.7 Gránulos de glucógeno. Micrografía electrónica de una porción de una célula hepática que contiene partículas de glucógeno. [Cortesía del Dr. George Palade.]

zima que cataliza la etapa comprometida. Así, cuando abundan el ATP y el acetil-CoA, el nivel de citrato aumenta y ello acelera la velocidad de síntesis de ácidos grasos (Figura 27.8).

Los ácidos grasos se degradan siguiendo una vía diferente que discurre en un compartimiento distinto. En efecto, la carnitina transporta los ácidos grasos a la matriz mitocondrial, donde se degradan a acetil-CoA mediante la β -oxidación. Entonces, si el suministro de oxalacetato es suficiente, el acetil-CoA se oxida por el ciclo del ácido cítrico. De otro modo, el acetil-CoA puede generar los cuerpos cetónicos. El FADH₂ y el NADH formados en la β -oxidación transfieren sus electrones al O₂ a través de la cadena de transporte de electrones. Al igual que el ciclo del ácido cítrico, la β -oxidación puede continuar sólo si se regeneran el FAD y NAD⁺. Así pues, la velocidad de la degradación de los ácidos grasos también está acoplada a las necesidades de ATP. El malonil-CoA, precursor activo para la síntesis de ácidos grasos, inhibe la degradación de ácidos grasos al inhibir la formación de acilcarnitina por la carnitina aciltransferasa I y con ello impide la translocación de los ácidos grasos a la mitocondria (Figura 27.9).

La glucosa 6-fosfato, el piruvato y el acetil-CoA son las conexiones clave del metabolismo

Los factores que regulan el flujo de moléculas en el metabolismo se pueden comprender mejor examinando tres moléculas importantes: la glucosa 6-fosfato, el piruvato y el acetil-CoA. Cada una de estas moléculas tiene varios destinos diferentes.

1. *Glucosa 6-fosfato*. La glucosa que entra en la célula se fosforila rápidamente a glucosa 6-fosfato y seguidamente puede almacenarse como glucógeno, degradarse a piruvato o convertirse en ribosa 5-fosfato (Figura 27.10). El glucógeno se forma cuando abundan la glucosa 6-fosfato y el ATP. Por el contrario, cuando se requiere ATP o esqueletos carbonados para la biosíntesis, la glucosa 6-fosfato se degrada por la vía glicolítica. Por tanto, la conversión de glucosa 6-fosfato en piruvato puede ser tanto un proceso anabólico como catabólico. El tercer destino principal de la glucosa 6-fosfato, que es la oxidación a través de la vía de las pentosas fosfato, suministra NADPH para las biosíntesis reductoras y ribosa 5-fosfato para la síntesis de nucleótidos. La glucosa 6-fosfato también se forma cuando el glucógeno se moviliza o bien se sintetiza a partir de piruvato y aminoácidos por la vía gluconeogénica.

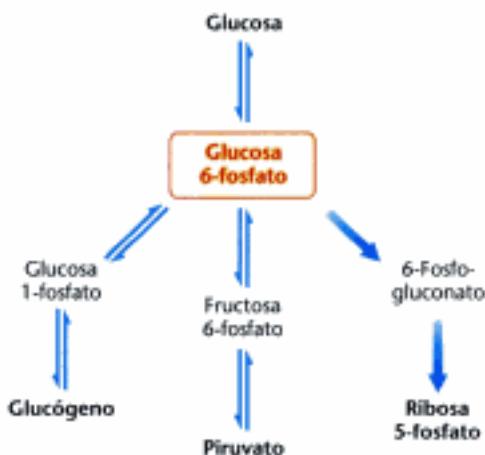


Figura 27.10 Destinos metabólicos de la glucosa 6-fosfato.



Figura 27.8 Regulación de la síntesis de ácidos grasos. La acetil-CoA carboxilasa es el punto clave de control de la síntesis de ácidos grasos.



Figura 27.9 Control de la degradación de ácidos grasos. El malonil-CoA inhibe la degradación de ácidos grasos al inhibir la formación de acilcarnitina.

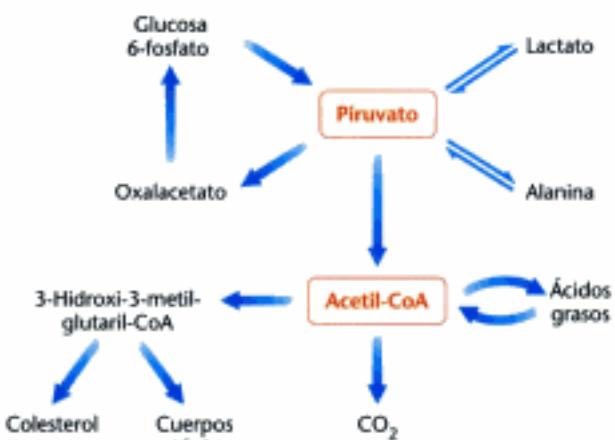


Figura 27.11 Principales destinos metabólicos del piruvato y del acetil-CoA en mamíferos.

2. **Piruvato.** Este α -cetoácido de tres carbonos es otra importante encrucijada metabólica (Figura 27.11). Se produce fundamentalmente a partir de la glucosa 6-fosfato, alanina y lactato, y se puede reducir a lactato por la lactato deshidrogenasa al tiempo que se regenera el NAD^+ . Esta reacción posibilita que la glicólisis proceda transitoriamente en condiciones anaeróbicas en tejidos activos como el músculo en contracción. La esencia de esta interconversión es ahorrar tiempo y trasladar una parte de la carga metabólica del músculo activo a otros tejidos. La transaminación del piruvato, un α -cetoácido, a alanina, un aminoácido, es otra reacción fácilmente reversible en el citoplasma. Recíprocamente, varios aminoácidos pueden convertirse en piruvato. Por tanto, *la transaminación es la principal conexión entre el metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos*.

Un tercer destino del piruvato es su carboxilación a oxalacetato dentro de la mitocondria. Ésta es la primera etapa de la gluconeogénesis. Esta reacción y la siguiente conversión del oxalacetato en fosfoenolpiruvato evitan una reacción irreversible de la glicólisis y posibilitan que se forme glucosa a partir de piruvato. La carboxilación del piruvato es también importante para reponer los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. El acetil-CoA activa la piruvato carboxilasa, aumentando la síntesis de oxalacetato cuando se frena el ciclo del ácido cítrico por la escasez de este intermediario. Un cuarto destino del piruvato es su descarboxilación oxidativa a acetil-CoA como se ha descrito en la página 763.

3. **Acetil-CoA.** La descarboxilación oxidativa del piruvato y la β -oxidación de los ácidos grasos son las principales fuentes celulares de esta unidad activa de dos carbonos (Figura 27.11). El acetil-CoA también se puede obtener a partir de aminoácidos cetogénicos. El destino del acetil-CoA es bastante restringido. La unidad acetilo puede oxidarse por completo a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico. Alternativamente, se puede formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a partir de tres moléculas de acetil-CoA. Este compuesto de seis carbonos es un precursor del colesterol y de los *cuerpos cetónicos*, que son formas de transporte de unidades de acetilo secretadas por el hígado para su empleo en tejidos periféricos. Un tercer destino del acetil-CoA es su exportación al citoplasma en forma de citrato para la síntesis de ácidos grasos.

27.2 Cada órgano tiene un perfil metabólico característico

Las pautas metabólicas de cerebro, músculo, tejido adiposo, riñón e hígado son profundamente distintas. Consideremos cómo se diferencian estos órganos en el empleo de los combustibles para satisfacer sus necesidades energéticas.

1. Cerebro. La glucosa es prácticamente el único combustible utilizado por el cerebro humano, excepto durante el ayuno prolongado. El cerebro carece de almacenes de combustible y, por tanto, requiere un suministro continuo de glucosa. Consumo unos 120 g de glucosa al día, lo que corresponde a un aporte energético de unos 1760 kJ (420 kcal) y representa el 60% de la glucosa consumida por el organismo completo en estado de reposo. La mayor parte de esta energía, alrededor del 60–70%, se consume en los mecanismos de transporte que mantienen el potencial Na^+/K^+ de membrana requerido para la transmisión de los impulsos nerviosos. El cerebro también debe sintetizar neurotransmisores y sus receptores para propagar esos impulsos nerviosos. El metabolismo de la glucosa no parece variar con la actividad mental, aunque se ha detectado una actividad metabólica local superior cuando un individuo desarrolla ciertas tareas.

La glucosa entra a las células del cerebro mediante el transportador de glucosa GLUT3. Este transportador tiene un valor bajo de K_M para la glucosa (1,6 mM), lo que significa que está saturado en la mayoría de las situaciones. De este modo el cerebro normalmente dispone de un suministro continuo de glucosa. Las medidas no invasivas de resonancia magnética nuclear con ^{13}C han demostrado que la concentración de glucosa en el cerebro es aproximadamente 1 mM cuando el nivel plasmático es 4,7 mM (84,7 mg/dl), un valor normal. La glicolisis se frena cuando el nivel de glucosa se aproxima al valor de la K_M de la hexoquinasa (~50 μM), el enzima que atrapa la glucosa dentro de la célula (p. 435). Este peligroso momento se alcanza cuando el nivel de glucosa en sangre desciende hasta 2,2 mM (39,6 mg/dl) y se approxima al valor de la K_M del GLUT3.

Los ácidos grasos no sirven como combustible para el cerebro ya que al circular en el plasma unidos a la albúmina no atraviesan la barrera hematoencefálica. En el ayuno, los cuerpos cetónicos generados por el hígado reemplazan parcialmente a la glucosa como combustible cerebral.

2. Músculo. Los principales combustibles del músculo son la glucosa, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos. Para el músculo en reposo, el combustible principal son los ácidos grasos que cubren el 85% de sus necesidades energéticas. El músculo difiere del cerebro en que posee un gran almacén de glucógeno (5000 kJ o 1200 kcal). De hecho, en el músculo se almacenan las tres cuartas partes del glucógeno del organismo (Tabla 27.1). El glucógeno es fácilmente convertible en glucosa 6-fosfato para su empleo por las propias células musculares. El músculo, al igual que el cerebro, carece de glucosa 6-fosfatasa y no puede liberar glucosa a la sangre. Más bien, el músculo retiene glucosa, su combustible preferido durante los estallidos de actividad.

En el músculo esquelético en contracción activa, la velocidad de la glicolisis excede con mucho a la del ciclo del ácido cítrico. Una gran parte del piruvato formado en estas condiciones se reduce a lactato, que fluye al hígado donde se convierte en glucosa (Figura 27.12). Estos intercambios, conocidos como ciclo de Cori (p. 468), trasladan una parte de la carga metabólica del músculo al hígado. Además, en el músculo activo se forma gran cantidad de alanina por transaminación del piruvato. La alanina como el lactato también se convierte en glucosa en el hígado. ¿Por qué el músculo libera alanina? El músculo puede absorber y transaminar aminoácidos de cadena ramificada para utilizar sus esqueletos carbonados como combustible. Sin embargo, no puede formar urea. Por tanto, el nitrógeno se libera a la sangre en forma de alanina. El hígado absorbe la alanina, convierte su nitrógeno en urea y el piruvato lo transforma en glucosa o ácidos grasos.

TABLA 27.1 Reservas de combustibles en un individuo de 70 kg

Órgano	ENERGÍA DISPONIBLE EN KILOJUICOS (kcal)		
	Glucosa o glucógeno	Triacilgliceroles	Proteínas movilizables
Sangre	250 (60)	200 (45)	0 (0)
Hígado	1700 (400)	2000 (450)	1700 (400)
Cerebro	30 (8)	0 (0)	0 (0)
Músculo	5000 (1200)	2000 (450)	100 000 (24 000)
Tejido adiposo	330 (80)	560 000 (135 000)	170 (40)

Referencia: G. F. Cahill, Jr. Clin. Endocrinol. Metab. 5 (1976):398.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

al azúcar lo que hace al enzima más sensible a la acción de una fosfatasa que la convierte en fosforilasa *b*, una forma del enzima que no degrada glucógeno con facilidad. De este modo, *la glucosa cambia alóstéricamente el modo de operar del sistema del glucógeno, que pasa de degradativo a biosintético*.

El elevado nivel de insulina en el estado de buena nutrición también promueve *la entrada de glucosa a las células musculares y adiposas*. La insulina estimula la síntesis de glucógeno también en el músculo como en el hígado. La entrada de glucosa al tejido adiposo suministra glicerol 3-fosfato para la síntesis de triacilgliceroles. La acción de la insulina también alcanza el metabolismo de aminoácidos y proteínas. Promueve la captura de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) por el músculo. De hecho, la insulina ejerce un efecto estimulante general sobre la síntesis de proteínas que favorece la síntesis de proteína muscular. Además, inhibe la degradación intracelular de proteínas.

2. Ayuno de corta duración o estado postabsortivo. Algunas horas después de la cena, el nivel de glucosa en sangre comienza a descender y con ello la secreción de insulina. Sin embargo, *como respuesta al bajo nivel de glucosa en el ayuno*, las células *α* del páncreas secretan glucagón. Del mismo modo que la insulina es un marcador del estado bien alimentado, el glucagón señala el estado de ayuno. El glucagón sirve para movilizar el almacén de glucógeno ante la carencia de ingestión de azúcar. *El principal órgano diana del glucagón es el hígado*. El glucagón estimula la degradación del glucógeno e inhibe su síntesis al desencadenar una cascada de fosforilaciones mediada por cAMP que conduce a la activación de la fosforilasa e inactivación de la glucógeno sintasa (Sección 21.5). El glucagón también inhibe la síntesis de ácidos grasos, reduciendo la producción de piruvato y la actividad de la acetil-CoA carboxilasa al mantenerla desfosforilada. Además, el glucagón estimula la gluconeogénesis hepática y frena la glicólisis porque hace descender el nivel de F-2,6-BP.

Todas las acciones conocidas del glucagón están mediadas por proteína quinasas activadas por cAMP. La activación de la cascada del cAMP conduce a una activación de la fosforilasa *a* y a una desactivación de la sintasa *a*. El efecto del glucagón sobre esta cascada se ve reforzado por una menor unión de glucosa a la fosforilasa *a*, que hace que el enzima sea poco sensible a la acción hidrolítica de la fosfatasa. En su lugar, la fosfatasa permanece unida a la fosforilasa *a* con lo que la sintasa sigue fosforilada y, por tanto, inactiva. En consecuencia, se produce una rápida movilización de glucógeno.

La gran cantidad de glucosa que proviene de la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato derivada del glucógeno fluye del hígado a la sangre. Como el nivel de insulina es bajo, la entrada de glucosa a las células musculares y adiposas también lo es. Esta baja utilización de glucosa por el músculo y tejido adiposo también contribuye al mantenimiento de la glucemia. El resultado neto de todas estas acciones del glucagón es *estimular fuertemente la liberación de glucosa por el hígado*. El músculo y el hígado son capaces de utilizar ácidos grasos como combustibles cuando desciende la glucemia. Así pues, *el nivel de glucosa en sangre se mantiene por encima de la concentración 4,4 M (80 mg/dl) por efecto de estos tres factores principales: (1) la movilización de glucógeno y la liberación de glucosa en el hígado, (2) la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo y (3) el cambio de combustible utilizado por el músculo e hígado, que sustituyen a la glucosa por los ácidos grasos*.

¿Qué consecuencias tiene la depleción del almacén de glucógeno en el hígado? Continúa la gluconeogénesis desde lactato y alanina, pero este proceso únicamente reemplaza la glucosa que se ha convertido en lactato y alanina en tejidos periféricos. El cerebro, además, oxida por completo la glucosa a CO_2 y H_2O . Por tanto, para que se produzca una síntesis neta de glucosa es necesaria otra fuente de carbono. Algunos de los carbonos provienen del glicerol liberado en la lipólisis de tejido adiposo y el resto de la hidrólisis de las proteínas musculares.

3. Realimentación. ¿Qué respuestas bioquímicas se observan en un desayuno copioso? La grasa se metaboliza exactamente igual a como lo hace en el estado bien alimentado. Pero no sucede lo mismo con la glucosa. Inicialmente, el hígado no absorbe la glucosa sanguínea, sino que la reserva para los tejidos periféricos. Es más, el hígado permanece en un estado gluconeogénico. La glucosa de nueva formación es, sin embargo, utilizada para llenar el almacén de glucógeno del hígado. A medida que continúa aumentando el nivel de glucosa en sangre, el hígado termina de llenar el almacén de glucógeno y comienza a procesar el excedente de glucosa para convertirlo en ácidos grasos.

Las adaptaciones metabólicas al ayuno prolongado reducen al mínimo la degradación de proteínas



¿Cuáles son las adaptaciones bioquímicas si el ayuno se prolonga hasta la inanición? Un individuo típico de 70 kg, bien nutrido, tiene una reserva total de combustibles de 670 000 kJ (161 000 kcal, Tabla 27.1). La energía que se necesita en un periodo de 24 horas oscila entre 6700 kJ (1600 kcal) en estado basal y 25 000 kJ (6000 kcal) en actividad muy intensa. Por tanto, los combustibles almacenados serían suficientes para cubrir las necesidades calóricas durante un ayuno de uno a tres meses. Sin embargo, las reservas de carbohidratos se agotan en un solo día.

Incluso en estas condiciones, el nivel de glucosa en sangre debe mantenerse por encima de 2,2 mM (40 mg/dl). *La primera prioridad del metabolismo en el ayuno es suministrar suficiente cantidad de glucosa al cerebro y a otros tejidos (por ejemplo, los glóbulos rojos) que son totalmente dependientes de este combustible.* Sin embargo, los precursores de la glucosa no son muy abundantes. La mayor parte de la energía está almacenada en los ácidos grasos de los triacilgliceroles. Recordemos que los ácidos grasos no pueden convertirse en glucosa porque el acetil-CoA no puede transformarse en piruvato (p. 634). El glicerol de los triacilgliceroles sí puede convertirse en glucosa, pero la disponibilidad de este compuesto es limitada. La única fuente de glucosa disponible son los aminoácidos derivados de la degradación de las proteínas. Sin embargo, las proteínas no se almacenan por lo que su degradación llevaría implícita una pérdida de funciones. Así pues, *la segunda prioridad del metabolismo en el ayuno es preservar las proteínas. Esto se consigue cambiando el combustible utilizado, de glucosa a ácidos grasos y cuerpos cetónicos* (Figura 27.16).

Los cambios metabólicos durante el primer día de inanición son similares a los que se producen después del ayuno nocturno. El bajo nivel de azúcar en sangre hace decrecer la secreción de insulina e incrementa la secreción de glucagón. *Los procesos metabólicos dominantes son la movilización de triacilgliceroles del tejido adiposo y la gluconeogénesis del hígado. El hígado obtiene la energía para sus propias necesidades mediante la oxidación de los ácidos grasos liberados en el tejido adiposo.* En consecuencia, aumentan los niveles de acetil-CoA y citrato, lo que desconecta la glicolisis. La captación de glucosa por el músculo desciende notablemente debido al bajo nivel de insulina, mientras que los ácidos grasos acceden al músculo libremente. En consecuencia, *también el músculo cambia de combustible y oxida ácidos grasos en lugar de glucosa.* La β-oxidación de ácidos grasos en el músculo detiene la conversión de piruvato en acetil-CoA porque el acetil-CoA estimula la fosforilación del complejo piruvato deshidrogenasa, que se vuelve inactivo (p. 490). Así pues, el hígado importa piruvato, lactato y alanina para su conversión en glucosa. El glicerol procedente de la degradación de triacilgliceroles es otra materia prima para la síntesis hepática de glucosa.

La proteólisis también suministra esqueletos carbonados para la gluconeogénesis. Durante la inanición, las proteínas que se degradan no se resintetizan y sirven como fuentes de carbono para la formación de glucosa. Se degradan en primer lugar las proteínas que tienen un recambio rápido; por ejemplo, las proteínas del epitelio intestinal y de las secreciones pancreáticas. La proteólisis de proteínas musculares genera algunos precursores tricarbonados de glucosa. Sin embargo, la supervivencia para la mayoría de los animales depende de que pueda moverse con rapidez, lo que requiere una gran masa muscular. Por tanto, la pérdida de masa muscular debe reducirse al mínimo.

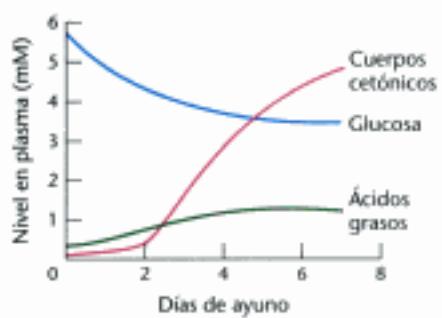


Figura 27.16 Elección de combustible durante el ayuno. Los niveles plasmáticos de ácidos grasos y cuerpos cetónicos aumentan en el ayuno prolongado, mientras que los niveles de glucosa disminuyen.

TABLA 27.2 Metabolismo de combustibles en la inanición

Intercambios y consumo de combustibles	CANTIDAD FORMADA O CONSUMIDA EN 24 HORAS (GRAMOS)	
	Día 3	Día 40
Uso de combustible por el cerebro		
Glucosa	100	40
Cuerpos cetónicos	50	100
Todos los demás usos de glucosa	50	40
Movilización de combustible		
Lipólisis en el tejido adiposo	180	180
Degradoación de proteína muscular	75	20
Salida de combustible del hígado		
Glucosa	150	80
Cuerpos cetónicos	150	150

¿Cómo se restringe la pérdida de proteína muscular? Tras unos tres días de inanición, en el hígado se fabrican grandes cantidades de acetacetato y D-3-hidroxibutirato (cuerpos cetónicos) (Figura 27.17). Su síntesis a partir de unidades de acetilo aumenta notablemente porque el ciclo del ácido cítrico es incapaz de oxidar todo el acetil-CoA generado por la oxidación de los ácidos grasos. La activa gluconeogénesis depleciona el nivel de oxalacetato, molécula que es esencial para la entrada de acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico. En consecuencia el hígado fabrica gran cantidad de cuerpos cetónicos que se liberan a la sangre. En ese momento, *el cerebro empieza a consumir cantidades apreciables de acetacetato en lugar de glucosa*. Después de tres días de ayuno, aproximadamente un tercio de las necesidades energéticas del cerebro se satisfacen mediante los cuerpos cetónicos (Tabla 27.2), que el corazón también usa como combustible.

Al cabo de varias semanas de inanición, los cuerpos cetónicos se convierten en el principal combustible para el cerebro. El acetacetato es activado por la transferencia del CoA desde el succinil-CoA para formar acetacetil-CoA (Figura 27.18). Su escisión por una tiolasa genera dos moléculas de acetil-CoA que entran al ciclo del ácido cítrico. En esencia, *los cuerpos cetónicos son equivalentes de ácidos grasos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica*. El cerebro sólo necesita 40 g de glucosa por día, a diferencia de los 120 g que necesitaba el primer día de ayuno. La eficaz transformación de ácidos grasos en cuerpos cetónicos realizada por el hígado y su uso por el cerebro disminuye ostensiblemente el requerimiento de glucosa. Así pues, se degrada menos tejido muscular que en los primeros días de ayuno. La destrucción de 20 g de músculo en lugar de los 75 g que se destruyen en los primeros días de ayuno es fundamental para la supervivencia. La supervivencia de una persona en inanición viene determinada por la cantidad de grasa almacenada.

¿Qué sucede cuando se acaba el almacén de triacilgliceroles? La única fuente de combustible de que se dispone son las proteínas. La degradación de proteínas se acelera e, inevitablemente, el individuo muere debido a la pérdida de la funcionalidad del corazón, hígado o riñón.

Los desajustes metabólicos en la diabetes derivan de una relativa deficiencia de insulina y exceso de glucagón

Revisemos ahora la *diabetes mellitus*, una enfermedad compleja caracterizada por un patrón anómalo en el empleo de combustibles: *la glucosa se produce en exceso por el hígado y se utiliza deficientemente por los otros órganos*. La diabetes mellitus (citada abreviadamente como diabetes) afecta aproximadamente al 5% de la población. De hecho, la diabetes es la enfermedad metabólica grave más frecuente en el mundo; afecta a centenares de millones de personas. *La diabetes tipo 1, o diabetes dependiente de insulina* (IDDM, "insulin-dependent diabetes mellitus"), se debe a una destrucción autoinmune de las células β-secretoras de insulina del páncreas y normalmente se manifiesta antes de los 20 años. El término dependiente de insulina significa que el individuo requiere insulina para vivir. Sin embargo, la ma-

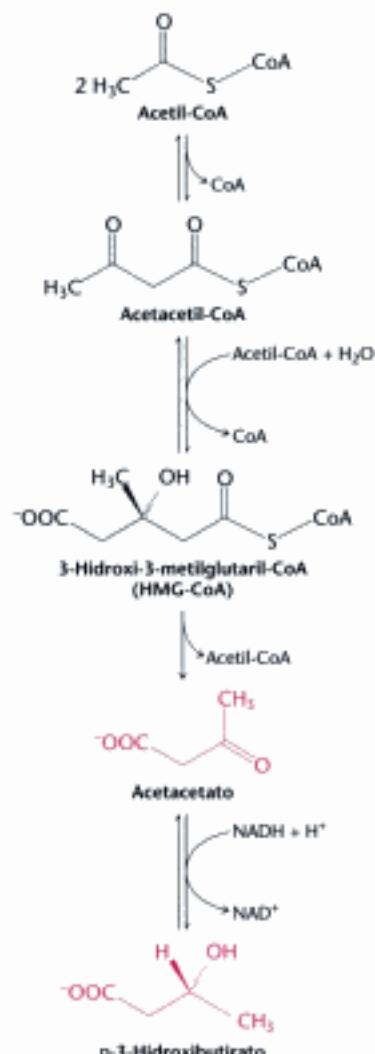


Figura 27.17 Síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado.

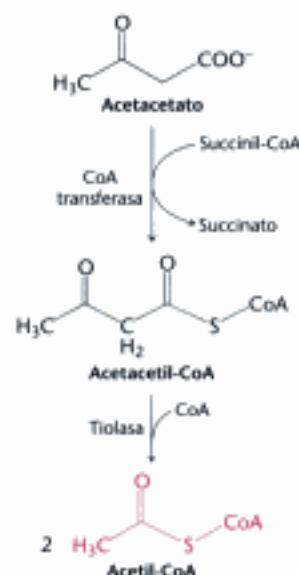


Figura 27.18 Entrada de cuerpos cetónicos en el ciclo del ácido cítrico.

Diabetes

Llamada así por la excesiva producción de orina. Aretaeus, un médico de Capadocia del siglo II a.C. escribió: "el epíteto diabetes ha sido asignado a una anomalía que viene a ser como el paso de agua por un silón". Intuitivamente caracterizó la diabetes como "una desintegración de la carne y los intestinos en la orina".

Mellitus

Palabra derivada del latín que significa "endulzado con miel". Se refiere a la presencia de azúcar en la orina de los pacientes que sufren esta enfermedad. La palabra mellitus diferencia esta enfermedad de la diabetes insípida, que es debida a una insuficiencia en la reabsorción renal de agua.

La mayoría de las personas diabéticas tienen un nivel de insulina en sangre normal o incluso superior al normal, pero responden defectuosamente a la hormona. Esta forma de la enfermedad se conoce como *diabetes tipo 2 o diabetes mellitus no dependiente de insulina* (NIDDM, "non-insulin-dependent diabetes mellitus") y se manifiesta en fases más tardías de la vida que la forma insulino-dependiente.

En la diabetes tipo 1, hay ausencia de insulina en la sangre y el nivel de glucagón es superior al normal. Se puede decir que la persona diabética permanece en un estado de ayuno bioquímico a pesar de que abunde la glucosa sanguínea. A causa de la deficiencia de insulina se desajusta la entrada de glucosa a las células del músculo y del tejido adiposo. El hígado adopta permanentemente un estado gluconeogénico y cetogénico. El relativo exceso de glucagón con respecto a la insulina conduce a una disminución del nivel de F-2,6-BP en el hígado. En consecuencia, la glicolisis se inhibe y se activa la gluconeogénesis debido a los efectos opuestos de la F-2,6-BP sobre la fosfofructoquinasa y la fructosa 1,6-bisfotatasa (Sección 16.4 y Figuras 27.4 y 27.6). La elevada relación glucagón/insulina de la diabetes también induce la degradación del glucógeno. Por tanto, *en el hígado se produce una cantidad excesiva de glucosa que se libera a la sangre*. Cuando la concentración de glucosa en sangre supera la capacidad de reabsorción de los túbulos renales, la glucosa se excreta en la orina (de ahí el nombre de *mellitus*). El agua acompaña a la glucosa excretada, de modo que el diabético no tratado en la fase aguda de la enfermedad padece hambre y sed.

La deficiente utilización de los carbohidratos en ausencia de insulina origina una liberación incontrolada de grasas y proteínas. Se producen grandes cantidades de acetil-CoA por la β-oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, gran parte del acetil-CoA no puede entrar en el ciclo del ácido cítrico porque escasea el oxalacetato para la etapa de condensación. Recordemos que en los mamíferos se puede sintetizar oxalacetato a partir de piruvato, un producto de la glicolisis, pero no a partir de acetil-CoA, el cual se transforma en cuerpos cetónicos. Una característica llamativa de la diabetes es el cambio en la utilización de combustibles, de los carbohidratos a las grasas. La glucosa, más abundante que nunca, se rechaza. A concentraciones elevadas, los cuerpos cetónicos desbordan la capacidad renal para mantener el equilibrio ácido-base. Un paciente diabético no tratado puede entrar en coma por descenso del pH sanguíneo y por deshidratación.

La diabetes tipo 2, no dependiente de insulina, es responsable de más del 90% de los casos de diabetes en el mundo. En los Estados Unidos es la causa responsable de ceguera, fallos renales y amputaciones. La característica de la diabetes del tipo 2 es la resistencia a la insulina. Las células β del páncreas secretan cantidades de insulina normales o aun mayores que las normales, pero los tejidos no responden a la hormona, a pesar de que los receptores de insulina son funcionales. A veces las células β fallan, ocasionando una diabetes tipo 1. La causa exacta de la diabetes tipo 2 permanece desconocida; la obesidad es un factor significativo de predisposición a ella.

La homeostasis calórica es una forma de regular el peso corporal



En los Estados Unidos la obesidad se ha convertido en una epidemia que afecta a casi un 30% de las personas adultas. La obesidad se considera un factor de riesgo para muchas patologías incluyendo la diabetes mellitus, la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. En la mayoría de los casos, la causa de la obesidad es más bien simple: se ingieren más alimentos que los necesarios y las calorías sobrantes se almacenan como grasa.

Aunque la causa última de la obesidad es simple, los medios bioquímicos a través de los cuales se controla el apetito y la homeostasis calórica son extraordinariamente complejos. Destacan entre ellos dos moléculas señal importantes: la insulina y la leptina. La leptina, una proteína de 146 aminoácidos, es una hormona secretada por las células adiposas en una cantidad que es directamente proporcional a la cantidad de grasa que acumulan. La leptina actúa en el hipotálamo generando señales de saciedad a través de un receptor de membrana con estructura y mecanismo de acción similares al receptor de la hormona de crecimiento. En los períodos en que se gasta más energía que la que se ingiere (el ayuno), el tejido adiposo pierde masa. En estas condiciones, desciende la secreción de insulina y de leptina, aumenta la utilización de combustibles y se recurre al empleo de los almacenes de energía. Lo contrario sucede cuando se consumen calorías en exceso.

La importancia de la leptina en la obesidad ha sido firmemente demostrada en ratones. Aquellos que carecen de leptina son obesos, pero si se les administra leptina pierden peso. Los ratones que carecen del receptor de leptina no responden a la administración de esta hormona. En el hombre hay evidencias preliminares que indican que la leptina y su receptor desempeñan un papel en la obesidad, pero los resultados no son tan evidentes como en el ratón. Como se ha establecido antes, la obesidad es un factor que predispone a la diabetes tipo 2. ¿Cuál es la base bioquímica para esta relación? Aunque aun no se ha averiguado mucho, las investigaciones recientes sugieren que los adipositos secretan una hormona llamada *resistina* (*resistencia a la insulina*) que convierte a los tejidos en insensibles a la insulina. Aun más, la cantidad de resistina secretada es directamente proporcional a la masa de grasa. El papel fisiológico preciso de esta hormona aún está por determinar.

La insulina y la leptina se pueden considerar como reguladores a largo plazo de la homeostasis calórica, pero hay hormonas de corta duración que también tienen un papel en este control. Por ejemplo, la *colecoquinina* se libera en el tubo digestivo durante las comidas y se une a receptores específicos del cerebro, promoviendo la sensación de estar lleno. Por otro lado, el péptido gástrico *guerlina*, estimulador del apetito, se secreta cuando el estómago está vacío. La compleja interrelación de genes y sus productos del sistema neuroendocrino para controlar la homeostasis calórica será una sugerativa área de investigación en un futuro próximo.

27.4 La selección de combustibles durante el ejercicio viene determinada por la intensidad y la duración de la actividad

Los combustibles que se utilizan en los ejercicios anaeróbicos (por ejemplo, una carrera de velocidad) son diferentes de los usados en los ejercicios aeróbicos (como una carrera de larga distancia). La selección de combustibles durante la práctica de diferentes formas de ejercicio ilustra algunas facetas importantes de la generación de energía y de la integración del metabolismo. El ATP proporciona energía directa a la miosina, la proteína responsable inmediata de convertir la energía química en movimiento (Capítulo 34). Sin embargo, la cantidad de ATP del músculo es pequeña. Por tanto, la producción de energía y a su vez la velocidad de carrera depende del ritmo de obtención de ATP a partir de otros combustibles. Como se muestra en la Tabla 27.3, la *creatina fosfato* (fosfocreatina) puede transferir un grupo fosforilo de elevado potencial al ADP para generar ATP (p. 416). Pero también la cantidad de creatina fosfato, como sucede con el propio ATP, es limitada. De hecho, la creatina fosfato y el ATP pueden proporcionar energía para una contracción muscular intensa durante 5 ó 6 segundos solamente. En un sprint, por tanto, la velocidad máxima sólo se puede mantener esos 5 ó 6 segundos (Figura 15.7). El ganador de una carrera de 100 metros será el corredor que tarda más en reducir su velocidad.

TABLA 27.3 Fuentes de combustible para la contracción muscular

Fuente de combustible	Velocidad máxima de producción de ATP (mmol s ⁻¹)	Total disponible de ~P (mmol)
ATP muscular		223
Creatina fosfato	73,3	446
Conversión del glucógeno muscular en lactato	39,1	6700
Conversión del glucógeno muscular en CO ₂	16,7	84 000
Conversión del glucógeno hepático en CO ₂	6,2	19 000
Conversión de los ácidos grasos del tejido adiposo en CO ₂	6,7	4 000 000

Nota: El combustible almacenado se ha calculado para una persona de 70 kg con una masa muscular de 28 kg. Referencia: E. Hultman y R. C. Harris. En *Principles of Exercise Biochemistry*]. R. Poortmans (Ed) (Karger, 2004) págs. 78-119.

Hidden page

Los ácidos grasos entran con facilidad en el músculo donde se degradan por la β -oxidación a acetil-CoA y luego a CO_2 . El elevado nivel de acetil-CoA desciende la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa lo que bloquea la conversión del piruvato en acetil-CoA. De este modo la oxidación de ácidos grasos reduce la combustión de azúcares por el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Se ahorra glucosa para que permanezca el nivel mínimo necesario al final del maratón. El empleo simultáneo de ambos combustibles va a permitir una velocidad media mayor que la que se alcanzaría si el glucógeno se hubiera consumido por completo antes de comenzar a oxidar los ácidos grasos.

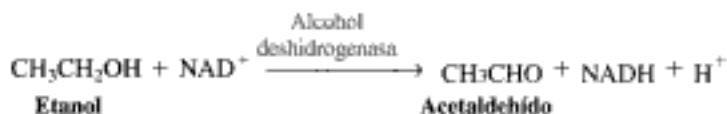
27.5 El etanol altera el metabolismo energético del hígado



 El etanol ha formado parte de la dieta humana durante siglos. Sin embargo, su consumo excesivo puede producir problemas sanitarios muy variados, principalmente el daño hepático. ¿Cuál es la base bioquímica de estos problemas de salud?

El metabolismo del etanol origina un exceso de NADH

El etanol no puede excretarse como tal y debe metabolizarse, lo que sucede principalmente en el hígado. El etanol se metaboliza por dos vías. La primera vía comprende dos etapas: la primera tiene lugar en el citoplasma y está catalizada por la *alcohol deshidrogenasa*:



La segunda es mitocondrial y está catalizada por la *aldehído deshidrogenasa*:

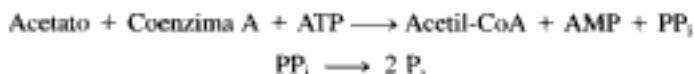


En consecuencia, el consumo de etanol conduce a una acumulación de NADH. Un elevado nivel de NADH inhibe la gluconeogénesis al impedir la oxidación del lactato a piruvato. De hecho, una concentración de NADH elevada hace que la reacción dominante sea la inversa, lo que acentúa la acumulación de lactato. Las consecuencias pueden ser hipoglucemia y acidosis láctica.

El exceso de NADH también inhibe la oxidación de los ácidos grasos. El objetivo de la oxidación de ácidos grasos es obtener NADH para que éste proporcione ATP mediante la fosforilación oxidativa, pero en un consumidor de alcohol las necesidades de NADH se satisfacen al metabolizar etanol. De hecho, el exceso de NADH actúa como señal de que las condiciones celulares son las adecuadas para sintetizar ácidos grasos. De este modo se acumulan triacilgliceroles en el hígado, originándose una situación que se conoce como "hígado graso".

La segunda vía para metabolizar etanol se conoce como "sistema microsómico de oxidación del etanol inducible por el etanol" (MEOS, "*microsomal ethanol-oxidizing system*"). Esta vía, dependiente del citocromo P450 (p. 750), genera acetaldehído y luego acetato al tiempo que el NADPH, el poder reductor en reacciones de biosíntesis, se oxida a NADP⁺. Como además se requiere oxígeno molecular, en esta vía se generan radicales libres que dañan los tejidos. El estrés oxidativo se agrava aún más porque al consumirse NADPH en esta vía, el antioxidante glutatión no puede ser regenerado (Sección 20.5).

¿Qué efectos producen los otros metabolitos del etanol? La mitocondria hepática es capaz de transformar el acetato en acetil-CoA a través de una reacción que consume ATP y que está catalizada por la tioquinasa, el enzima que normalmente activa a los ácidos grasos de cadena corta.



Sin embargo, el posterior procesamiento del acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico está bloqueado ya que el NADH inhibe dos importantes enzimas reguladoras: la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. La acumulación de acetil-CoA tiene diversas consecuencias. Por un lado se formarán cuerpos cetónicos, que se liberarán a la sangre, agravando con ello la acidosis producida por la elevada concentración de lactato. Por otro lado, como el procesamiento del acetato en el hígado resulta insuficiente, se eleva la concentración de acetaldehído. Este compuesto es muy reactivo y establece enlaces covalentes con determinados grupos funcionales de las proteínas, alterando la función de muchas de ellas. Si durante períodos prolongados hay un consumo excesivo de etanol, el acetaldehído puede llegar a dañar el hígado, llevando al individuo a la muerte.

El daño hepático debido al excesivo consumo de etanol sucede en tres fases. En la primera se desarrolla el hígado graso, ya mencionado. En la segunda fase –la hepatitis alcohólica– se produce la muerte de grupos de células y la inflamación de este órgano. Esta fase, en sí misma, puede resultar letal. En la tercera fase –la cirrosis– aparecen estructuras fibrosas y tejido necrosado alrededor de las células muertas. La cirrosis altera muchas de las funciones bioquímicas del hígado. El hígado cirrótico es incapaz de transformar el amoniaco en urea, por lo que aumenta el nivel sanguíneo de amoniaco. El amoniaco es un compuesto tóxico para el sistema nervioso y puede conducir al coma y a la muerte. La cirrosis hepática afecta a un 25% de individuos alcohólicos y aproximadamente un 75% del total de casos de cirrosis derivan del alcoholismo. La hepatitis vírica es otra causa, esta vez no alcohólica de cirrosis hepática.

El consumo excesivo de etanol interfiere en el metabolismo de las vitaminas

Los efectos adversos del etanol no se limitan solamente al metabolismo del propio etanol. La vitamina A (retinol) se convierte en ácido retinoico, una importante molécula señal para el crecimiento y desarrollo de los vertebrados, mediante las mismas deshidrogenasas que metabolizan el etanol. En consecuencia, en presencia de etanol, esta activación no tiene lugar porque éste actúa como un inhibidor competitivo. Además, el sistema MEOS, inducido por el etanol, inactiva el ácido retinoico. Esta interferencia en la vía del ácido retinoico como señal se cree que es la responsable, el menos en parte, del síndrome del alcohol fetal tanto como de una serie de cánceres.

El trastorno del metabolismo de la vitamina A es un resultado directo de los cambios bioquímicos inducidos por un exceso en el consumo de etanol. Otras alteraciones del metabolismo son el resultado de otra característica común de los alcohólicos: la malnutrición. Una enfermedad neurológica espectacular, conocida como *síndrome de Wernicke-Korsakoff* se produce por insuficiente ingesta de la vitamina tiamina. Los síntomas incluyen confusión mental, locomoción insegura y carencia de destreza motriz. Los síntomas del síndrome de Wernicke-Korsakoff son semejantes al beriberi porque ambas situaciones son el resultado de carencia de tiamina. Esta vitamina se transforma en el coenzima tiamina pirofosfato, un componente clave del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Recordemos que este complejo conecta la glicolisis con el ciclo del ácido cítrico. Las alteraciones de este complejo resultan de la máxima evidencia como enfermedades neurológicas porque el cerebro normalmente depende de la glucosa para la generación de energía.

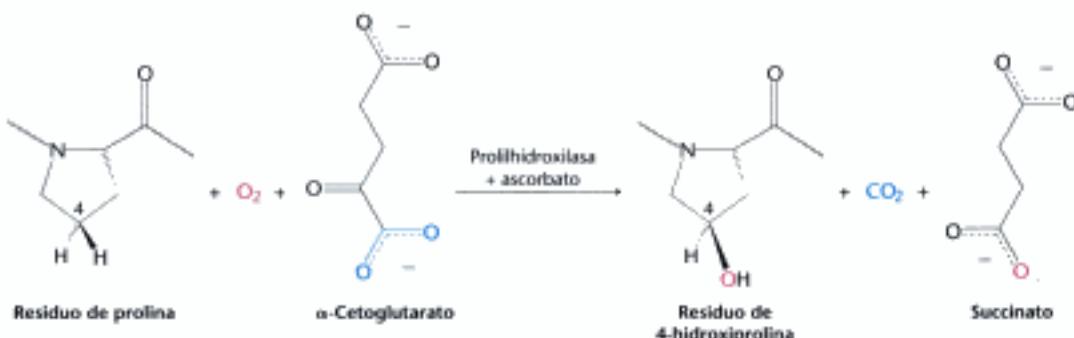


Figura 27.20 Formación de 4-hidroxiprolina. La prolina se hidroxila en C-4 por acción de la prolidoxilasa, un enzima que activa a la molécula de oxígeno.

El escorbuto se observa ocasionalmente en los alcohólicos debido a una deficiente ingestión de vitamina C. La vitamina C se requiere para la formación de las fibras de colágeno estables. Los síntomas del escorbuto incluyen lesiones cutáneas y fragilidad de los vasos sanguíneos. Lo más notable son las encías sangrantes, la pérdida de dientes e infecciones periodontales. Las encías son especialmente sensibles a la falta de vitamina C porque el colágeno de las encías se renueva rápidamente. ¿Cuál es la base bioquímica del escorbuto? La vitamina C es necesaria para la continua actividad de la prolidoxilasa. Este enzima sintetiza 4-hidroxiprolina, un aminoácido requerido en el colágeno. Para formar este aminoácido nada corriente, deben hidroxilarse los residuos de prolina de las cadenas nacientes de colágeno situados en el lado amino de los residuos de glicina. Un átomo de oxígeno del O_2 se une al C-4 de la prolina mientras el otro átomo de oxígeno es captado por el α -cetoglutarato, que se convierte en succinato (Figura 27.20). Esta reacción está catalizada por la *prolidoxilasa*, una *dioxigenasa*, que requiere un ion Fe^{2+} para activar al O_2 . El enzima también convierte el α -cetoglutarato en succinato sin hidroxilar la prolina. En esta reacción parcial, se forma un complejo de hierro oxidado que inactiva al enzima. ¿Cómo se regenera el enzima activo? El *ascorbato* (vitamina C) aparece para rescatar el enzima inactivado reduciendo el ion férrico. En el proceso de recuperación el acorbato se oxida a ácido deshidroascórbico (Fig. 27.21). Por consiguiente, el ascorbato actúa aquí como un antioxidante específico. ¿Por qué la hidroxilación disminuida tiene consecuencias tan devastadoras? El colágeno sintetizado en ausencia de ascorbato es menos estable que la proteína normal. La hidroxiprolina estabiliza la triple hélice del colágeno al formar puentes de hidrógeno intercatenarios. Las fibras anormales de colágeno formadas por hidroxilación insuficiente son las responsables de los síntomas del escorbuto.

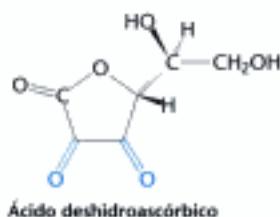
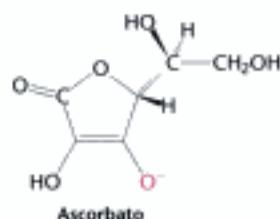
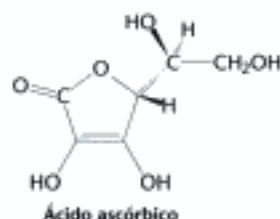


Figura 27.21 Formas del ácido ascórbico (vitamina C). El ascorbato es la forma ionizada de la vitamina C y el ácido deshidroascórbico es la forma oxidada del ascorbato.

Resumen

27.1 El metabolismo consta de vías metabólicas fuertemente interconectadas

La estrategia básica del metabolismo es simple: formar ATP, poder reductor y precursores para la biosíntesis. Esta compleja red de reacciones está controlada por interacciones allostéricas y modificaciones covalentes reversibles de los enzimas, por cambios en la cantidad de enzimas, compartimentación e interacciones entre órganos metabólicamente muy diferentes. El enzima que cataliza la etapa comprometida de una vía es normalmente el principal centro de control. Vías antagonistas como gluconeogénesis y glicólisis están reguladas recíprocamente de modo que una permanece latente mientras que la otra es muy activa.

Hidden page

acidosis. El hígado se daña porque el exceso de NADH ocasiona una excesiva formación de grasa, así como la producción de acetaldehído, una molécula muy reactiva. El alcohol puede originar graves lesiones hepáticas.

Términos clave

interacción alostérica (p. 762)	síntesis y degradación del glucógeno (p. 764)	homeostasis de la glucosa (p. 770)
modificación covalente (p. 762)	síntesis y degradación de ácidos grasos (p. 764)	insulina (p. 770)
glicólisis (p. 762)	glucosa 6-fosfato (p. 765)	glucagón (p. 770)
fosfofructoquinasa (p. 763)	piruvato (p. 766)	homeostasis calórica (p. 774)
ciclo del ácido cítrico (p. 763)	acetil-CoA (p. 766)	leptina (p. 774)
fosforilación oxidativa (p. 763)	cuerpos cetémicos (p. 767)	resistina (p. 775)
vía de las pentosas fosfato (p. 763)	ciclo ayuno-alimentación (p. 770)	creatina fosfato (p. 860)
gluconeogénesis (p. 764)		

Lecturas seleccionadas

Libros

- Fell, D., 1997. *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press.
Frayn, K. N., 1996. *Metabolic Regulation: A Human Perspective*. Portland Press.
Hargreaves, M. y Thompson, M. (Eds.), 1999. *Biochemistry of Exercise X*. Human Kinetics.
Poortmans, J. R. (Ed.), 2004. *Principles of Exercise Biochemistry*. Karger.
Harris, R. A. y Crabb, D. W., 1997. Metabolic interrelationships. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* (pp. 525-562), edited by T. M. Devlin. Wiley-Liss.

Metabolismo de combustibles

- Rolland, F., Winderickx, J. y Thevelein, J. M., 2001. Glucosesensing mechanism in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26: 310-317.
Rasmussen, B. B. y Wolfe, R. R., 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 463-484.
Hochachka, P. W., 2000. Oxygen, homeostasis, and metabolic regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 475: 311-335.
Holm, E., Sledziszewski, O. y Grips, E., 1999. Amino acid metabolism in liver disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2: 47-53.
Wagenmakers, A. J., 1998. Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441: 307-319.

Adaptaciones metabólicas en el ayuno prolongado

- Baverel, G., Férier, B. y Martin, M., 1995. Fuel selection by the kidney: Adaptation to starvation. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 197-212.
MacDonald, I. A. y Webber, J., 1995. Feeding, fasting and starvation: Factors affecting fuel utilization. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 267-274.
Cahill, G. F., Jr., 1976. Starvation in man. *Clin. Endocrinol. Metab.* 5: 397-415.
Sugden, M. C., Holness, M. J. y Palmer, T. N., 1989. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. *Biochem. J.* 263: 313-323.

Diabetes mellitus

- Lowel, B. B. y Shulman, G., 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307: 384-387.
Rutter, G. A., 2000. Diabetes: The importance of the liver. *Curr. Biol.* 10: R736-R738.
Saltiel, A. R., 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517-529.

Bell, G. I., Pilikas, S. J., Weber, I. T. y Polonsky, K. S., 1996. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 171-186.

Withers, D. J. y White, M., 2000. Perspective: The insulin signaling system—a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 141: 1917-1921.

Taylor, S. I., 1995. Diabetes mellitus. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (7th ed.; pp. 935-936), edited by C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden y D. S. Fredrickson. McGraw-Hill.

Metabolismo del ejercicio

- Shulman, R. G. y Rothman, D. L., 2001. The "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 457-461.
Gleason, T., 1996. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 555-581.
Hollosy, J. O. y Kohrt, W. M., 1996. Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 121-138.
Hochachka, P. W. y McClelland, G. B., 1997. Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *J. Exp. Biol.* 200: 381-386.
Horowitz, J. F. y Klein, S., 2000. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 558S-563S.
Wagenmakers, A. J., 1999. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise. *Diabetes Nutr. Metab.* 12: 316-322.

Metabolismo del etanol

- Maloof, A. y Duester, G., 2002. Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277: 22553-22557.
Stewart, S., Jones, D. y Day, C.P., 2001. Alcoholic liver disease: New insights into mechanisms and preventive strategies. *Trends Mol. Med.* 7: 408-413.
Lieber, C. S., 2000. Alcohol: Its metabolism and interaction with nutrients. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 395-430.
Niemela, O., 1999. Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front. Biosci.* 1: D506-D513.
Riveros-Rosas, H., Julian-Sánchez, A. y Piña, E., 1997. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch. Med. Res.* 28: 453-471.

Hidden page

Hidden page

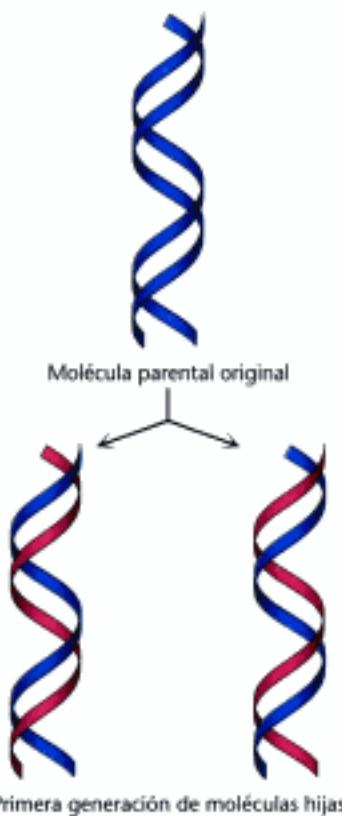


Figura 28.1 Replicación del DNA. Cada hebra de la doble hélice (en azul) actúa como el molde para la síntesis de una nueva hebra complementaria (en rojo).

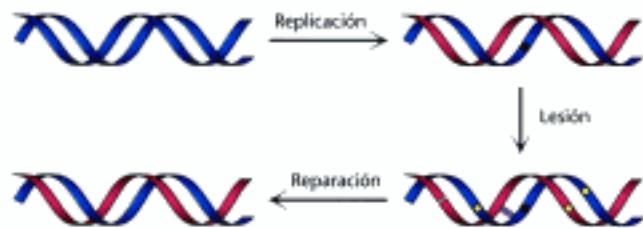


Figura 28.2 Replicación, lesión y reparación del DNA. Se pueden producir algunos errores (mostrados como puntos negros) en la replicación del DNA. Reacciones posteriores pueden introducir otras lesiones en el DNA (en amarillo), como bases modificadas, enlaces cruzados y escisiones en una o las dos hebras. Muchos de estos errores se detectan y se reparan.

tienen enzimas que detectan y reparan las modificaciones dañinas del DNA. Los agentes que introducen lesiones químicas en el DNA son factores clave para el desarrollo del cáncer, al igual que las deficiencias en los sistemas de reparación que corren estas lesiones. Entre los tipos de lesión más devastadores están las escisiones de doble hebra en el DNA. Cuando la escisión afecta a regiones próximas de las dos hebras, ninguna de ellas está intacta para actuar como molde en una futura síntesis reparadora de DNA. La recombinación es un mecanismo que se emplea para reparar tales lesiones. Consiste en la mezcla de fragmentos de DNA correspondientes a dos dobles hélices. Además de este papel, la recombinación es crucial para la generación de la diversidad genética en la meiosis. La recombinación es también la llave para la producción de un amplio repertorio de genes para moléculas esenciales en la respuesta inmune (Capítulo 33). Comenzaremos con un profundo examen de las propiedades estructurales del DNA.

28.1 El DNA puede adoptar diversas formas estructurales

La estructura de doble hélice del DNA propuesta por Watson y Crick sugirió de forma inmediata cómo se almacena y se replica la información genética. Como ya se ha discutido anteriormente (Sección 4.2), las características esenciales de su modelo son:

1. Dos cadenas polinucleotídicas orientadas en direcciones opuestas se enrollan en torno a un eje común originando una doble hélice dextrógira.
2. Las bases púricas y pirimidínicas se localizan en el interior de la hélice, mientras que las unidades de fosfato y desoxirribosa se disponen en el exterior.
3. La adenina (A) se empareja con la timina (T) y la guanina (G) con la citosina (C). Un par de bases A-T se mantiene unido mediante dos puentes de hidrógeno y un par de bases G-C por tres.

El DNA-A es una doble hélice más corta y más ancha que la del DNA-B, la forma más frecuente

Watson y Crick basaron su modelo (conocido como la *hélice de DNA-B*) en patrones de difracción de rayos X de fibras de DNA hidratado y la información que aportaban sobre las propiedades de la doble hélice era el promedio de todos sus componentes. Los estudios de difracción de rayos X de fibras de DNA deshidratado pusieron de manifiesto la existencia de una forma distinta denominada *DNA-A*, que aparece cuando la humedad relativa cae por debajo del 75%. El DNA-A, al igual que el DNA-B, es una doble hélice dextrógira formada por hebras antiparalelas que se mantienen unidas mediante el emparejamiento de bases de Watson y Crick. La hélice A es más ancha y más corta que la hélice B, y sus pares de bases se encuentran inclinados en vez de mantenerse perpendiculares al eje de la hélice (Figura 28.3).

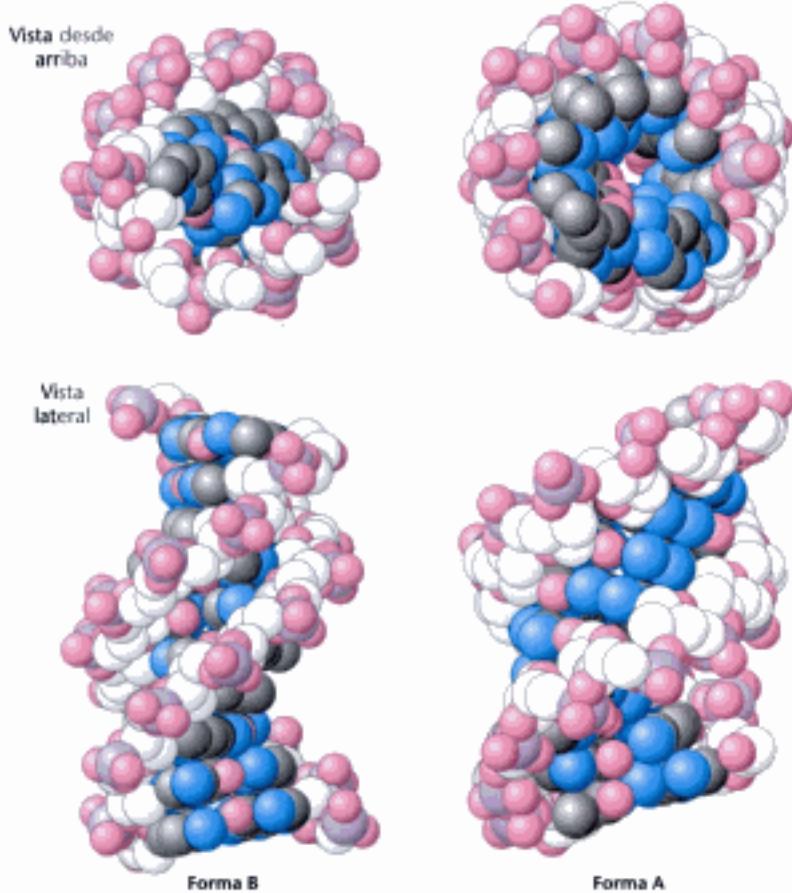


Figura 28.3 Formas A y B del DNA. Los modelos espaciales compactos de diez pares de bases de las formas A y B del DNA ilustran sus estructuras helicoidales dextrógiiras. Obsérvese que la hélice de la forma B es más larga y más estrecha que la hélice de la forma A. Los átomos de carbono del armazón estructural se muestran en blanco. [Tomado de 1BNA.pdb y 1DNZ.pdb.]

Muchas de las diferencias estructurales entre los DNA de las formas B y A se deben a las distintas conformaciones espaciales de sus unidades de desoxirribosa (Figura 28.4). En el DNA-A, el C-3' se localiza fuera del plano formado por los otros cuatro átomos del anillo de furanosa (una conformación conocida como C-3' endo); en el DNA-B, es el C-2' el que se localiza fuera del plano (una conformación conocida como C-2' endo). La conformación C-3' endo del DNA-A hace que los pares de bases tengan una inclinación de 19 grados con respecto al plano normal a la hélice. Los fosfatos y otros grupos de la hélice A se unen a menos moléculas de H_2O que los del DNA-B. Por tanto, la deshidratación favorece la forma A.

El DNA celular está generalmente en forma B. Pero la hélice A no se limita al DNA deshidratado. *Regiones de doble hebra del RNA y algunos híbridos RNA-DNA adoptan una estructura de doble hélice muy parecida a la del DNA-A*. La posición de los grupos hidroxilo unidos al carbono 2' de la ribosa evitan que el RNA forme una hélice B clásica de Watson y Crick debido a impedimentos estéricos: el átomo de oxígeno en posición 2' se acercaría demasiado a tres átomos del grupo fosfato colindante y a un átomo de la base siguiente. Por el contrario, en una hélice de tipo A el oxígeno en posición 2' se proyecta hacia el exterior, alejándose de los otros átomos.

Los surcos mayor y menor están recubiertos por grupos capaces de formar puentes de hidrógeno

En las moléculas de los ácidos nucleicos, la doble hélice presenta dos surcos, denominados *surco mayor* y *surco menor*. Estos surcos aparecen porque los enlaces glicosídicos de un par de bases no están diametralmente opuestos entre sí (Figura 28.5). El surco menor contiene el O-2 de la pirimidina y el N-3 de la purina del par de bases, y el surco mayor se localiza en el costado opuesto del par. El grupo metilo de la timina también está orientado hacia el surco mayor. En el DNA-B, el surco ma-

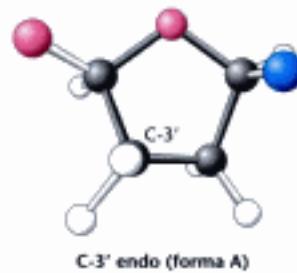


Figura 28.4 Desviaciones del plano en el anillo del azúcar. En la forma A del DNA, el átomo de carbono C-3' de la desoxirribosa se sitúa por encima del plano definido por los otros cuatro átomos del anillo del azúcar (recibe el nombre de C-3' endo). En la forma B del DNA, cada desoxirribosa se encuentra en una conformación C-2' endo, en la que es este carbono el que está fuera del plano.

Figura 28.5 Laterales de los surcos mayor y menor. Como los dos enlaces glicosídicos no se encuentran diametralmente opuestos entre sí, cada par de bases presenta un lateral de mayor longitud que define el surco mayor y un lado más corto que define el surco menor. Los surcos están rodeados de potenciales dadores (en azul) y aceptores (en rojo) de puentes de hidrógeno.

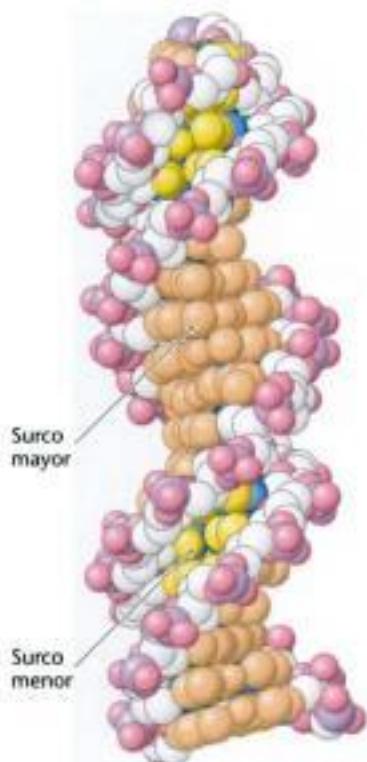
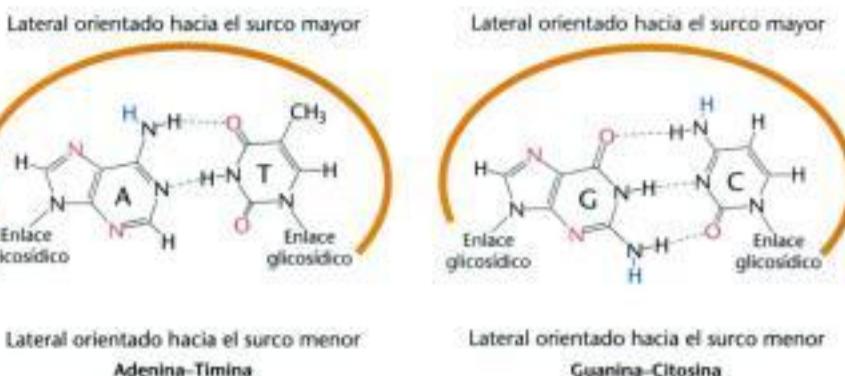


Figura 28.6 Surcos mayor y menor en la forma B del DNA. El surco mayor se representa en color naranja y el surco menor en amarillo. Los átomos de carbono del esqueleto de unidades de desoxirribosa se representan de color blanco.



yor es más ancho (12 \AA en vez de 6) y más profundo (8.5 \AA en vez de 7.5) que el surco menor (Figura 28.6).

Cada surco está recubierto por átomos capaces de actuar como potenciales dadores o接受者 de puentes de hidrógeno que permiten establecer interacciones específicas con proteínas (Figura 28.5). En el surco menor, el N-3 de la adenina o de la guanina y el O-2 de la timina o citosina pueden actuar como接受者 de hidrógeno, y el grupo amino unido al C-2 de la guanina puede donar hidrógeno. En el surco mayor, el N-7 de la guanina o de la adenina es un acceptor potencial, al igual que el O-4 de la timina y el O-6 de la guanina. Los grupos amino unidos al C-6 de la adenina y al C-4 de la citosina pueden actuar como dadores de hidrógeno. Hay que destacar el hecho de que el surco mayor ofrece más motivos estructurales para poder distinguir un par de bases de otro que el surco menor. El tamaño más grande del surco mayor del DNA-B lo hace más accesible a la hora de establecer interacciones con proteínas que reconocen secuencias específicas del DNA.

El estudio de cristales de DNA puso de manifiesto variaciones locales en la estructura del DNA

El análisis mediante rayos X de cristales de oligómeros idénticos de DNA tuvo que esperar a que se desarrollasen técnicas para la síntesis de grandes cantidades de fragmentos de DNA con una secuencia de bases definida. Los análisis de rayos X de cristales de moléculas idénticas de DNA a resolución atómica han revelado que *el DNA presenta mucha más variabilidad y diversidad estructural de la que se imaginó en un principio*.

El análisis de rayos X de un dodecámero de DNA cristalizado realizado por Richard Dickerson y sus colaboradores puso de manifiesto que su estructura global es muy parecida a la de la forma B de la doble hélice de Watson y Crick. Sin embargo, el dodecámero se diferencia del modelo de Watson y Crick en que no es uniforme; hay desviaciones locales más bien grandes de la estructura promediada. El modelo de Watson y Crick presenta 10 residuos por cada vuelta completa y, por lo tanto, un residuo presenta, en relación con el siguiente de la cadena, una rotación de 36 grados. En el dodecámero de Dickerson, los ángulos de rotación oscilan entre 28 grados (cuando está enrollado de forma menos intensa) y 42 grados (cuando está enrollado de forma más intensa). Además, en muchos pares de bases las dos bases no son perfectamente coplanares (Figura 28.7). En vez de ello, se disponen como las hojas de la hélice de un barco. Esta desviación de la estructura ideal, denominada *giro de la hélice*, se produce porque las bases no están exactamente en el mismo plano.

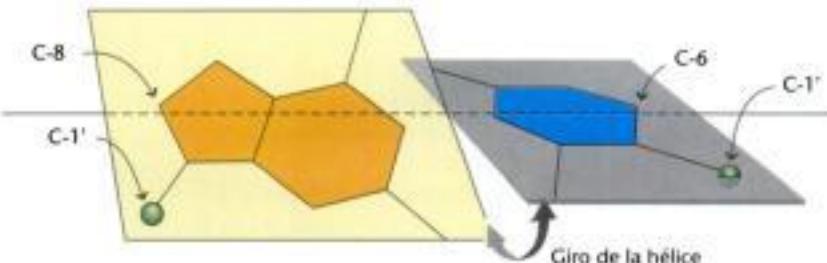


Figura 28.7 Giro de la hélice. A menudo, las dos bases emparejadas del DNA no están exactamente en el mismo plano. Una de ellas está inclinada con respecto a la otra, como las hojas de la hélice propulsora de un barco.

Hidden page

Hidden page

el DNA se puede plegar originando una estructura con 23 vueltas de hélice de tipo B y un bucle desenrollado (Figura 28.9D) o adoptar una estructura *superenrollada* con 25 vueltas de hélice de tipo B y dos vueltas de superhélice *dextrógiro* (denominada *negativa*) (Figura 28.9E).

El superenrollamiento altera de manera notable la forma global del DNA. Una molécula de DNA superenrollado es más compacta que una molécula de DNA relajado de la misma longitud. Por tanto, cuando se somete a centrifugación o a electroforesis el DNA superenrollado se desplaza más rápidamente que el DNA relajado. El desenrollamiento dará lugar a un superenrollamiento tanto en moléculas circulares de DNA como en moléculas de DNA que están constreñidas en configuraciones cerradas por cualquier otro motivo.

El número de enlace del DNA, una propiedad topológica, determina el grado de superenrollamiento

Nuestro grado de comprensión de la conformación del DNA se ha beneficiado de conceptos extraídos de la topología, una rama de las matemáticas que estudia las propiedades estructurales que no cambian a causa de deformaciones del tipo de estiramientos o doblamientos. Una propiedad topológica fundamental de una molécula de DNA circular es su *número de enlace* (Lk , “linking number”), que equivale al número de veces que una hebra de DNA se enrolla en sentido dextrógiro alrededor del eje de la hélice cuando el eje está confinado en un plano. Para el DNA relajado mostrado en la Figura 28.9B, $Lk = 25$. Para la molécula parcialmente desenrollada mostrada en la parte D y la superenrollada mostrada en la parte E, $Lk = 23$ porque se han desenrollado dos vueltas completas del dúplex lineal *antes* de cerrarlo. Las moléculas que sólo se diferencian en el número de enlace son *isómeros topológicos* (*topoisómeros*) entre sí. Los topoisómeros del DNA sólo se pueden interconvertir si se corta una o las dos hebras del DNA y se vuelven a unir.

El DNA desenrollado y el DNA superenrollado mostrados en las Figuras 28.9D y E son idénticos desde el punto de vista topológico pero distintos desde el punto de vista geométrico. Tienen el mismo valor de Lk , pero difieren en Tw (giro) y Wr (torsión). Aunque las definiciones rigurosas de giro y torsión son complejas, el giro es una medida del grado de enrollamiento helicoidal de las hebras de DNA entre sí, mientras que la torsión es una medida del enrollamiento del eje de la doble hélice, que recibe el nombre de *superenrollamiento*. A un enrollamiento dextrógiro se le asigna un número negativo (superenrollamiento negativo) y a un enrollamiento levógiro se le asigna un número positivo (superenrollamiento positivo).

¿Existe una relación entre Tw y Wr ? De hecho, sí la hay. La topología nos indica que la suma de Tw y Wr equivale a Lk .

$$Lk = Tw + Wr$$

En la Figura 28.9D, el DNA circular parcialmente desenrollado tiene $Tw \sim 23$ y $Wr \sim 0$, mientras que el DNA superenrollado tiene $Tw \sim 25$ y $Wr \sim -2$ (Figura 28.9E). Estas formas se pueden interconvertir sin necesidad de romper la cadena del DNA porque presentan el mismo valor de Lk , que en este caso es 23. El reparto de Lk (que debe ser un valor entero) entre Tw y Wr (que no tienen por qué ser enteros) está determinado por la energética. La energía libre se reduce al mínimo cuando aproximadamente el 70% del cambio en Lk se refleja en Wr y el 30% en Tw . Por tanto, la forma más estable sería una en la que $Tw = 24,4$ y $Wr = -1,4$. Por tanto, una disminución de Lk provoca tanto un superenrollamiento dextrógiro (negativo) del eje del DNA como un desenrollamiento del dúplex. Los topoisómeros cuyos Lk se diferencian tan solo en 1, y por tanto sus Wr difieren en 0,7, se pueden separar fácilmente mediante una electroforesis en gel de agarosa porque sus volúmenes hidrodinámicos son muy distintos: el superenrollamiento condensa el DNA (Figura 28.10).

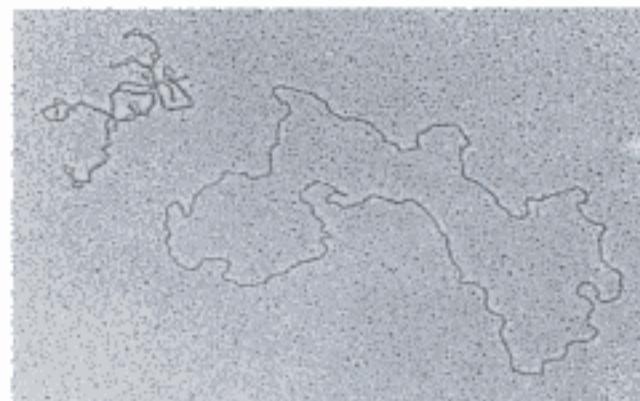


Figura 28.10 Topoisómeros. Micrografía electrónica que muestra un DNA con superenrollamiento negativo y un DNA relajado. [Cortesía del Dr. Jack Griffith.]

Las topoisomerasas preparan a la doble hélice para su desenrollamiento

La mayor parte de las moléculas de DNA presentes en la naturaleza están superenrolladas negativamente. ¿Cuál es la razón de esta predominancia? Como ya se ha indicado, el superenrollamiento negativo aparece cuando disminuye el grado de enrollamiento del DNA. En esencia, el superenrollamiento negativo prepara al DNA para aquellos procesos que requieren la separación de las hebras de DNA como la replicación o la transcripción. El superenrollamiento positivo condensa el DNA de forma igual de eficaz, pero hace que la separación de las hebras resulte más difícil.

La presencia de superenrollamientos en el área inmediata a la separación del DNA hace esta separación difícil. Los superenrollamientos negativos deben ser continuamente eliminados y el DNA debe relajarse a medida que la doble hélice se abre.

Descubiertas por James Wang y Martin Gellert, las *topoisomerasas* son enzimas específicos que introducen o eliminan superenrollamientos. Las *topoisomerasas de tipo I* catalizan el relajamiento del DNA superenrollado, un proceso favorable desde el punto de vista termodinámico. Las *topoisomerasas de tipo II* utilizan la energía libre de la hidrólisis del ATP para introducir superenrollamientos negativos en el DNA. Tanto las topoisomerasas de tipo I como las de tipo II desempeñan funciones importantes en la replicación, transcripción y recombinación del DNA.

Estos enzimas alteran el número de enlace del DNA catalizando un proceso que consta de tres etapas: (1) la *escisión* de una o las dos hebras del DNA, (2) el *paso* de un segmento del DNA a través de este hueco, y (3) la *reparación* del corte en el DNA. Las topoisomerasas de tipo I rompen tan solo una hebra del DNA mientras que los enzimas de tipo II rompen ambas hebras. Los dos tipos de enzimas presentan varias características comunes, entre las que se incluye la utilización de residuos clave de tirosina para formar enlaces covalentes con el esqueleto del polinucleótido que se escinde de forma transitoria.

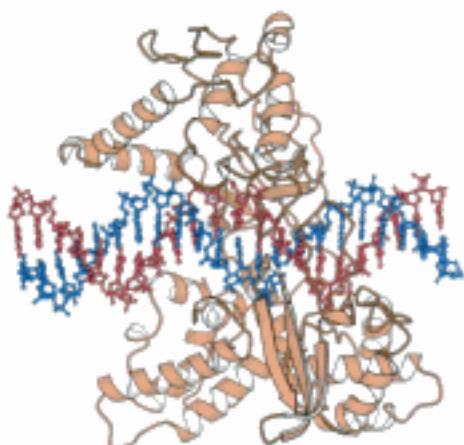
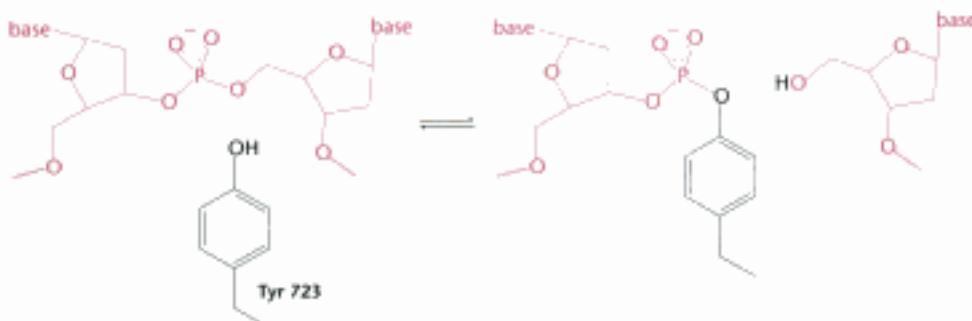


Figura 28.11 Estructura de la topoisomerasa I. Estructura de un complejo formado por un fragmento de la topoisomerasa I humana y el DNA. Obsérvese que el DNA se sitúa en una cavidad central del enzima. [Tomado de 1EJ9.pdb.]

Las topoisomerasas de tipo I relajan estructuras superenrolladas

Se han determinado las estructuras tridimensionales de diversas topoisomerasas de tipo I (Figura 28.11). Estas estructuras revelan muchas características del mecanismo de reacción. Las topoisomerasas de tipo I humanas constan de cuatro dominios, que se disponen en torno a una cavidad central de 20 Å de diámetro, el tamaño justo para acomodar una molécula de DNA de doble hebra. Esta cavidad también incluye un residuo de tirosina (Tyr 723) que actúa como un nucleófilo que escinde el esqueleto del DNA en el transcurso de la catálisis.

A partir del análisis de estas estructuras y los resultados de otros estudios, se sabe que el relajamiento de moléculas de DNA superenrollado negativamente tiene lugar del siguiente modo (Figura 28.12). En primer lugar, la molécula de DNA se une en el interior de la cavidad de la topoisomerasa. El grupo hidroxilo de la tirosina 723 ataca a un grupo fosfato de una de las hebras de DNA formando un enlace fosfo-diéster entre el enzima y el DNA, escindiendo el DNA y generando un grupo hidroxilo libre en posición 5'.



Hidden page

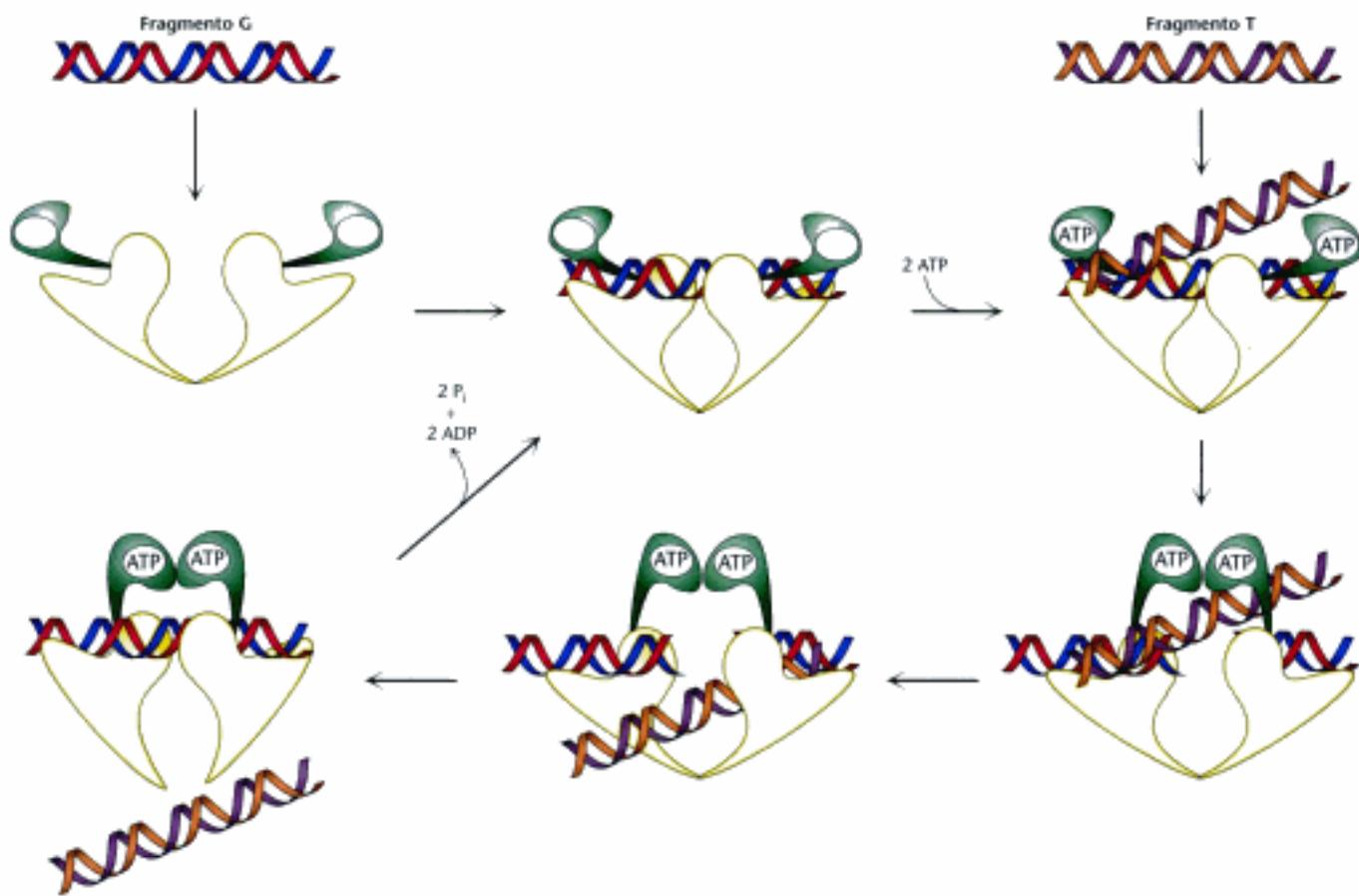
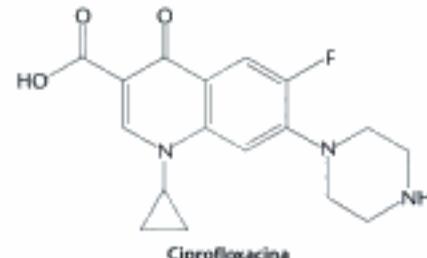
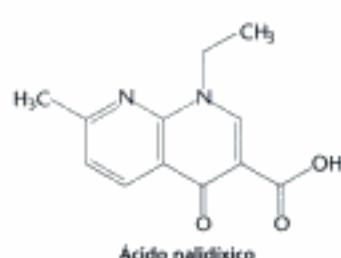


Figura 28.14 Mecanismo de la topoisomerasa II. En primer lugar, la topoisomerasa II se une a un dúplex de DNA por la región denominada fragmento G (del inglés “gate”). La unión del ATP a los dos dominios N-terminales aproxima. El cambio conformacional provoca la escisión del fragmento G en ambas hebras y la unión de otro dúplex de DNA, el fragmento T. A continuación, el fragmento T atraviesa el hueco en el fragmento G dirigiéndose hacia la parte inferior del enzima. La hidrólisis del ATP devuelve al enzima a su estado inicial con el fragmento G aún unido.

Este cambio conformacional también provoca la separación y escisión de las dos hebras del fragmento G. Cada hebra está unida al enzima mediante un enlace tirosina-fosfodiéster. A diferencia de los enzimas de tipo I, las topoisomerasas de tipo II sujetan firmemente al DNA de forma que no puede rotar. A continuación, el fragmento T pasa a través del fragmento G escindido y se introduce en la gran cavidad central. La reparación del segmento G provoca la liberación del fragmento T a través del acceso localizado en la parte inferior del enzima. La hidrólisis del ATP y la liberación de ADP y ortofosfato permiten la separación de los dos dominios de unión al ATP, con lo que el enzima está listo para unirse a otro fragmento T. El proceso global da lugar a una disminución en dos del valor absoluto del número de enlace.

La topoisomerasa II bacteriana (a menudo denominada *DNA girasa*) es el objetivo de diversos antibióticos que inhiben al enzima procariótico mucho más que al eucariótico. La *novobiocina* bloquea la unión del ATP a la girasa. Por el contrario, el *ácido nalidixico* y la *ciprofloxacina*, interfieren en la ruptura y posterior unión de las cadenas de DNA. Estos dos inhibidores de la girasa se usan con mucha frecuencia para tratar, entre otras, las infecciones del tracto urinario, incluidas las producidas por el *Bacillus anthracis* (ántrax). La *campotecina*, un agente antitumoral, inhibe la topoisomerasa I humana estabilizando la forma del enzima unida covalentemente al DNA.



Hidden page

Hidden page

El estudio de las estructuras cristalinas de varias DNA polimerasas ha revelado porqué la complementariedad de las formas es tan importante. En primer lugar, residuos del enzima forman puentes de hidrógeno con el lateral orientado hacia el surco menor del par de bases situado en el centro activo (Figura 28.18). En el surco menor, los aceptores de puentes de hidrógeno están localizados en las mismas posiciones para todos los pares de bases de Watson y Crick. Estas interacciones actúan a modo de "regla" que permite determinar si en el centro activo se ha formado un par de bases con el espaciamiento apropiado.

En segundo lugar, las DNA polimerasas se cierran sobre el dNTP recién llegado (Figura 28.19). La unión de un desoxirribonucleósido trifosfato al centro activo de una DNA polimerasa desencadena un cambio conformacional: el dominio de los dedos gira formando una cavidad rígida en la cual sólo podrá acomodarse un par de bases con la forma apropiada. Muchos de los residuos que recubren este bolsillo son importantes para asegurar la eficiencia y la fidelidad de la síntesis del DNA. Por ejemplo, la mutación de un residuo de tirosina conservado situado en la parte superior de esta cavidad da lugar a una polimerasa que es 40 veces más propensa al error que la polimerasa original.

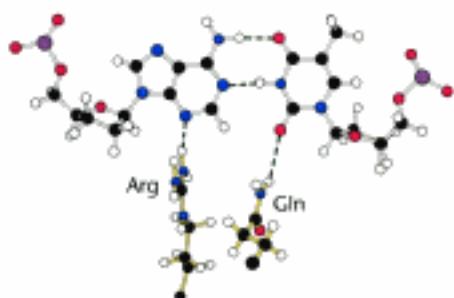


Figura 28.18 Interacciones en el surco menor. Las DNA polimerasas donan dos puentes de hidrógeno a los pares de bases en el surco menor. Los接受ores de los puentes de hidrógeno se localizan en estas dos posiciones en todos los pares de bases de Watson y Crick, incluido el par A-T mostrado en la figura.

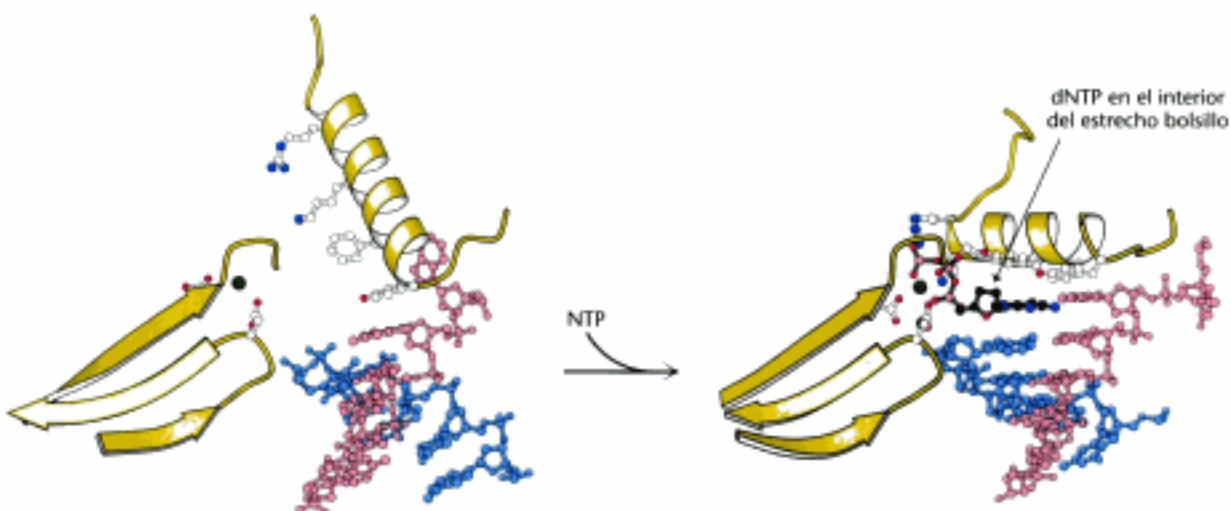


Figura 28.19 Selectividad de forma. La unión de un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) provoca en la DNA polimerasa un cambio conformacional, generándose un estrecho bolsillo en el enzima con cabida para el par de bases formado por el dNTP y su base complementaria en la hebra molde. El cambio conformacional solo es posible cuando el dNTP complementa a la base del molde. [Tomado de 2BDP.pdb y 1T7P.pdb.]

Un cebador de RNA sintetizado por la primasa permite el comienzo de la síntesis de DNA

Las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis de DNA sin un cebador (en inglés, "primer"), un segmento de ácido nucleico con un grupo hidroxilo libre en posición 3' que forma una doble hélice con el molde. ¿Cómo se forma este cebador? Una pista importante surgió a partir de la observación de que la síntesis de RNA resulta esencial para el inicio de la síntesis de DNA. De hecho, el RNA actúa como cebador para la síntesis de DNA. Una RNA polimerasa especializada denominada *primasa* sintetiza un fragmento corto de RNA (~ 5 nucleótidos) que es complementario a una de las hebras del DNA molde (Figura 28.20). La primasa, al igual que otras RNA polimerasas, puede comenzar la síntesis de DNA sin un cebador. Una vez iniciada la síntesis, el corto fragmento de RNA se elimina mediante hidrólisis y se reemplaza con DNA.

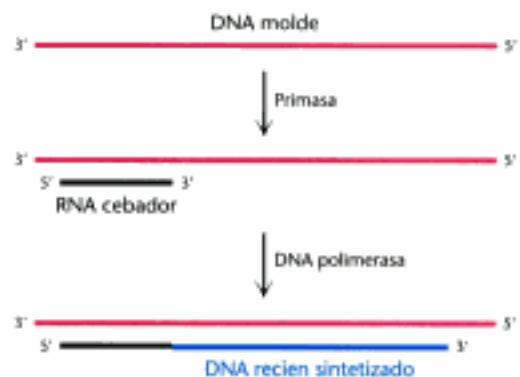


Figura 28.20 Cebador. En la replicación del DNA el cebador es un pequeño fragmento de RNA que se sintetiza mediante la primasa, una RNA polimerasa. El RNA cebador es eliminado en una etapa posterior de la replicación.

Una de las hebras del DNA se sintetiza de forma continua mientras que la otra se sintetiza a base de fragmentos

Ambas hebras del DNA parental actúan como moldes para la síntesis de nuevo DNA. El lugar donde se sintetiza el DNA se denomina la *horquilla de replicación* porque el complejo formado por las hebras hijas recién sintetizadas que surgen a partir del dúplex parental se asemeja a un tenedor de dos puntas. Recordemos que las dos hebras son antiparalelas; es decir, discurren en direcciones opuestas. Durante la replicación las dos hebras hijas parecen crecer en la misma dirección. Sin embargo, todas las DNA polimerasas conocidas sintetizan DNA en dirección $5' \rightarrow 3'$, no en dirección $3' \rightarrow 5'$. Entonces, ¿por qué parece que una de las hebras hijas del DNA crece en la dirección $3' \rightarrow 5'$?



Figura 28.21 Fragmentos de Okazaki. En la horquilla de replicación, las dos hebras se sintetizan en dirección $5' \rightarrow 3'$. La hebra guía se sintetiza de forma continua mientras que la hebra retardada se sintetiza a base de pequeños fragmentos que reciben el nombre de fragmentos de Okazaki.

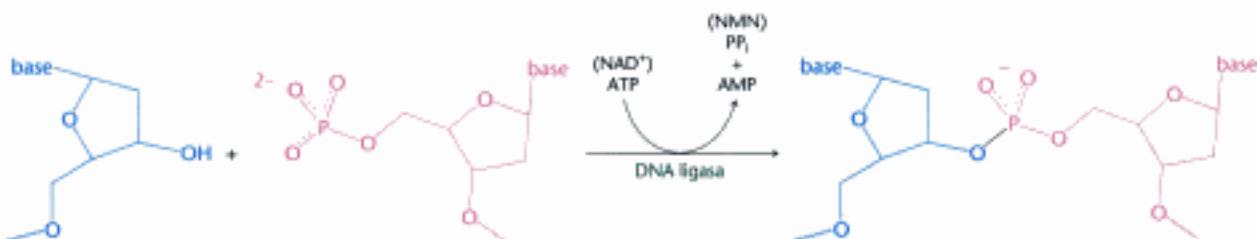
Este dilema fue resuelto por Reiji Okazaki, que descubrió que *una fracción significativa del DNA recién sintetizado se encuentra en forma de pequeños fragmentos*. Estas unidades de aproximadamente mil nucleótidos (denominadas *fragmentos de Okazaki*) se localizan durante un tiempo breve en las proximidades de la horquilla de replicación (Figura 28.21).

A medida que la replicación prosigue, estos fragmentos se unen covalentemente gracias a la actividad de la DNA ligasa para formar una hebra hija continua. La otra hebra nueva se sintetiza de forma continua. La hebra formada a partir de fragmentos de Okazaki se denomina *hebra retardada*, mientras que la que se sintetiza sin interrupciones es la *hebra guía*. *La fabricación discontinua de la hebra retardada permite que la polimerización, que a nivel de los nucleótidos transcurre en dirección $5' \rightarrow 3'$, dé lugar a un crecimiento global en la dirección $3' \rightarrow 5'$.*

La DNA ligasa une los extremos del DNA en regiones de doble hebra

La unión de los fragmentos de Okazaki requiere un enzima que catalice la unión de los extremos de dos cadenas de DNA. La existencia de moléculas circulares de DNA también apunta hacia la existencia de un enzima de este tipo. En 1967, científicos de varios laboratorios descubrieron de forma simultánea la *DNA ligasa*. *Este enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo en posición 3' del extremo de una cadena de DNA y el grupo fosfato en posición 5' del extremo de la otra* (Figura 28.22). Se necesita una fuente de energía para dirigir esta reacción que desde el punto de vista termodinámico no es espontánea. En eucariotas y arqueas, el ATP es la fuente de energía. En bacterias, es el NAD⁺ quien habitualmente desempeña esta función.

La DNA ligasa no puede unir dos moléculas de hebra sencilla o formar un DNA circular de hebra sencilla. En vez de ello, la ligasa *repara los cortes producidos en moléculas de DNA de doble hebra*. Por regla general, el enzima de *E. coli* forma un puente fosfodiéster únicamente si en las proximidades de este corte existen, al menos, varias bases de DNA de hebra sencilla en el extremo de un fragmento de doble hebra que pueden formar una pareja de bases con las de otro fragmento. La ligasa codificada por el bacteriófago T4 puede empalmar dos fragmentos de doble hélice con los extremos romos, una propiedad que se aprovecha en la tecnología del DNA recombinante.



Hidden page



Secuencia de aminoácidos

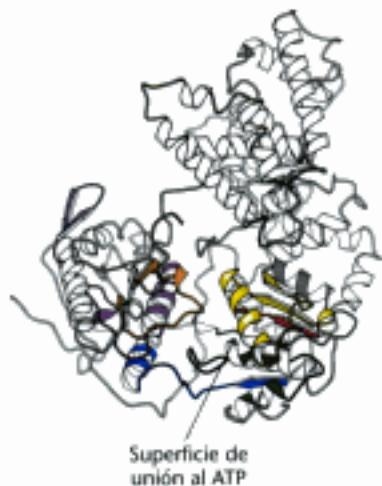


Figura 28.25 Residuos conservados por las helicasas. Al comparar las secuencias de aminoácidos de cientos de helicasas se ha puesto de manifiesto la existencia de siete regiones con un elevado grado de conservación de secuencias (mostradas en color). En la estructura de PcrA, estas regiones conservadas se disponen a lo largo de la interfase entre los dominios A1 y B1 y a lo largo de la superficie a la que se une el ATP. [Tomado de 3PJR.pdb.]

Las helicasas constituyen una clase de enzimas amplia y variada. Algunos de estos enzimas se desplazan en dirección $5' \rightarrow 3'$, mientras que otros desenrollan el RNA en vez del DNA e intervienen en procesos tales como la maduración del RNA y la iniciación de la traducción del mRNA. Al comparar las secuencias de aminoácidos de cientos de estos enzimas se ha puesto de manifiesto la existencia de siete regiones extraordinariamente conservadas (Figura 28.25). La localización de estas regiones en la estructura de PcrA revela que cubren el lugar de unión al ATP y la hendidura existente entre los dos dominios, lo cual es compatible con la idea de que las demás helicasas experimentan cambios conformacionales análogos a los descubiertos en PcrA. Sin embargo, mientras que PcrA parece funcionar como un monómero, otros miembros de la familia de las helicasas funcionan como oligómeros. Las estructuras hexaméricas de un grupo importante de helicasas son parecidas a la del componente F₁ de la ATP sintasa (Sección 18.4), lo que sugiere posibles semejanzas en cuanto al mecanismo de acción. En concreto, empleando un mecanismo similar al del "cambio de mecanismo inducido por la unión del DNA", las subunidades de la helicasa sería de esperar que actuasen de un modo concertado para desenrollar la doble hélice, de modo que a medida que una hebra es empujada hacia la zona central del anillo del hexámero, la otra hebra permanece en el exterior. Las helicasas hexaméricas incluyen bucles P y son miembros de una clase de ATPasas conocida como familia AAA.

Enzima progresivo o procesivo

Del latín "procedere", avanzar.

Un enzima que cataliza múltiples rondas de elongación o de digestión de un polímero mientras permanece unido al polímero. Por el contrario, un enzima distributivo se desprende de su sustrato polimérico entre dos etapas catalíticas sucesivas.

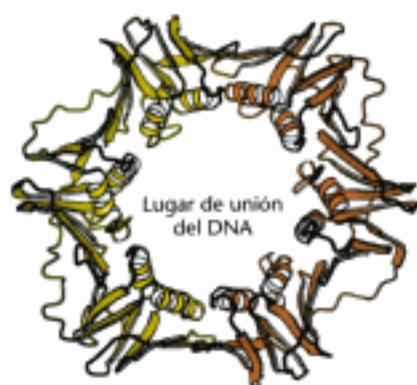


Figura 28.26 Estructura de una abrazadera deslizante. La subunidad dimérica β_2 de la DNA polimerasa III forma un anillo que rodea al DNA dúplex. Obsérvese la cavidad central a través de la cual se desliza el DNA. Al mantenerse abrazada a la molécula de DNA, la polimerasa puede desplazarse sin desprenderse del DNA sustrato. [Tomado de 2POL.pdb.]

28.4 La replicación del DNA exige una extremada coordinación

Teniendo en cuenta el tamaño de los genomas y la velocidad de las divisiones celulares, la replicación del DNA tiene que ser muy rápida. El genoma de *E. coli* contiene 4.6 millones de pares de bases y se copia en menos de 40 minutos. Así pues, se incorporan unas 2000 bases por segundo. Para replicar los genomas completos con precisión y rapidez, las actividades enzimáticas deben estar coordinadas con precisión.

Comenzaremos analizando la coordinación de la replicación del DNA en la bacteria *E. coli*, que ha sido estudiada en profundidad. En este organismo, con un genoma relativamente sencillo, la replicación comienza en un único lugar y continúa a lo largo de todo el cromosoma circular. La coordinación de la replicación del DNA en eucariotas es más compleja ya que hay muchos lugares de iniciación a lo largo del genoma y, además, se requiere un enzima adicional para replicar los extremos de los cromosomas lineales.

La replicación del DNA requiere polimerasas con un elevado nivel de progresividad

Las polimerasas replicativas se caracterizan por su *elevada potencia catalítica, fidelidad y progresividad*. La progresividad (o *procesividad*) indica la capacidad de un enzima para catalizar muchas reacciones consecutivas sin liberarse del sustrato. Estas polimerasas son ensamblajes de muchas subunidades que han evolucionado para agarrarse, literalmente, a sus moldes y no soltarse hasta que se hayan añadido muchos nucleótidos. El origen de la progresividad fue descubierto al determinar la estructura tridimensional de la subunidad β_2 de la DNA polimerasa replicativa de *E. coli*, que se le conoce como DNA polimerasa III (Figura 28.26). Esta subunidad dimérica mantiene a la polimerasa asociada a la doble hélice de DNA. Tiene la forma de un anillo estrellado. Un orificio de 35 Å de diámetro en su centro puede acomodar directamente una molécula de DNA, dejando espacio suficiente entre el DNA y la proteína para

permitir deslizamientos rápidos durante la replicación. Una velocidad catalítica de 1000 nucleótidos polymerizados por segundo requiere el deslizamiento de 100 vueltas del dúplex de DNA por segundo (una longitud de 3400 Å ó 0,34 mm) a través del orificio central de β_2 . Por tanto, β_2 desempeña un papel fundamental en la replicación actuando como una abrazadera que se desliza sobre el DNA.

¿Cómo se consigue que el DNA quede atrapado por la abrazadera? Las polimerasas replicativas contienen también grupos de subunidades que funcionan como un sistema de carga de la abrazadera. Estos sistemas se unen a la abrazadera deslizante y, utilizando la energía de la unión del ATP, desplazan una de las interfases del dímero. De este modo, el DNA puede moverse a través del pequeño hueco generado y acceder al espacio central del enzima. La hidrólisis del ATP libera a continuación a la abrazadera, la cual se cierra sobre el DNA.

Las hebras guía y retardada se sintetizan de forma coordinada

En la horquilla de replicación, las polimerasas replicativas como la DNA polimerasa III sintetizan simultáneamente las hebras guía y retardada (Figura 28.27). La DNA polimerasa III empieza la síntesis de la hebra guía utilizando el RNA cebador creado por la primasa. Por delante de la polimerasa, el DNA dúplex se desenrolla mediante una helicasa hexamérica denominada DnaB. Diversas copias de la proteína que se une a hebras sencillas (SSB, de "single-strand-binding protein") mantienen las hebras separadas de modo que las dos hebras pueden actuar como moldes. La hebra guía se sintetiza de forma continua por la DNA polimerasa III. Al mismo tiempo, la topoisomerasa II introduce superenrollamientos dextrógiros (negativos) para evitar un colapso topológico.

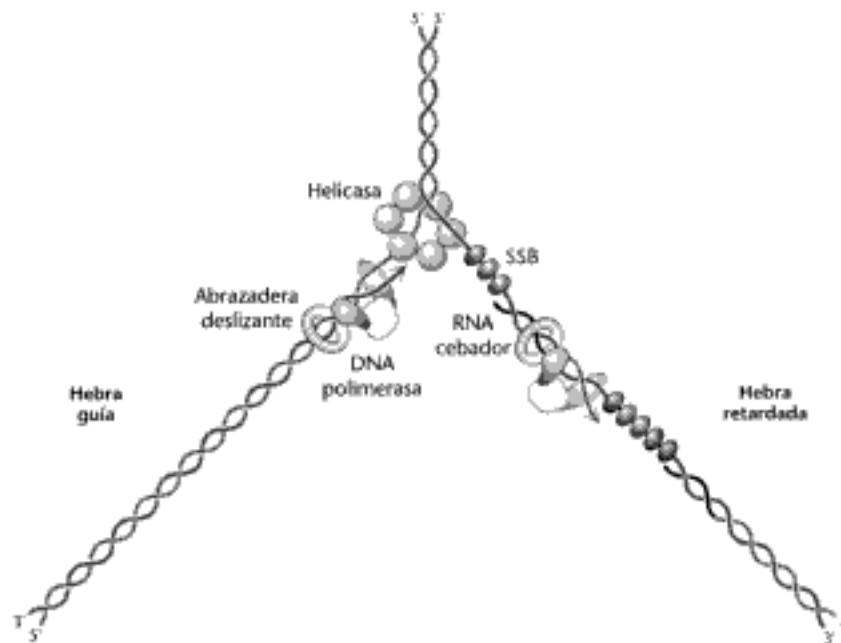


Figura 28.27 Horquilla de replicación. Representación esquemática de la disposición de la DNA polimerasa III y de las proteínas y los enzimas asociados presentes en la horquilla de replicación. La helicasa separa las dos hebras de la doble hélice parental, permitiendo que las DNA polimerasas utilicen cada una de las hebras como el molde para la síntesis de DNA. SSB, del inglés "single-strand-binding protein", proteína de unión al DNA de hebra sencilla.

La forma de sintetizar la hebra retardada es, necesariamente, más complicada. Como se ha mencionado anteriormente, la hebra retardada se sintetiza en forma de fragmentos, de modo que la polimerización $5' \rightarrow 3'$ da lugar al crecimiento global en dirección $3' \rightarrow 5'$. Además, la síntesis de la hebra retardada se coordina con la de la hebra guía. Pero, ¿cómo tiene lugar esta coordinación? El examen de la composición de subunidades del holoenzima DNA polimerasa III ha mostrado una elegante solución (Figura 28.28). El holoenzima contiene dos copias del núcleo catalítico de la polimerasa, que consta de la propia DNA polimerasa (la subunidad α); la subunidad ϵ , una exonucleasa correctora $3' \rightarrow 5'$ (véase p. 807); otra subunidad denominada θ ; y

Hidden page

A continuación, los huecos entre fragmentos de la hebra retardada naciente se llenan por la DNA polimerasa I. Este esencial enzima también utiliza su actividad exonucleasa 5' → 3' para eliminar el RNA cebador localizado por delante del lugar con actividad polimerasa. El cebador no puede ser eliminado por la DNA polimerasa III porque el enzima carece de capacidad para hacer correcciones en el sentido 5' → 3'. Por último, la DNA ligasa empalma los fragmentos.

La replicación del DNA en *Escherichia coli* comienza por un sitio único

En *E. coli*, la replicación del DNA comienza en un único lugar en el seno de las 4.6×10^6 pb que componen el genoma. Este *origen de la replicación*, denominado el *lugar oriC*, es una región de 245 pb que presenta varias características muy particulares (Figura 28.30). El lugar oriC contiene cinco repeticiones de una secuencia que, juntas, actúan como un lugar de unión para la proteína de reconocimiento del origen DnaA. Además, contiene una serie de secuencias de 13 pb dispuestas en tandem enriquecidas en pares de bases A-T. Se requieren varias etapas para preparar al DNA para el inicio de la replicación.



Figura 28.30 Origen de la replicación en *E. coli*. El segmento oriC tiene una longitud de 245 pb. Contiene una disposición en tandem de tres secuencias casi idénticas de 13 nucleótidos (en verde) y cinco lugares de unión (en amarillo) para la proteína DnaA.

1. *La unión de proteínas DnaA al DNA es la primera etapa.* La DnaA es un miembro de la familia NTPasa con bucle P, específicamente es una ATPasa AAA (p. 653). Cada monómero DnaA contiene un dominio ATPasa enlazado a un dominio de unión al DNA situado en su extremo C-terminal. Las moléculas de DnaA son capaces de unirse entre sí a través de los dominios ATPasa; un grupo de moléculas de DnaA unidas intervendrán en la unión y en la hidrólisis del ATP. La unión de varias moléculas de DnaA entre sí indica el inicio de la fase preparativa y su disociación el final de la misma. Las proteínas DnaA se unen a los cinco lugares de alta afinidad del oriC y luego se asocian con otras que están unidas a centros de baja afinidad para formar un oligómero, posiblemente un hexámero cíclico. El DNA se enrolla alrededor del hexámero de DnaA (Figura 28.31).

2. *Las hebras sencillas del DNA se exponen en el complejo precebador.* Con el DNA enrollado alrededor del hexámero de DnaA entran en juego otras proteínas. Se carga la helicasa hexamérica DnaB alrededor del DNA con la ayuda de la proteína de carga de la helicasa DnaC. Se desenrollan localmente regiones del lugar oriC, incluidas las regiones AT, que se atrapan por proteínas de unión a hebra sencilla. El resultado de este proceso es la generación de una estructura denominada *complejo precebador* que hace al DNA de hebra sencilla accesible a otras proteínas. La primasa, DnaG, es ahora capaz de formar el RNA cebador.

3. *Se ensambla el holoenzima polimerasa.* El holoenzima DNA polimerasa III se ensambla sobre el complejo precebador en un proceso iniciado por las interacciones que se establecen entre DnaB y la abrazadera deslizante, que es una subunidad de la DNA polimerasa III. Estas interacciones promueven también la hidrólisis de ATP por las subunidades DnaA, marcando el inicio de la replicación. La disociación del complejo DnaA previene que se inicien rondas de replicación adicionales en el origen de la replicación.

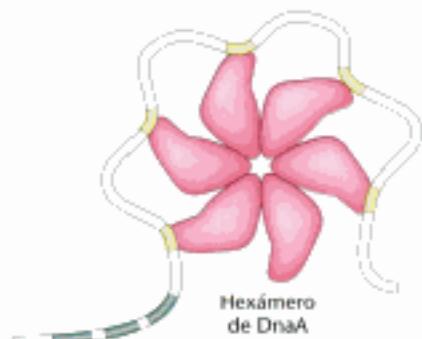


Figura 28.31 Asociación de la DnaA. Monómeros de DnaA se unen a sus respectivos lugares en oriC (en amarillo) y se aproximan para formar una estructura compleja, probablemente similar al hexámero cíclico que se muestra. Esta estructura indica el origen de la replicación y favorece la separación de las dos hebras en las zonas enriquecidas en AT (en verde).

Hidden page

La replicación comienza con la unión de la *DNA polimerasa α*. Este enzima tiene actividad primaria, que sirve para sintetizar el RNA cebador, así como actividad DNA polimerasa. Una vez que se ha añadido un fragmento de unos 20 desoxinucleótidos al cebador, otra proteína de replicación, denominada *factor C de replicación (RFC, "replication factor C")* desplaza a la *DNA polimerasa α* y atrae a una abrazadera deslizante, el *antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA "proliferating cell nuclear antigen")* que es una proteína homóloga a la subunidad β_2 de la polimerasa III de *E. coli*. La unión de PCNA a la *DNA polimerasa δ* hace que el enzima sea muy progresivo y esté capacitado para la replicación de fragmentos largos. La replicación prosigue en ambas direcciones a partir del origen de replicación hasta que replicones adyacentes se encuentran y se fusionan. Los RNA cebadores se eliminan y los fragmentos de DNA se ligan por medio de la *DNA ligasa*.

La utilización de múltiples orígenes de replicación necesita mecanismos que aseguren que cada secuencia se replica una vez y sólo una. Los acontecimientos de la replicación del DNA eucariótico están relacionadas con el *ciclo celular* eucariótico (Figura 28.32). En el ciclo celular, los procesos de síntesis de DNA y división celular (mitosis) están coordinados de modo que la replicación de todas las secuencias de DNA se ha completado antes de que la célula avance hacia la siguiente fase del ciclo. Esta coordinación necesita varios *puntos de control* que controlen la progresión a lo largo del ciclo. Una familia de pequeñas proteínas llamadas *ciclinas* se sintetizan y degradan por digestión en el proteasoma durante el ciclo celular. Las ciclinas actúan uniéndose a *proteína quinasas dependientes de ciclina* específicas y activándolas. Una de estas quinasas es la cdk2 ("cyclin-dependent kinase 2") o quinasa 2 dependiente de ciclina, que se une a complejos en los orígenes de la replicación y regula la replicación a través de diversos mecanismos de interconexión.

Los telómeros son estructuras características de los extremos de cromosomas lineales

Mientras los genomas de prácticamente todos los procariotas son circulares, los cromosomas de los seres humanos y otros eucariotas son lineales. Los extremos libres de las moléculas lineales de DNA introducen varias complicaciones que deben ser resueltas por enzimas especiales. Concretamente, resulta difícil replicar por completo los extremos del DNA porque las polimerasas actúan únicamente en dirección $5' \rightarrow 3'$. La hebra retardada presentaría un extremo $5'$ incompleto tras la eliminación del RNA cebador. Cada ronda de replicación acortaría aún más el cromosoma.

La primera pista sobre cómo se resuelve este problema surgió a partir del análisis de la secuencia de los extremos de los cromosomas, que reciben el nombre de *telómeros* (del griego *telos*, "extremo"). El DNA de los telómeros contiene cientos de repeticiones en tandem de una secuencia de seis nucleótidos. Una de las hebras está Enriquecida en G por su extremo $3'$ y es ligeramente más larga que la otra hebra. En los seres humanos, la secuencia Enriquecida en G que se repite es AGGGTT.

Se ha investigado a fondo la estructura que adoptan los telómeros. Evidencias recientes sugieren que el dúplex estaría formando grandes bucles (Figura 28.33). Se ha sugerido que justo en el extremo de la estructura, la región de hebra sencilla formaría un bucle hacia atrás para crear un dúplex de DNA con otra de las zonas de la secuencia repetida, desplazando una parte del dúplex original del telómero. Esta estructura en forma de lazo se forma y se estabiliza mediante proteínas específicas que se unen a los telómeros. Estas estructuras protegerían y enmascararían perfectamente el extremo del cromosoma.

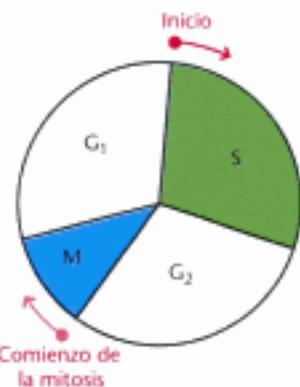


Figura 28.32 Ciclo celular en eucariotas. En eucariotas, la replicación del DNA y la división celular deben ocurrir de modo extremadamente coordinado. La mitosis (M) tiene lugar únicamente después de la síntesis de DNA (S). Dos intervalos de tiempo (G₁ y G₂) separan ambos procesos.



Figura 28.33 Modelo propuesto para los telómeros. Un fragmento de hebra sencilla de la hebra Enriquecida en G se extiende a partir del extremo del telómero. En uno de los modelos de telómero, esta región de hebra sencilla invade el dúplex para formar un gran bucle de dos cadenas.

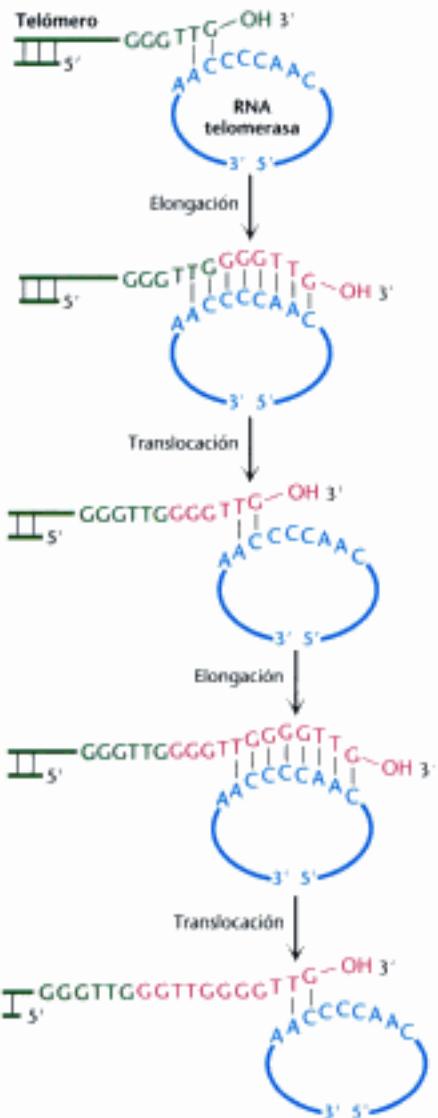


Figura 28.34 Formación de telómeros. Mecanismo de formación de la hebra enriquecida en G del DNA del telómero. El RNA molde de la telomerasa se muestra en azul y los nucleótidos añadidos a la hebra enriquecida en G del cebador se muestran en rojo. [Según E. H. Blackburn. *Nature* 350 (1991):569-573.]

Los telómeros se replican mediante la telomerasa, una polimerasa especializada que lleva su propio molde de RNA

¿Cómo se generan las secuencias repetidas? Se ha purificado y caracterizado un enzima, denominado *telomerasa*, que realiza esta función. Cuando un cebador que termina en GGTT se añade al enzima humano en presencia de desoxinucleósidos trifosfato, se generan las secuencias GGTTAGGGTT y GGTTAGGGTTAGGGTT así como productos más largos. Elizabeth Blackburn y Carol Greider descubrieron que el enzima contiene una molécula de RNA que actúa como molde para la elongación de la hebra enriquecida en G (Figura 28.34). Así, el enzima contiene la información necesaria para generar las secuencias del telómero. El número exacto de secuencias repetidas no es crítico.

Posteriormente también se identificó un componente proteico de las telomerasas. A partir de su secuencia de aminoácidos, este componente está claramente relacionado con las transcriptasas inversas, enzimas descubiertos en primer lugar en los retrovirus que sintetizan una molécula de DNA a partir de RNA. Por tanto, *la telomerasa es una transcriptasa inversa especializada que lleva su propio molde*. Generalmente, la telomerasa tiene un alto nivel de expresión en células de división rápida. Así pues, los telómeros y las telomerasas pueden desempeñar funciones importantes en la biología celular del cáncer y en el envejecimiento celular.

28.5 Se pueden reparar muchos tipos de lesiones en el DNA

Acabamos de examinar cómo genomas incluso muy largos y complejos pueden replicarse con considerable fidelidad. Sin embargo, el DNA puede dañarse, tanto en el curso de la replicación como por otros procesos. La lesión del DNA puede ser tan simple como la incorporación errónea de una única base o puede tener formas más complejas como la modificación química de bases, el entrecruzamiento químico entre dos hebras de la doble hélice o la escisión de uno o dos enlaces fosfodiéster. La consecuencia puede ser la muerte celular o la transformación de la célula, cambios en la secuencia del DNA que pueden ser heredados en generaciones futuras, o bloqueo del propio proceso de replicación. A lo largo de la evolución se han desarrollado un conjunto de sistemas de reparación del DNA que pueden reconocer estos defectos y, en muchos casos, reparar la molécula de DNA. Comenzaremos con algunas de las causas que lesionan el DNA.

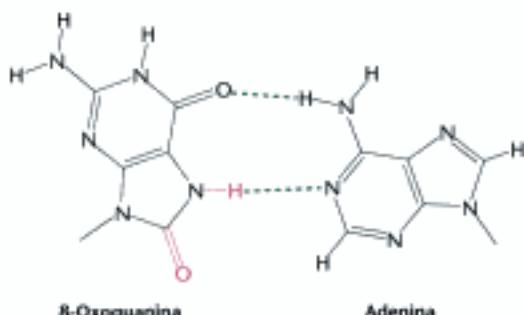
Pueden aparecer errores en la replicación del DNA

Los errores introducidos en el proceso de la replicación son la fuente de error más simple en la doble hélice. Con la adición de las bases, existe la posibilidad de que se incorpore una base incorrecta formando un par distinto al de Watson y Crick. Estas parejas de bases no Watson y Crick pueden distorsionar localmente la doble hélice del DNA. Además, tales emparejamientos incorrectos pueden ser *mutagénicos*, ya que pueden conducir a cambios permanentes en la secuencia del DNA. Cuando se replica una doble hélice que contiene una pareja de bases no Watson y Crick, las dos dobles hélices hijas tendrán diferentes secuencias de bases porque la base incorrecta es muy probable que pueda emparejarse con su base de Watson y Crick. Otros errores además de los emparejamientos incorrectos son las inserciones, delecciones y rupturas de enlaces en una o las dos hebras. Además, las polimerasas replicativas pueden retrasar o incluso bloquear un molde completamente dañado. En consecuencia, la replicación del genoma se puede detener antes de que se complete.

Para resolver tales interrupciones han evolucionado una gran variedad de mecanismos, entre los que se encuentran DNA polimerasas especializadas que pueden replicar un DNA afectado de varias lesiones. Una limitación es que estas polimerasas son mucho más propensas a introducir errores que las polimerasas replicativas normales. No obstante, estas *polimerasas propensas a errores* permiten que se complete

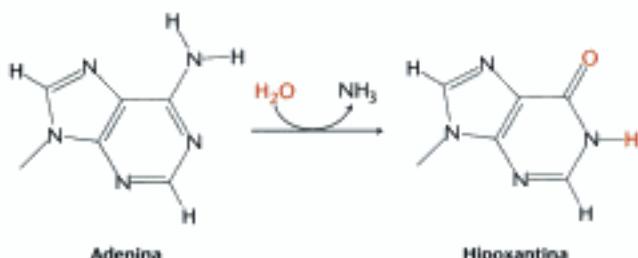
Hidden page

Figura 28.36 Par de bases oxoguanina-adenina. La 8-oxoguanina, producto de la oxidación de la guanina, puede emparejarse con una adenina a través de un átomo de la base que no participa habitualmente en la formación de pares de bases.



elección de pareja es diferente a la de la guanina porque emplea un lateral diferente para el reconocimiento (Figura 28.36). La desaminación es otro proceso potencialmente nocivo. Por ejemplo, la adenina puede desaminarse y formar la hipoxantina (Figura 28.37). Este proceso es mutagénico porque la hipoxantina no se empareja con la timina sino con la citosina. La guanina y la citosina también pueden desaminarse y originar bases que se emparejan de modo distinto a como lo hacen las bases originales.

Figura 28.37 Desaminación de la adenina. La adenina se puede desaminar para formar hipoxantina. La hipoxantina se empareja con la citosina de modo similar a como lo hace la guanina, por lo que esta reacción de desaminación puede producir una mutación.



Además de oxidación y desaminación, las bases de los nucleótidos pueden sufrir una alquilación. Los centros electrofílicos pueden sufrir el ataque de agentes nucleofílicos como el átomo de nitrógeno N-7 de la guanina y adenina para formar conjugados alquilados. Algunos compuestos se convierten en mutágenos extraordinariamente activos por la acción de enzimas que, habitualmente, desempeñan funciones de destoxicificación. Un ejemplo sorprendente es la aflatoxina B₁, un compuesto producido por mohos que crecen en cacahuetes y otros alimentos. Un enzima citocromo P450 (p. 750) convierte este compuesto en un epóxido muy reactivo (Figura 28.38). Este agente reacciona con el átomo de nitrógeno N-7 de la guanosina para formar un conjugado que frecuentemente provoca una transversión G-C a T-A.

El componente ultravioleta de la luz solar es un agente omnipresente perjudicial para el DNA. Su principal efecto consiste en unir covalentemente residuos de pirimidina adyacentes a lo largo de una hebra del DNA (Figura 28.39). Este dímero de pirimidina no puede acomodarse en una doble hélice y, por tanto, la replicación y la expresión génica se bloquean hasta que desaparece la lesión.

Un dímero de timina es un ejemplo de entrecruzamiento dentro de una hebra porque ambas bases están en la misma hebra de la doble hélice. También se pueden in-

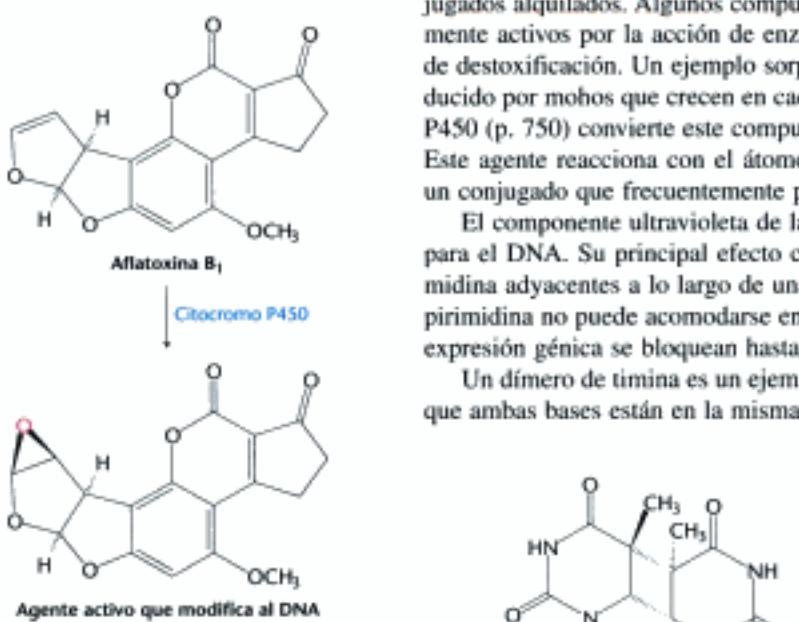


Figura 28.38 Activación de la aflatoxina. El compuesto, producido por el moho que crece sobre los cacahuetes, se activa por el citocromo P450 formando una especie altamente reactiva que modifica bases como la guanina del DNA introduciendo, por tanto, mutaciones.

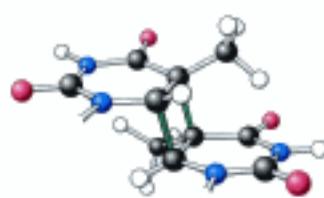


Figura 28.39 Dímero entrecruzado de dos bases de timina. La luz ultravioleta provoca la formación de enlaces cruzados entre pirimidinas adyacentes a lo largo de una hebra de DNA.

troducir por diversos agentes enlaces cruzados entre bases de hebras opuestas. Los psoralenos son compuestos producidos por una hierba china que forman enlaces cruzados entre hebras opuestas (Figura 28.40). Estos enlaces distorsionan la replicación porque impiden la separación de las hebras.

La radiación electromagnética de alta energía, como la exposición a los rayos X, puede provocar lesiones en el DNA al generar concentraciones elevadas de especies de oxígeno reactivas en disolución. La exposición a los rayos X puede inducir lesiones en el DNA de naturaleza diversa incluyendo escisiones de enlaces en una o las dos hebras del DNA. La capacidad para provocar este tipo de lesiones, impulsó a Hermann Muller a descubrir los efectos mutagénicos de los rayos X en *Drosophila* en 1927. Este descubrimiento contribuyó al desarrollo de la *Drosophila* como el primer organismo para estudios genéticos.

Las lesiones en el DNA pueden detectarse y repararse mediante una gran diversidad de sistemas

Para proteger la integridad del mensaje genético, todos los organismos contienen un amplio espectro de sistemas de reparación del DNA. Muchos de ellos reparan el DNA empleando la información de la secuencia de la hebra no modificada. Estos sistemas de reparación de hebra única siguen un patrón similar en su mecanismo:

1. Reconocen la(s) base(s) que no encajan
2. Eliminan la(s) base(s) alteradas
3. Reparan el hueco generado utilizando una DNA polimerasa y una DNA ligasa.

Más adelante se considerarán varios ejemplos de sistemas de reparación. Aunque muchos de ellos están tomados de *E. coli*, en la mayoría de los organismos, incluyendo los seres humanos, operan sistemas de reparación comparables.

Las propias DNA polimerasas replicativas son capaces de corregir muchos de los errores de emparejamiento producidos en el curso de la replicación. Por ejemplo, la subunidad ε de la DNA polimerasa III de *E. coli* opera como una exonucleasa 3' → 5'. Este dominio exonucleasa elimina los nucleótidos mal emparejados mediante hidrólisis a partir del extremo 3' del DNA. ¿Cómo percibe el enzima si la base recién añadida es la correcta? A medida que se sintetiza la nueva hebra de DNA, ésta se comprueba. Si se incorpora una base errónea, la síntesis de DNA se detiene por la dificultad de encajar una pareja de bases no Watson y Crick en el interior de la polimerasa. Además, y posibilitado por la debilidad de sus puentes de hidrógeno, la base tendrá un mayor grado de fluctuación estructural. En suma, la pausa de la replicación proporciona un tiempo adicional para que las fluctuaciones estructurales desplacen la hebra con el nucleótido recién incorporado erróneo desde el centro activo de la polimerasa al centro activo de la exonucleasa (Figura 28.41). Allí los nucleótidos de la hebra se degradan uno a uno hasta que la hebra retorna al centro activo de la polimerasa y la síntesis de DNA continúa.

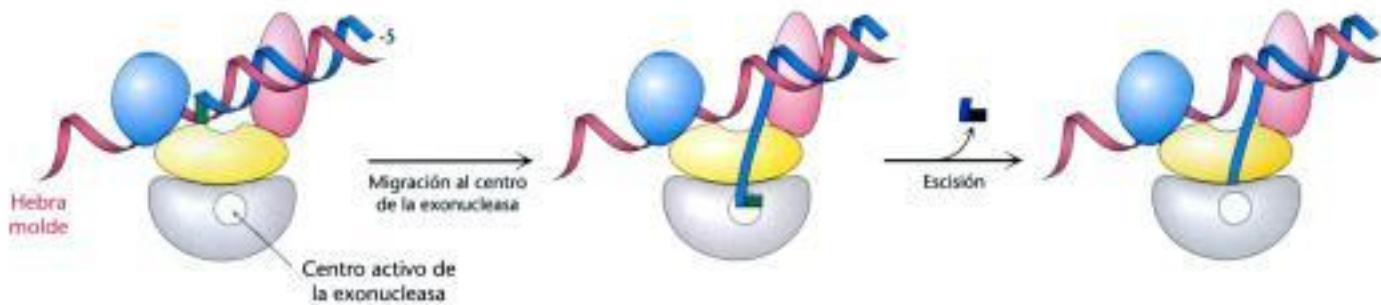


Figura 28.41 Corrección de pruebas. Esporádicamente la cadena polinucleotídica en formación abandona el centro activo de la polimerasa y migra al centro activo de la exonuclease. Allí se escinden uno o más residuos de la cadena en formación, eliminándose de esta forma bases potencialmente incorrectas.

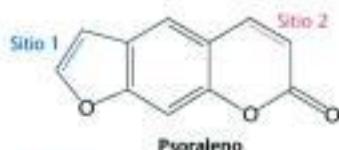


Figura 28.40 Un reactivo de entrecruzamiento. El psoraleno y sus derivados pueden formar enlaces cruzados entre las dos hebras del DNA a través de dos lugares reactivos, que pueden formar complejos con las bases de los nucleótidos.

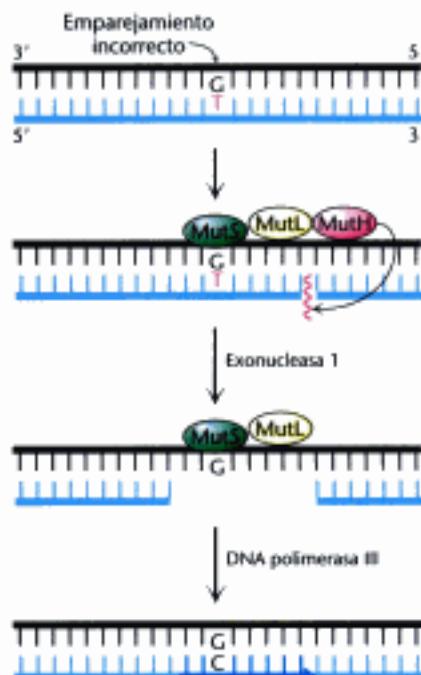


Figura 28.42 Reparación de emparejamientos incorrectos. En el DNA de *E. coli*, la reparación de los emparejamientos incorrectos se inicia con la intervención de las proteínas MutS, MutL y MutH. MutS reconoce el emparejamiento incorrecto G-T, MutH escinde el esqueleto en las proximidades del emparejamiento incorrecto. El fragmento de la hebra de DNA que contiene la T errónea se elimina por medio de la exonuclease I y se sintetiza uno nuevo por la DNA polimerasa III. [Según R. F. Service. Science 263 (1994):1559-1560.]

Prácticamente todas las células poseen un segundo mecanismo para corregir los errores de la replicación que no son corregidos por el sistema anterior (Figura 28.42). Los sistemas de *reparación de emparejamientos incorrectos* contienen al menos dos proteínas, una para la detección del emparejamiento erróneo y la otra para el reclutamiento de una endonucleasa que escinda a la hebra de DNA recién sintetizada en una zona próxima a la lesión y, de este modo, facilite su reparación. En *E. coli* estas proteínas se denominan MutS y MutL y la endonucleasa, MutH.

Un ejemplo de *reparación directa* es la ruptura fotoquímica de dímeros de pirimidina. Prácticamente todas las células contienen un *enzima fotorreactivo*, la *DNA fotoliasa*. El enzima de *E. coli*, una proteína de 35 kd unida a los cofactores N^5,N^{10} -meneniltetrahidrofolato y flavina adenina dinucleótido (FAD), se une a la región distorsionada del DNA. El enzima utiliza la energía de la luz. Concretamente, la absorción de un fotón por parte del coenzima N^5,N^{10} -meneniltetrahidrofolato posibilita que la DNA fotoliasa adquiera un estado excitado capaz de escindir el dímero en sus bases originales.

La escisión de bases modificadas como la 3-metiladenina por el enzima *AlkA* de *E. coli* es un ejemplo de *reparación por escisión de bases*. La unión de este enzima al DNA dañado desplaza la base afectada hacia el exterior de la doble hélice del DNA y la introduce en el centro activo del enzima (Figura 28.43). A continuación, el enzima actúa como una *glicosilasa*, rompiendo el enlace glicosídico y liberando la base dañada. En este punto, el esqueleto polinucleotídico del DNA permanece intacto pero le falta una base. Este hueco recibe el nombre de *lugar AP* porque es apurínico (está desprovisto de A o G) o apirimidínico (desprovisto de C o T). Una *endonucleasa AP* reconoce este defecto y provoca un corte en el esqueleto justo al lado de la base ausente. La *desoxirribosa fosfodiesterasa* escinde la unidad residual de desoxirribosa fosfato y la DNA polimerasa I inserta un nucleótido intacto según los dictados de la base correcta de la hebra complementaria. Por último, la hebra reparada se recomponen por medio de la DNA ligasa.

Uno de los ejemplos mejor conocidos de *reparación por escisión de nucleótidos* es la escisión de dímeros de pirimidina. En *E. coli*, hay tres actividades enzimáticas que resultan esenciales para este mecanismo de reparación (Figura 28.44). En primer lugar, un complejo enzimático formado por las proteínas codificadas por los genes *uvrABC* detectan la distorsión provocada por el dímero de pirimidina. A continuación, el enzima *uvrABC* corta la hebra de DNA dañada por dos sitios, a una distancia de 8 nucleótidos del dímero por el lado del extremo 5' y a una distancia de 4 nucleótidos por el lado del extremo 3'. Posteriormente, el oligonucleótido de 12 residuos escindido por

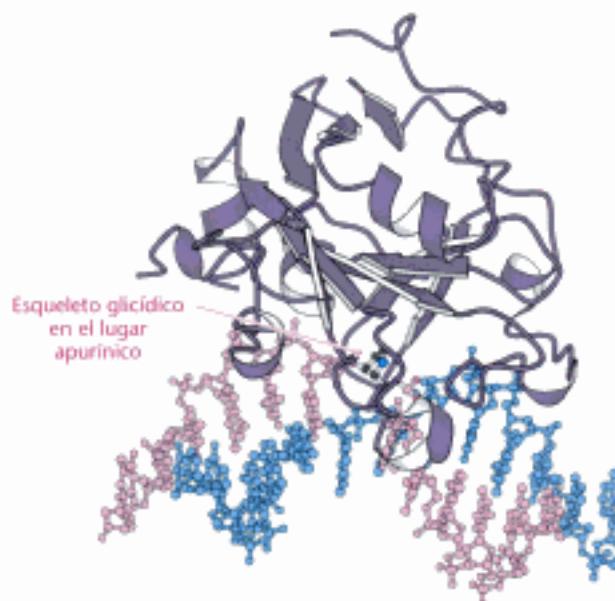


Figura 28.43 Estructura de un enzima de reparación del DNA. Complejo formado por el enzima de reparación del DNA AlkA y un análogo de DNA al que le falta una base purínica (un lugar apurínico). Obsérvese que la desoxirribosa apurínica se desplaza hacia el exterior de la doble hélice del DNA y se introduce en el centro activo del enzima. [Tomado de 1BNK.pdb.]

Figura 28.44. Reparación por escisión de nucleótidos. Reparación de una región del DNA que contiene un dímero de timina mediante la acción secuencial de una escinucleasa específica, una DNA polimerasa y una DNA ligasa. El dímero de timina se representa en color azul y la nueva región de DNA en rojo. [Según P. C. Hanawalt. *Endeavour* 31 (1982):83.]

esta *escinucleasa* de elevada especificidad (del latín *excī*, "cortar") se aleja por difusión. La DNA polimerasa I se instala en el hueco para llevar a cabo la síntesis reparadora. El extremo 3' de la hebra escindida es el cebador y la hebra complementaria intacta es el molde. Por último, el extremo 3' del fragmento de DNA recién sintetizado y la región original de la cadena de DNA se unen por medio de la DNA ligasa.

La DNA ligasa es capaz de sellar escisiones sencillas en el esqueleto de una hebra de DNA. Pero se requieren otros sistemas para reparar las rupturas en ambas hebras que estén lo suficientemente próximas para que puedan separar el DNA en dos dobles hélices. Hay varios mecanismos capaces de reparar estas lesiones. Uno de ellos es el que se conoce como *unión de extremos no homólogos* (NHEJ, del inglés "*nonhomologous end joining*"). El mecanismo de NHEJ no depende de otras moléculas de DNA. Los extremos libres de la doble hélice se unen gracias a la acción de un heterodímero formado por las proteínas Ku70 y Ku80. Estas dos proteínas estabilizan los extremos del DNA y los etiquetan para su posterior tratamiento. Mediante mecanismos que aún no se conocen en profundidad, los heterodímeros Ku70/80 van a actuar a modo de indicadores que otras proteínas reconocen para aproximar los dos extremos de las dos dobles hélices y así conseguir que otros enzimas puedan recomponer la ruptura.

Operan otros sistemas alternativos en las células para la reparación de escisiones de las dos hebras cuando existe un segmento de doble hélice de DNA intacto con secuencia idéntica o muy similar a la dañada. Estos procesos de reparación emplean la recombinación homóloga, que se presenta en la Sección 28.6.

En el DNA, la presencia de timina en lugar de uracilo permite la reparación de las citosinas desaminadas

 La presencia en el DNA de timina en lugar de uracilo fue un enigma durante muchos años. Ambas bases se emparejan con la adenina. La única diferencia entre ellas es la presencia de un grupo metilo en la timina en lugar del átomo de hidrógeno unido al C-5 en el uracilo. ¿Por qué se utiliza una base metilada en el DNA y no en el RNA? La existencia de un sistema de reparación activo para corregir la desaminación de la citosina proporciona una solución convincente a este enigma.

En el DNA la citosina experimenta una desaminación espontánea para formar uracilo con una velocidad apreciable. La desaminación de la citosina es potencialmente mutagénica porque el uracilo se empareja con la adenina y, por tanto, una de las hebras hijas contendrá un par de bases U-A en lugar del par de bases original C-G. Esta mutación se evita mediante un sistema de reparación que reconoce al uracilo como un componente ajeno al DNA (Figura 28.45). Este enzima de reparación, la *uracilo-DNA glicosilasa*, es homólogo a AlkA. El enzima hidroliza el enlace glicosídico entre el uracilo y la desoxirribosa sin atacar a los nucleótidos que contienen timina. El lugar AP que se genera se repara con la reinserción de una citosina. Por tanto, *el grupo metilo de la timina es un distintivo que diferencia a la timina de la citosina desaminada*. Si el DNA no utilizase timina, el uracilo colocado correctamente en su sitio sería indistinguible del uracilo formado por desaminación. El defecto permanecería inadvertido y, por tanto, un par de bases C-G mutaría necesariamente a U-A en una de las moléculas hijas de DNA. Esta mutación se evita mediante un sistema de reparación que busca uracilos y no afecta a la timina. *En el DNA se utiliza timina en lugar de uracilo para incrementar la fidelidad de la información genética*.

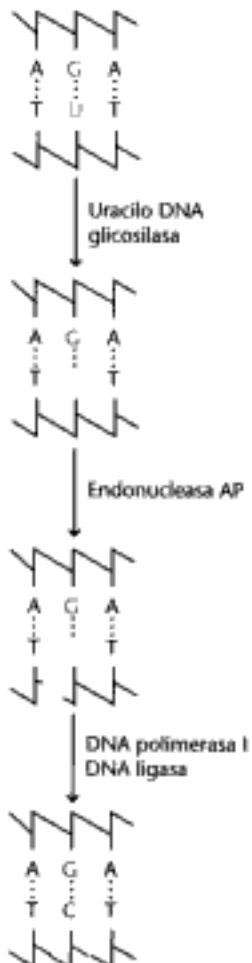
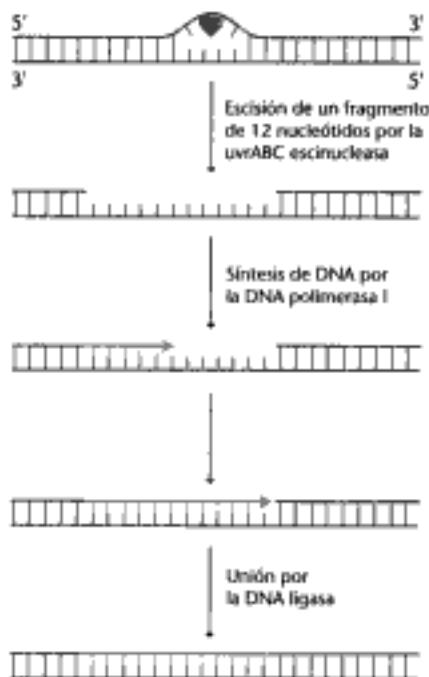


Figura 28.45. Reparación del uracilo. En el DNA, el uracilo formado por la desaminación espontánea de la citosina se escinde y se reemplaza por citosina.

Hidden page

Muchos carcinógenos potenciales se pueden detectar por su acción mutagénica en bacterias

Muchos cánceres humanos se deben a la exposición a ciertos productos químicos. Es importante identificar estos compuestos y determinar su potencia, de modo que se pueda reducir al mínimo la exposición del hombre a ellos. Bruce Ames diseñó un test sencillo y sensible para detectar mutágenos químicos. En el *test de Ames*, se coloca sobre una placa de Petri una fina capa de agar-agar que contiene aproximadamente 10^9 bacterias de una cepa de *Salmonella* especialmente diseñada para detectar mutaciones. Estas bacterias son incapaces de crecer en ausencia de histidina, porque presentan una mutación en uno de los genes para la biosíntesis de este aminoácido. La adición de un mutágeno químico en el centro de la placa da lugar a multitud de nuevas mutaciones. Una pequeña fracción de ellas revierte la mutación original, y pueden sintetizar histidina. Estos *revertentes* se multiplican en ausencia de un aporte externo de histidina y aparecen en forma de colonias discretas después de haber incubado la placa durante 2 días a 37 °C (Figura 28.46). Así, por ejemplo, 0,5 mg de 2-aminoantraceno dan lugar a 11 000 colonias revertentes, en comparación con los sólo 30 revertentes espontáneos que aparecen en su ausencia. Se puede ensayar fácilmente una serie de concentraciones de un producto químico para generar una curva dosis-respuesta. Por lo general, estas curvas son lineales, lo que sugiere que no existe un umbral de concentración para la mutagénesis.

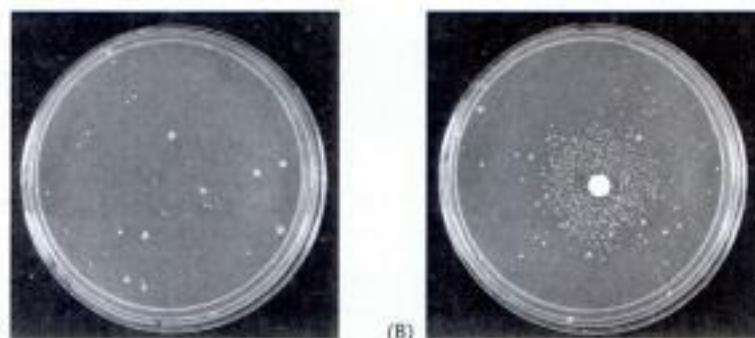


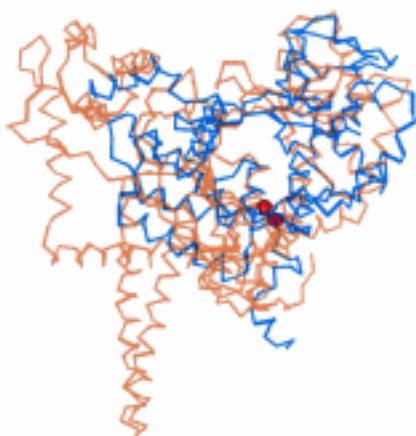
Figura 28.46 Test de Ames. (A) Una placa de Petri que contiene aproximadamente 10^9 bacterias de *Salmonella* que no pueden sintetizar histidina y (B) una placa de Petri que contiene un disco de papel de filtro con un mutágeno que provoca un gran número de revertentes que sí pueden sintetizar histidina. Al cabo de 2 días, los revertentes aparecen como anillos de colonias alrededor del disco. El escaso número de colonias visibles en la placa A son revertentes espontáneos. [Tomado de B. N. Ames, J. McCann y E. Yamasaki. *Mutat. Res.* 31 (1975): 347-364.]

Algunas de las cepas que detectan mutaciones responden a *sustituciones de pares de bases*, mientras que otras detectan *eliminaciones o adiciones de pares de bases (cambios en el marco de lectura)*. Eliminando genéticamente sus sistemas de reparación por escisión se ha incrementado la sensibilidad de estas cepas especialmente diseñadas. Los mutágenos potenciales acceden fácilmente a las cepas que detectan mutaciones porque en ellas la barrera de lipopolisacárido que normalmente recubre la superficie de *Salmonella* está incompleta. Una característica fundamental de este sistema de detección es la inclusión de un *homogenado de hígado de mamífero*. Recordemos que algunos carcinógenos potenciales como la aflatoxina se convierten en sus formas activas por medio de sistemas enzimáticos del hígado o de otros tejidos de mamífero. Las bacterias carecen de estos enzimas, y por tanto, la placa donde se realiza el test necesita unos pocos miligramos de un homogenado de hígado que active a este grupo de mutágenos.

Se ha generalizado el uso del test de la *Salmonella* para ayudar a evaluar los riesgos mutagénicos y carcinogénicos de un gran número de productos químicos. Este ensayo bacteriano rápido y barato para evaluar la capacidad mutagénica complementa los estudios epidemiológicos y los tests con animales que son, necesariamente, más lentos,

Hidden page

Hidden page



 **Figura 28.50 Recombinasas y topoisomerasa I.** Al superponer la recombinasa Cre (en azul) y la topoisomerasa I (en naranja) se observa que estos dos enzimas poseen un núcleo estructural común. En ambos enzimas, las posiciones de los residuos de tirosina que participan en las reacciones de escisión del DNA se representan como esferas rojas. [Tomado de 2CRX.pdb y 1A31.pdb.]

Cuatro moléculas del enzima y sus dos moléculas de DNA asociadas se juntan para formar una *sinapsis de recombinación*. La reacción comienza con la escisión de una de las hebras de cada dúplex. El grupo hidroxilo en posición 5' de cada una de las hebras escindidas permanece libre, mientras que el grupo fosforilo en posición 3' se une a un residuo específico de tirosina de la recombinasa. Los extremos 5' libres invaden al otro dúplex de la sinapsis y atacan las unidades DNA-tirosina para formar nuevos enlaces fosfodiéster y dejar libres los residuos de tirosina. Estas reacciones dan lugar a la formación de una unión de Holliday. A continuación, esta unión puede isomerizarse para originar una estructura en la que las cadenas de polinucleótido del centro de la estructura se reorientan. A partir de esta unión, los procesos de escisión de las hebras y formación de enlaces fosfodiéster se repiten. El resultado es una sinapsis formada por dos dúplex recombinados. La disociación de este complejo origina los productos recombinados finales.

La recombinasa Cre cataliza la formación de uniones de Holliday así como de su resolución. Otras proteínas, por el contrario, se unen a las uniones de Holliday que se han formado mediante otros procesos y las transforman en dúplex separados. En muchos casos estas proteínas también promueven la *migración de rama*, proceso mediante el cual una unión de Holliday se desplaza a lo largo de las dos dobles hélices componentes. La migración de rama puede definir qué segmentos de DNA se intercambian en un proceso de recombinación.

Algunas recombinasas están relacionadas evolutivamente con las topoisomerasas

 Los intermediarios que se forman en las reacciones de recombinación, junto con sus conjugados de tirosina con grupos fosforilo libres en posición 3' nos recuerdan a los intermediarios que se forman en las reacciones catalizadas por las topoisomerasas. Este parecido en los mecanismos refleja relaciones evolutivas más profundas. Al examinar las estructuras tridimensionales de las recombinasas similares a Cre y de las topoisomerasas de tipo I se observa que estas proteínas están emparentadas por evolución divergente, a pesar de que hay poca similitud en sus secuencias de aminoácidos (Figura 28.50). A partir de esta perspectiva, se puede considerar la actividad de la recombinasa como una reacción intermolecular de la topoisomerasa. En cada caso se forma un conjugado tirosina-DNA. En una reacción de la topoisomerasa, este conjugado desaparece cuando el grupo hidroxilo en posición 5' del mismo dúplex ataca para volver a formar el mismo enlace fosfodiéster que se escindió inicialmente. En una reacción de recombinación, el grupo hidroxilo atacante en posición 5' proviene de una cadena de DNA que en un principio no estaba conectada con el grupo fosforilo que participa en el enlace fosfodiéster.

Resumen

28.1 El DNA puede adoptar diversas formas estructurales

Desde el punto de vista estructural, el DNA es una molécula dinámica que puede adoptar diversas formas helicoidales: DNA-A, DNA-B (la hélice clásica de Watson y Crick) y DNA-Z. El DNA se puede doblar, torcer y desenrollar. En las formas A, B y Z del DNA hay dos cadenas antiparalelas que se mantienen juntas por los pares de bases de Watson y Crick y por las interacciones entre las bases apiladas de una misma hebra. El esqueleto azúcar-fosfato se localiza en el exterior y las bases en el interior de la doble hélice. El DNA-A y el DNA-B son hélices dextrógiras. En el DNA-B los pares de bases son prácticamente perpendiculares al eje de la hélice. En el DNA-A las bases están inclinadas. Una característica estructural importante de la hélice B es la presencia de surcos mayores y menores, que exhiben diferentes aceptores y dadores potenciales de puentes de hidrógeno, según su secuencia de bases. El análisis con rayos X de cristales de moléculas idénticas de DNA-B revela que la estructura es mucho más variable de lo que en un principio se imaginaba. La mayor parte del DNA de la célula está en forma B.

28.2 El DNA de doble hebra se puede enrollar sobre sí mismo para formar estructuras superenrolladas

815

Resumen

Una propiedad topológica fundamental del DNA es su número de enlace (Lk), que se define como el número de veces que una hebra del DNA se enrolla alrededor de la otra en el sentido dextrógiro cuando el eje del DNA se encuentra confinado en un plano. Moléculas con distinto número de enlace son topoisómeros entre sí, y se pueden interconvertir mediante un simple corte en una o las dos hebras de DNA; estas reacciones están catalizadas por las topoisomerasas. Por regla general, cambios en el número de enlace dan lugar a cambios tanto en el número de vueltas de la doble hélice como en el número de vueltas de la superhélice. La topoisomerasa II cataliza la introducción, dirigida por el ATP, de superenrollamientos negativos, haciendo que el DNA sea más compacto y más susceptible al desenrollamiento. El DNA superenrollado se relaja por medio de las topoisomerasas I y II. La topoisomerasa I actúa escindiendo transitoriamente una de las hebras de una doble hélice de DNA mientras que la topoisomerasa II introduce rupturas transitorias simultáneamente en las dos hebras.

28.3 La replicación del DNA tiene lugar por la polimerización de desoxirribonucleósidos trifosfato a lo largo de un molde

Las DNA polimerasas son enzimas que actúan dirigidas por un molde, catalizando la formación de enlaces fosfodiéster mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en posición 3' sobre el átomo de fósforo más interno de un desoxirribonucleósido 5'-trifosfato. La complementariedad de formas de las bases correctamente emparejadas es crucial para asegurar una incorporación de bases fidedigna. Las DNA polimerasas no pueden comenzar las cadenas *de novo*; se necesita un cebador con un grupo hidroxilo libre en posición 3'. Así, la síntesis de DNA se inicia con la síntesis de un RNA cebador, lo cual es tarea de la primasa, una RNA polimerasa especializada. Después de actuar como cebador, el RNA es degradado y sustituido por DNA. Las DNA polimerasas siempre sintetizan la hebra de DNA en la dirección 5' → 3'. Para que se puedan sintetizar ambas hebras del DNA simultáneamente en la misma dirección, una hebra se sintetiza de forma continua mientras que la otra se sintetiza en fragmentos, conocidos como fragmentos de Okazaki. Los huecos entre los fragmentos se sueldan por las DNA ligasas. Unas helicasas dirigidas por ATP allanan el camino para la replicación del DNA, separando las hebras de la doble hélice.

28.4 La replicación del DNA exige una extremada coordinación

Las DNA polimerasas replicativas tienen una elevada progresividad; es decir, catalizan la adición de muchos nucleótidos sin disociarse del molde. Un contribuyente importante para la progresividad es la abrazadera que se desliza sobre el DNA, la subunidad β dimérica de la polimerasa replicativa de *E. coli*. La abrazadera deslizante tiene una estructura anular que rodea a la doble hélice de DNA y mantiene asociado el enzima al DNA. El holoenzima DNA polimerasa es una enorme máquina de copia de DNA formado por dos enzimas DNA polimerasas, cada uno actuando sobre una de las hebras molde, que se asocian con otras subunidades entre las que se encuentran la abrazadera deslizante y el cargador de la abrazadera.

Las hebras guía y retardada se sintetizan de forma coordinada. A medida que la polimerasa replicativa se desplaza a lo largo del DNA molde, la hebra guía se sintetiza de forma continua mientras que la hebra retardada forma bucles cuya longitud cambia en el curso de la formación de cada fragmento de Okazaki. El modo de acción se describe como el modelo del trombón.

La replicación del DNA se inicia en un único lugar del genoma de *E. coli*. Un grupo de proteínas específicas reconocen este origen de replicación y ensamblan los enzimas necesarios para la síntesis del DNA, incluyendo una helicasa que promueve la separación de las hebras. La iniciación de la replicación en eucariotas es más compleja. La síntesis de DNA se inicia en miles de

Hidden page

Hidden page

Hidden page

3. Una transición cooperativa. La transición de la forma B del DNA al DNA-Z transcurrió con un pequeño cambio en la densidad de la superhélice, que indica que la transición es cooperativa.

(a) Consideremos una molécula de DNA en el punto medio de esta transición. ¿Será frecuente encontrar regiones de DNA-B y de DNA-Z entremezcladas o habrá largos segmentos de cada una de ellas?

(b) ¿Qué indica este hallazgo acerca de la energía necesaria para formar una conexión entre los dos tipos de hélice?

(c) ¿Cabe esperar que la transición de DNA-B a DNA-A sea más cooperativa que la transición de DNA-B a DNA-Z o menos? ¿Por qué?

4. Motores moleculares en la replicación. (a) ¿A qué velocidad gira el DNA molde (expresada en revoluciones por segundo) en una horquilla de replicación de *E. coli*? (b) ¿Cuál es la velocidad de movimiento (en micrómetros por segundo) del holoenzima DNA polimerasa III con respecto al molde?

5. Más tenso que un tambor. ¿Por qué se detendría la replicación en ausencia de la topoisomerasa II?

6. Telómeros y cáncer. La telomerasa no es activa en la mayor parte de las células humanas. Algunos biólogos del cáncer han sugerido que la activación del gen de la telomerasa sería un requisito para que la célula se vuelva cancerosa. Explicar por qué podría ser este el caso.

7. Desplazamiento de la muesca. Supongamos que se desea preparar una muestra de DNA de doble hebra muy radiactiva para utilizarla como sonda de DNA. Se dispone de una DNA endonucleasa que escinde el DNA generando grupos -OH en posición 3' y grupos fosfato en posición 5', una DNA polimerasa I intacta y dNTPs radiactivos. Sugerir un método para generar el DNA radiactivo.

8. Marcas reveladoras. Supongamos que se inicia la replicación en un medio que contiene timina tritiada moderadamente radiactiva. Al cabo de unos pocos minutos de incubación, se transfieren las bacterias a un medio que contiene timina tritiada muy radiactiva. Dibujar un esquema del patrón de autorradiografía que se obtendría (a) en el caso de replicación unidireccional y (b) en el caso de replicación bidireccional a partir de un único origen.

9. Rastro mutagénico. Supongamos que hemos tratado el RNA de hebra sencilla del virus del mosaico del tabaco con un producto químico mutagénico, que se obtuvieron mutantes que contienen en una posición específica serina o leucina en vez de prolina y que el tratamiento ulterior de estos mutantes con el mismo mutágeno produjo fenilalanina en esa posición.



(a) ¿Cuáles son los posibles codones asignados a estos cuatro aminoácidos?

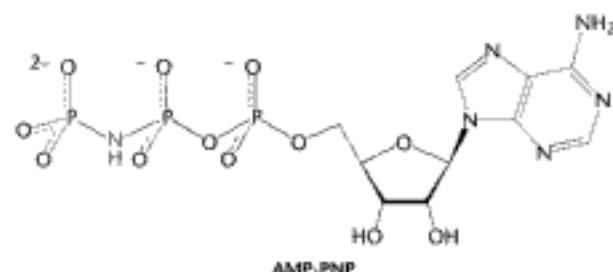
(b) ¿De qué mutágeno se trataba, 5-bromouracilo, ácido nítrico o un colorante de acridina?

10. Espectro inducido. Las DNA fotolíasisas convierten la energía de la luz en las regiones del ultravioleta cercano o visible (300-500 nm) en energía química para romper el anillo de ciclobutano de los dímeros de pirimidina. En ausencia de sustrato, estos enzimas foto-

reactivos no absorben luz de longitud de onda superior a 300 nm. ¿Cuál es la ventaja de la absorción inducida por el sustrato?

Problema de mecanismos

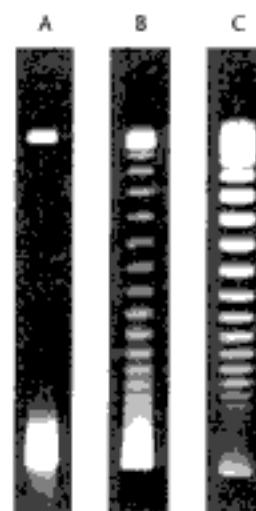
11. Un análogo revelador. AMP-PNP, el análogo β , γ -imido del ATP, se hidroliza muy lentamente por la mayoría de las ATPasas.



La adición de AMP-PNP a la topoisomerasa II y al DNA circular origina el superenrollamiento negativo de una única molécula de DNA por molécula de enzima. El DNA permanece unido al enzima en presencia de este análogo. ¿Qué sugiere este hallazgo sobre el mecanismo de la catálisis?

Problemas de interpretación de datos y de integración de los capítulos

12. Como una escalera. Se aisló el DNA circular del virus SV40 y se sometió a electroforesis en gel. Los resultados se muestran en la calle A (el control) de los geles adjuntos.



(a) ¿Por qué se separa el DNA en una electroforesis en gel de agarosa? ¿En qué se diferencia el DNA de cada banda?

A continuación, el DNA se incubó con la topoisomerasa I durante 5 minutos y, de nuevo, se analizó mediante electroforesis en gel, con los resultados que se muestran en la calle B.

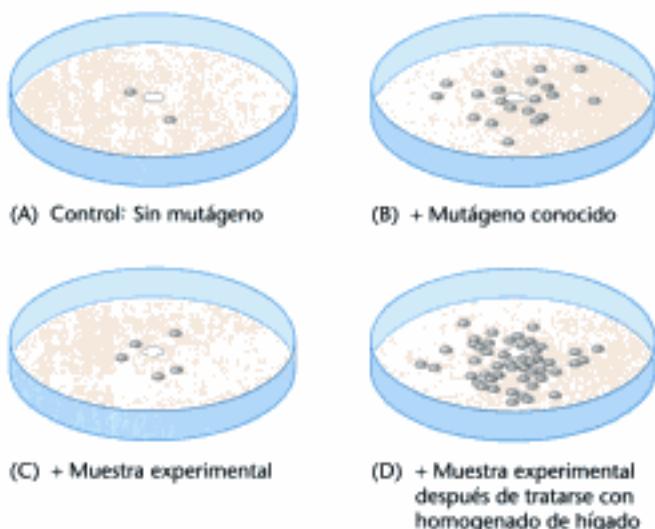
(b) ¿A qué tipos de DNA representa cada una de las distintas bandas?

Se incubó otra muestra de DNA con la topoisomerasa I durante 30 minutos y también se analizó, como se indica en la calle C.

(c) ¿Qué significa el hecho de encontrar más DNA en las formas de movilidad reducida?

13. *Prueba de Ames.* La ilustración adjunta muestra cuatro placas de Petri utilizadas para la prueba de Ames. Se impregnaron trozos de papel de filtro (el círculo blanco del centro de cada placa) en cada una de las cuatro preparaciones distintas y a continuación se colocaron en una placa de Petri. Las cuatro preparaciones contenían (A) agua pura (control), (B) un mutágeno conocido, (C) un producto químico cuya capacidad mutagénica se está investigando, y (D) el mismo producto químico tras ser tratado con un homogenizado de hígado. En cada caso se determinó el número de revertentes, que se manifiestan en forma de colonias visibles sobre la placa de Petri.

- ¿Cuál es el propósito de la placa control, expuesta simplemente al agua?
- ¿Por qué es conveniente utilizar un mutágeno conocido en el sistema experimental?
- ¿Cómo se interpretan los resultados obtenidos con el producto experimental?
- ¿Qué componentes del hígado podrían ser responsables de los efectos observados en la preparación D?



Hidden page

Uno de los aspectos más sorprendentes es la maduración de los precursores del mRNA, que está catalizada por los espliceosomas, que están formados por pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs). En estos complejos, las moléculas de RNA pequeño nuclear (snRNA) desempeñan un papel crucial, tanto a la hora de dirigir el alineamiento de los lugares de corte y empalme como a la hora de intervenir en la catálisis. De hecho, algunas moléculas de RNA pueden madurar por sí mismas, en ausencia de proteínas. Este hallazgo fundamental, realizado por Thomas Cech y Sidney Altman, puso de manifiesto que las moléculas de RNA pueden actuar como catalizadores y ha influido notablemente en nuestra visión de la evolución molecular.

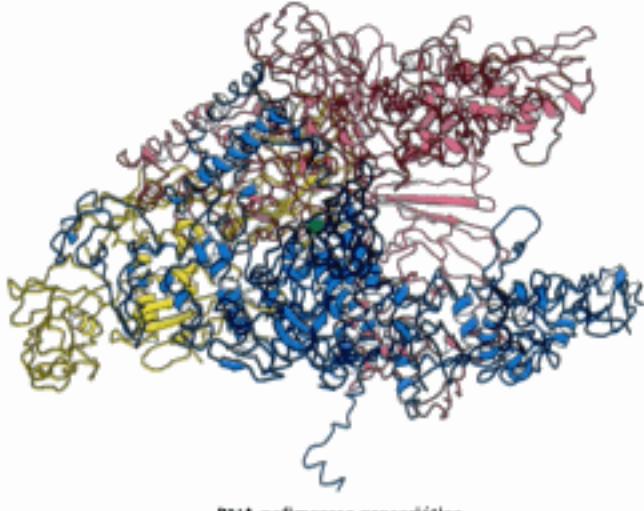
La maduración del RNA no es una mera curiosidad. Al menos un 15 % de todas las enfermedades genéticas se deben a mutaciones que afectan a la maduración del RNA. Y no sólo eso, un mismo pre-mRNA puede madurar de forma distinta en función del tipo de célula, de sus diferentes fases de desarrollo o como respuesta a otras señales biológicas. Además, en algunas moléculas de pre-mRNA se cambian ciertas bases mediante un proceso denominado *corrección del RNA*. Una de las mayores sorpresas de la secuenciación del genoma humano fue que tan solo se identificaron unos 25 000 genes cuando se había estimado previamente que habría 100 000 o más. La capacidad de un gen para codificar más de un mRNA distinto (y, por tanto, más de una proteína) por medio de maduraciones alternativas puede tener un papel clave en la expansión del repertorio de nuestros genomas.

La síntesis del RNA consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación

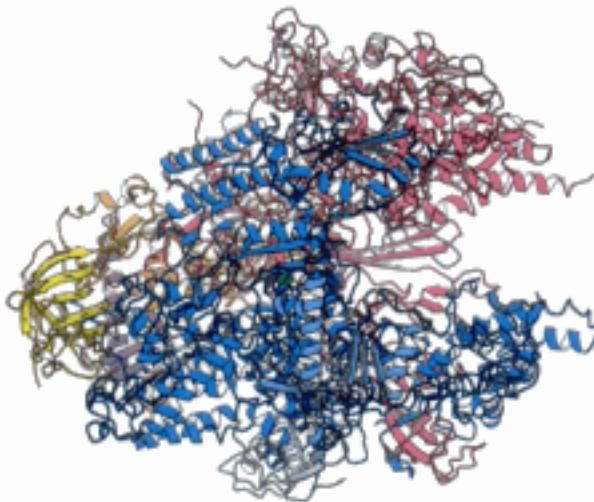
 **Figura 29.1 Estructuras de la RNA polimerasa.** Estructuras tridimensionales de las RNA polimerasas de un procariota (*Thermus aquaticus*) y de un eucariota (*Saccharomyces cerevisiae*). Las dos subunidades más grandes de cada estructura se representan de color rojo oscuro y azul oscuro. Observe que ambas estructuras contienen un ion metálico central (en verde) en sus centros activos, cerca de una gran hendidura situada en el lado derecho. El parecido entre estas estructuras pone de manifiesto que estos enzimas tienen el mismo origen evolutivo y que sus mecanismos presentan muchas características comunes. [Tomado de 1I6V.pdb y 1I6H.pdb.]

La síntesis del RNA, o *transcripción*, es el proceso mediante el cual se transcribe la información contenida en la secuencia de nucleótidos del DNA a una secuencia de información de RNA. La síntesis del RNA está catalizada por un enzima de gran tamaño denominado *RNA polimerasa*. La bioquímica básica de la síntesis de RNA es igual en procariotas y eucariotas, aunque su regulación es más compleja en los eucariotas. Las estructuras tridimensionales de RNA polimerasas representativas de procariotas y de eucariotas (Figura 29.1) constituyen un bello ejemplo de la estrecha relación que existe entre la transcripción procariótica y eucariótica. A pesar de las diferencias significativas en cuanto al tamaño y al número de subunidades polipeptídicas, las estructuras globales de estos enzimas son bastante parecidas, lo que indica un origen evolutivo común.

La síntesis del RNA, al igual que prácticamente todas las reacciones biológicas de polimerización, tiene lugar en tres etapas: *iniciación*, *elongación* y *terminación*. En este proceso la RNA polimerasa desempeña múltiples funciones:



RNA polimerasa procariótica



RNA polimerasa eucariótica

Hidden page

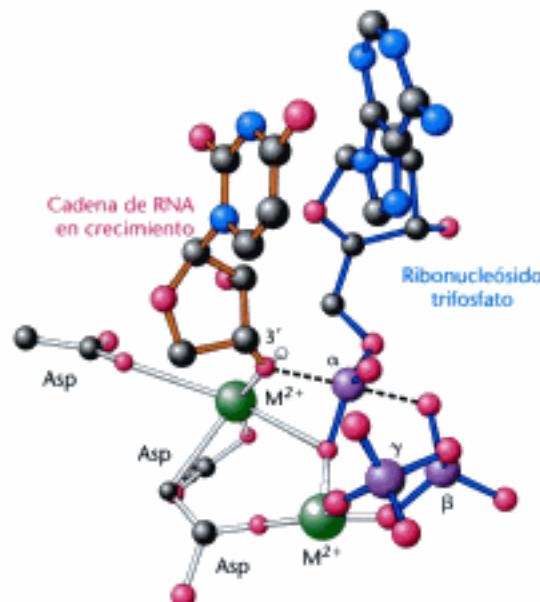


Figura 29.2 Centro activo de la RNA polimerasa. Modelo del estado de transición en la formación del enlace fosfodiéster en el centro activo de la RNA polimerasa. El grupo hidroxilo en posición 3' de la cadena de RNA en crecimiento ataca al grupo fosforilo α del ribonucleósido trifosfato entrante. Este estado de transición tiene una estructura similar al de la DNA polimerasa (ver Figura 28.12).

Para iniciar la transcripción, la RNA polimerasa se une a los centros promotores del DNA molde

La transcripción comienza en los *promotores* del DNA molde. *Los promotores son secuencias del DNA que dirigen a la RNA polimerasa hacia el lugar adecuado para iniciar la transcripción.* Mediante una combinación de diversas técnicas es posible identificar y caracterizar los promotores. Para caracterizar estos y otros lugares del DNA a los que se unen proteínas se utiliza un método muy eficaz denominado técnica de la impronta (en inglés, "footprinting") (Figura 29.3). En primer lugar se marca una de las hebras del fragmento de DNA que se está investigando con ^{32}P en uno de sus extremos. Se añade la RNA polimerasa al DNA marcado y *se digiere el complejo con DNasa durante el tiempo suficiente como para que se produzca, por término medio, un corte en cada cadena.* Para obtener un control se toma una muestra del DNA radiactivo y se le trata de la misma manera, pero no se le añade la RNA polimerasa. Los fragmentos de DNA resultantes se separan en función del tamaño mediante electroforesis. El patrón de bandas del gel es muy revelador: en el control aparece una serie de bandas que no están presentes en la muestra que contiene la RNA polimerasa. La ausencia de estas bandas se debe a que la RNA polimerasa unida al promotor protege al DNA del promotor de la hidrólisis que daría lugar a los fragmentos que faltan.

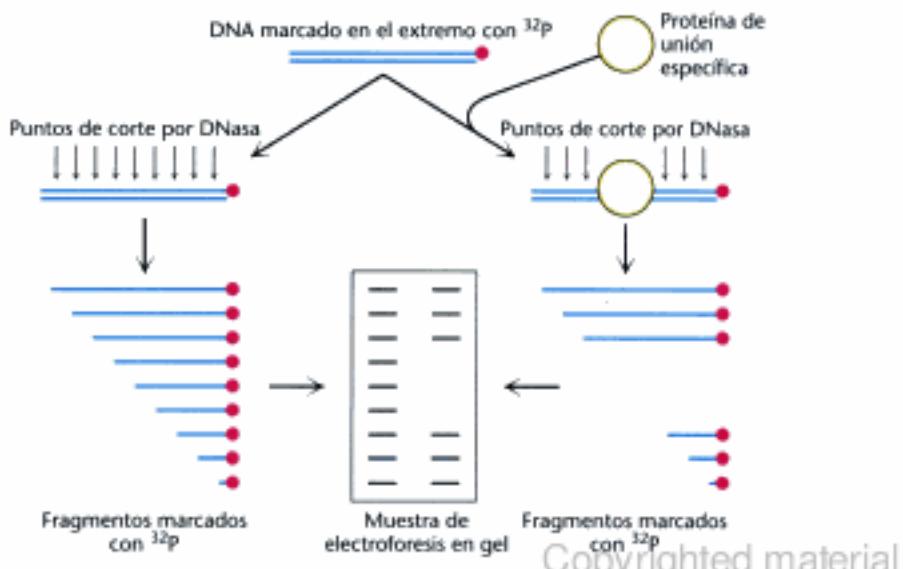


Figura 29.3 Técnica de la impronta ("footprinting"). Se marca con ^{32}P un extremo de una cadena de DNA (representado como un círculo rojo). A continuación, se trata este DNA marcado con DNase I de modo que cada fragmento sólo sufre un corte. Se lleva a cabo el mismo tratamiento tras añadir una proteína que se une a secuencias específicas del DNA. La proteína unida protege a un segmento del DNA de la acción de la DNase I. Por tanto, faltarán algunos de los fragmentos obtenidos tras la reacción que tiene lugar en ausencia de proteína. En el patrón de bandas del gel, estas bandas ausentes identifican la secuencia del lugar de unión al DNA.

Hidden page

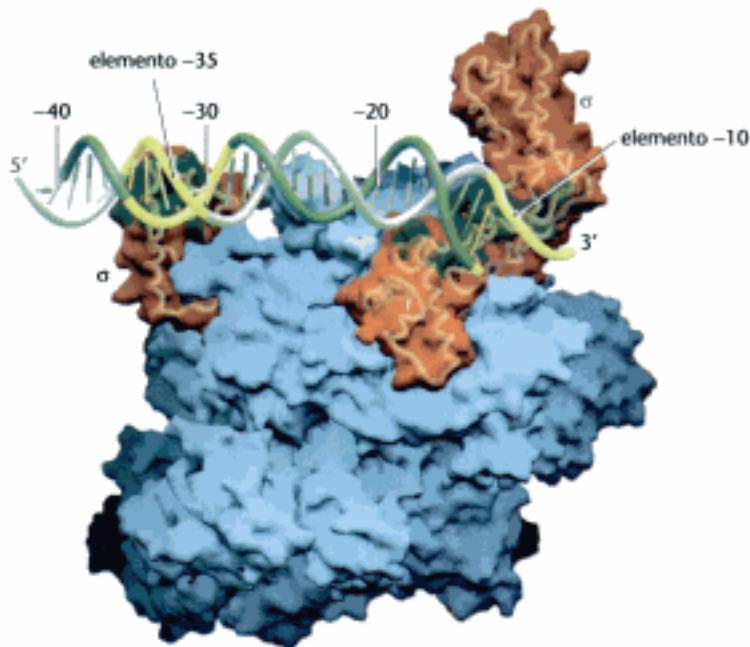


Figura 29.5 Complejo holoenzima de la RNA polimerasa. Observe que la subunidad σ (en color naranja) del holoenzima de la RNA polimerasa bacteriana establece contactos específicos de secuencia con las secuencias promotoras -10 y -35 (en amarillo). [Tomado de K. S. Murakami, S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin y S. A. Darst. Science 296 (2002): 1285-1290.]

A medida que el holoenzima se desplaza a lo largo de la doble hélice en busca de un promotor, forma puentes de hidrógeno transitorios con grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno expuestos por los pares de bases. La búsqueda es rápida porque la RNA polimerasa se desliza a lo largo del DNA en vez de asociarse y disociarse continuamente. *En otras palabras, se encuentra el centro promotor mediante un recorrido aleatorio en una dimensión, no en tres.* La constante de velocidad observada para la unión del holoenzima de la RNA polimerasa a las secuencias promotoras es de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, más de 100 veces mayor que la que cabría esperar a partir de asociaciones y disociaciones repetidas con el DNA. Cuando la cadena de RNA naciente adquiere una longitud de 9 ó 10 nucleótidos, la subunidad σ se desprende. Una vez liberada, puede colaborar en la iniciación de otro núcleo del enzima. Por tanto, *la subunidad σ actúa de forma catalítica*.

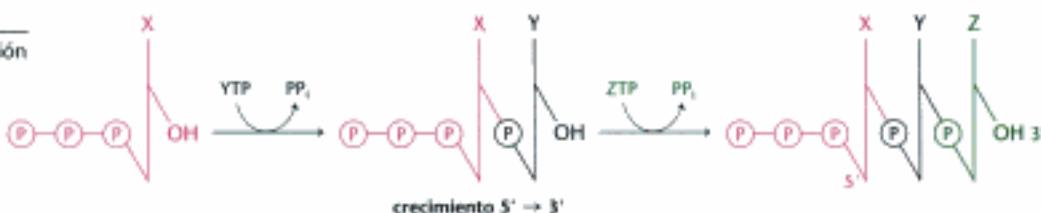
E. coli tiene múltiples factores σ para reconocer los diversos tipos de secuencias promotoras contenidas en su DNA. El factor que reconoce las secuencias consenso descritas anteriormente se denomina σ^{70} porque tiene una masa de 70 kd. Cuando la temperatura se eleva bruscamente interviene un factor σ diferente. *E. coli* responde sintetizando σ^{32} , que reconoce los promotores de los *genes de choque térmico*. Estos promotores presentan secuencias -10 que son algo distintas de las secuencias -10 de los promotores estándar (Figura 29.6). El incremento de la transcripción de los genes de choque térmico provoca la síntesis coordinada de una serie de proteínas protectoras. Otros factores σ responden a condiciones ambientales como, por ejemplo, la falta de nitrógeno. Estos descubrimientos demuestran que *el factor σ desempeña un papel crucial a la hora de determinar el lugar donde la RNA polimerasa inicia la transcripción*.

Figura 29.6 Otras secuencias promotoras.

Otras secuencias promotoras. Comparación de las secuencias consenso de tres promotores de *E. coli*: el promotor estándar, el promotor de choque térmico y el promotor de la falta de nitrógeno. Estos promotores son reconocidos por σ^{70} , σ^{32} y σ^{34} , respectivamente.

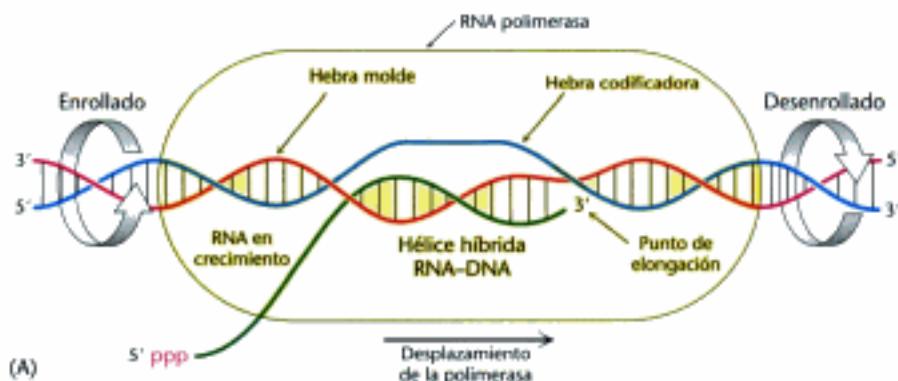


Hidden page



La elongación tiene lugar en burbujas de transcripción que se desplazan a lo largo del DNA molde

La fase de elongación de la síntesis del RNA comienza nada más formarse el primer enlace fosfodiéster. Un cambio importante es la pérdida de σ ; en ausencia de σ , el núcleo enzimático se une con más fuerza al DNA molde. De hecho, la RNA polimerasa permanece unida a su molde hasta alcanzar una señal de terminación. La región que contiene la RNA polimerasa, el DNA y la cadena de RNA naciente se denomina *burbuja de transcripción* porque contiene una “burbuja” en la que el DNA se encuentra localmente desnaturizado (Figura 29.8). El RNA recién sintetizado forma una hélice híbrida con la hebra de DNA molde. Esta hélice RNA-DNA tiene una longitud aproximada de 8 pares de bases, lo que corresponde a casi una vuelta de una doble hélice (p. 112). En esta hélice híbrida el grupo hidroxilo en posición 3' del RNA está ubicado de tal modo que puede atacar al átomo de fósforo o de un ribonucleósido trifosfato entrante. El núcleo enzimático también posee un lugar de unión para la otra hebra del DNA. Al igual que en la fase de iniciación, durante la fase de elongación se desenrollan aproximadamente 17 pares de bases del DNA. La burbuja de transcripción recorre una distancia de unos 170 Å (17 nm) en un segundo, lo que equivale a una velocidad de elongación de aproximadamente 50 nucleótidos por segundo. Aunque rápida, es mucho más lenta que la velocidad de síntesis del DNA, que es de 800 nucleótidos por segundo.



(B)

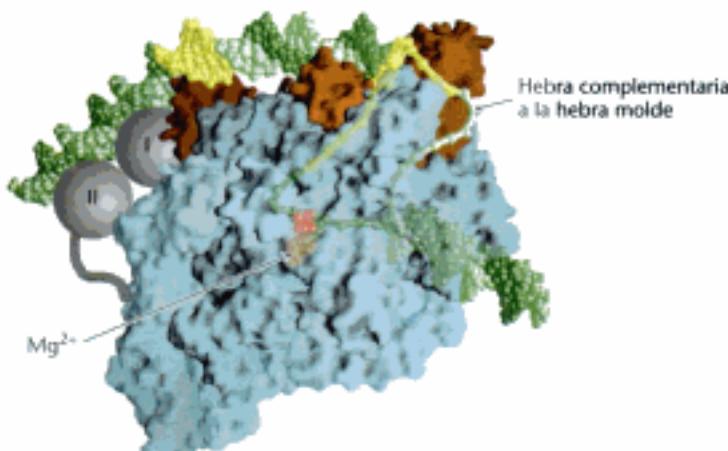


Figura 29.8 Burbuja de transcripción. (A) Representación esquemática de una burbuja de transcripción durante la elongación de un transcrito de RNA. La doble hélice del DNA se desenrolla en el extremo frontal de la RNA polimerasa y se vuelve a enrollar en su extremo posterior. Durante la elongación el híbrido RNA-DNA va rotando. (B) Un modelo de la superficie basado en la estructura cristalina del holoenzima de la RNA polimerasa muestra el DNA desenrollado (amarillo y verde) que forma la burbuja de transcripción. Observe que la hebra molde (en verde) está en contacto con el Mg²⁺ catalítico (en rosa). [(B) Tomado de K. S. Murakami, S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin y S. A. Darst. Science 296 (2002): 1285-1290.]

Hidden page

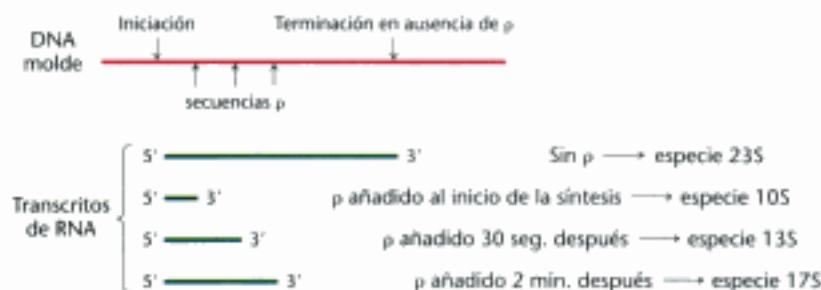


Figura 29.11 Efecto de la proteína p sobre el tamaño de los transcritos de RNA

inestable porque sus pares de bases rU-dA son los más débiles de los cuatro tipos existentes. Por tanto, la interrupción de la transcripción provocada por la horquilla hace posible que el *RNA naciente débilmente unido se disocie del DNA molde y, posteriormente, del enzima*. La hebra molde de DNA que se queda sola vuelve a unirse con su complementaria para regenerar la doble hélice de DNA y se cierra la burbuja de transcripción.

En algunos genes, la proteína rho ayuda a terminar la transcripción

La RNA polimerasa no necesita ayuda para finalizar la transcripción en una horquilla seguida de varios residuos U. Sin embargo, en otros lugares la terminación necesita la colaboración de un factor adicional. Este descubrimiento fue posible a raíz de la observación de que algunas moléculas de RNA sintetizadas *in vitro* por la RNA polimerasa actuando sola eran *más largas* que las sintetizadas *in vivo*. Se aisló el factor que faltaba, una proteína que provocaba la terminación correcta, y se la denominó *rho* (p). Añadiendo este factor de terminación a una mezcla de incubación a distintos tiempos después de haberse iniciado la síntesis de RNA se obtuvo información adicional sobre el modo de actuar de p (Figura 29.11). Cuando se añadió p en el momento justo de la iniciación, unos pocos segundos después de la iniciación ó 2 minutos después de la iniciación, se obtuvieron RNAs con coeficientes de sedimentación de 10S, de 13S y de 17S, respectivamente. Si no se añadía p, el producto de la transcripción era un RNA de 23S. Es evidente que el DNA molde contiene al menos tres lugares de terminación que responden a p (que originan RNAs de 10S, de 13S y de 17S) y un lugar de terminación que no (que origina un RNA de 23S). Por lo tanto, en ausencia de p puede producirse una terminación específica en un lugar que produce un RNA de 23S. Sin embargo, p detecta señales de terminación adicionales que la RNA polimerasa sola no reconoce.

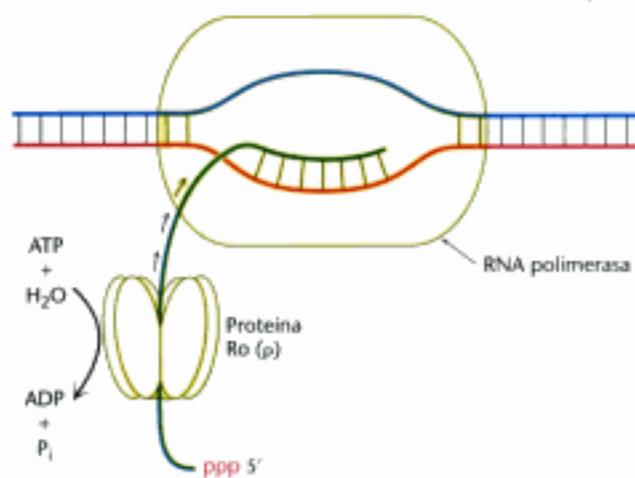


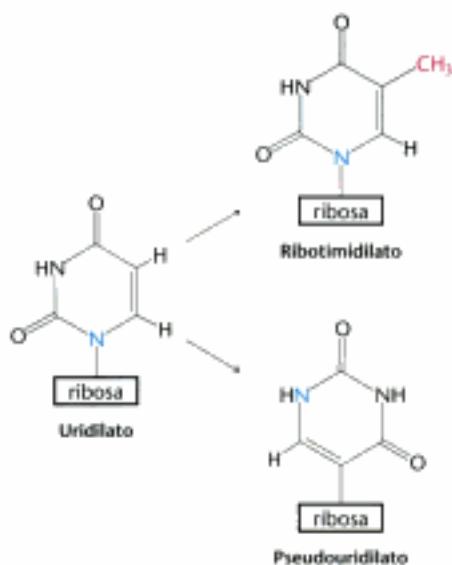
Figura 29.12 Mecanismo de la terminación de la transcripción por parte de la proteína p. Esta proteína es una helicasa dependiente de ATP que se une a la cadena de RNA naciente separándola de la RNA polimerasa y del DNA molde.

¿Cómo provoca p la terminación de la síntesis de RNA? Una pista fundamental es el descubrimiento de que p hidroliza ATP en presencia de RNA de hebra sencilla pero no lo hace en presencia de DNA o RNA de doble hebra. El hexámero de p, cuya estructura es similar y homóloga a la ATP sintasa (p. 522) se une específicamente a un RNA de hebra sencilla; un segmento de 72 nucleótidos se une de modo que el RNA pasa a través del centro de la estructura (Figura 29.12). La proteína p entra en acción mediante secuencias pertenecientes al RNA naciente en las que abunda la citosina y escasea la guanina. La actividad ATPasa de p permite a la proteína tirar del RNA naciente al tiempo que va a la zaga de la RNA polimerasa. Cuando p alcanza a la RNA polimerasa en la burbuja de transcripción, destruye la hélice híbrida RNA-DNA actuando como una RNA-DNA helicasa. Dada la conexión estructural y evolutiva, es posible que el mecanismo de acción de p sea similar al de la ATP sintasa, con el RNA de hebra sencilla haciendo el papel de la subunidad γ .

Además de p otras proteínas pueden provocar la terminación. Por ejemplo, la proteína *nusA* permite a la RNA polimerasa de *E.*

Hidden page

Hidden page



29.2 En eucariotas, la transcripción está muy regulada

Estudiaremos ahora la transcripción en eucariotas, un proceso mucho más complejo que en procariotas. Las células eucarióticas poseen una extraordinaria capacidad para regular de forma precisa el momento en que se transcribe cada gen y cuánto RNA se produce. Esta facultad ha permitido a algunos eucariotas evolucionar hasta convertirse en organismos pluricelulares con tejidos distintos. *Es decir, los eucariotas pluricelulares utilizan la regulación diferencial de la transcripción para crear distintos tipos celulares.* Las células eucarióticas consiguen su precisión mediante una regulación de la transcripción más compleja. Además, la expresión génica resulta afectada por dos características importantes que son exclusivas de los eucariotas: la membrana nuclear y la maduración del RNA.

1. *La membrana nuclear.* En eucariotas, la transcripción y la traducción tienen lugar en compartimientos celulares distintos: la transcripción tiene lugar en el núcleo rodeado de membrana, mientras que la traducción tiene lugar fuera del núcleo, en el citoplasma. En procariotas, los dos procesos están estrechamente acoplados (Figura 29.15). De hecho, la traducción del mRNA bacteriano comienza mientras el trans-

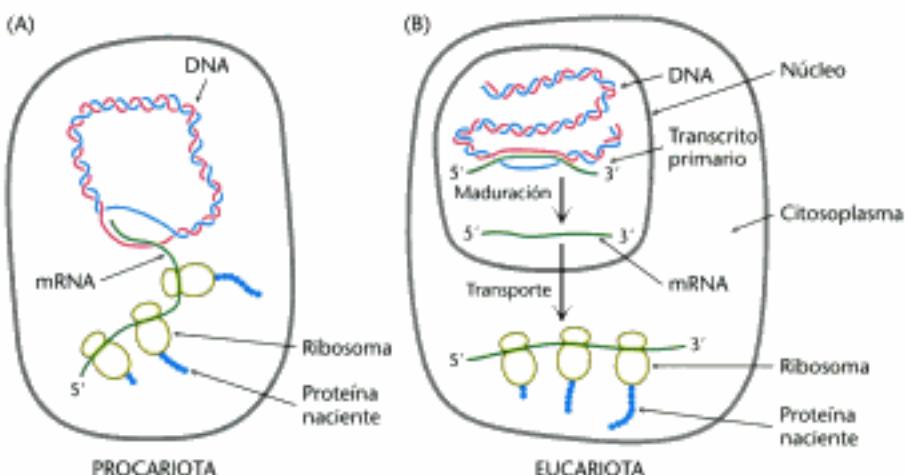


Figura 29.15 Transcripción y traducción. Estos dos procesos están intimamente acoplados en los procariotas, mientras que en los eucariotas están separados tanto en el espacio como en el tiempo. (A) En procariotas, el transcrito primario sirve de mRNA y es utilizado inmediatamente como molde para la síntesis de proteínas. (B) En eucariotas, los precursores del mRNA maduran en el núcleo, donde experimentan diversos cortes y empalmes antes de ser transportados al citoplasma para que se traduzcan en proteínas. [Tomado de J. Darnell, H. Lodish y D. Baltimore. Molecular Cell Biology, 2^a ed. (Scientific American Books, 1990), p.230.]

rito todavía se está sintetizando. *La separación espacial y temporal entre la transcripción y la traducción permite a los eucariotas regular la expresión de los genes mediante vías mucho más complejas, contribuyendo a la riqueza de formas y funciones de los eucariotas.*

2. *Regulación de la transcripción más compleja.* Al igual que los procariotas, los eucariotas dependen de secuencias conservadas del DNA para regular la iniciación de la transcripción. Pero los procariotas sólo tienen tres elementos promotores (las secuencias -10 y -35 y el elemento UP), mientras que los eucariotas utilizan varios tipos de elementos promotores, cada uno identificado por su propia secuencia conservada. No todos los tipos posibles se presentarán juntos en el mismo promotor. *En eucariotas, los elementos que regulan la transcripción se pueden encontrar en diversos lugares del DNA, corriente arriba o corriente abajo del punto de partida y, algunas veces, a una distancia del punto de partida mucho mayor que en procariotas.* Por ejemplo, los elementos intensificadores localizados en el DNA lejos del punto de partida incrementan la actividad del promotor de determinados genes.

3. *Maduración del RNA.* Aunque tanto los procariotas como los eucariotas modifican el RNA, *los eucariotas someten al RNA naciente destinado a convertirse en mRNA a un muy extenso proceso de maduración.* Esta maduración incluye modificaciones de ambos extremos y, lo que es más significativo, cortes y empalmes que eliminan segmentos del transcripto primario. La maduración del RNA se describe en la Sección 29.3.

En las células eucariotas, el RNA se sintetiza mediante tres tipos de RNA polimerasas

En procariotas, el RNA se sintetiza mediante un único tipo de polimerasa. Por el contrario, el núcleo de un eucariota contiene tres tipos de RNA polimerasa que difieren en su especificidad hacia el molde, en su localización dentro del núcleo y en su sensibilidad a inhibidores (Tabla 29.2). Todas estas polimerasas son proteínas de gran tamaño, formadas por entre 8 y 14 subunidades y cuya masa molecular total supera los 500 kd. La *RNA polimerasa I* se localiza en los nucleolos, donde transcribe la hilera de genes correspondientes a los RNA ribosómicos de 18S, de 5,8S y de 28S (p. 839). La otra molécula de RNA ribosómico (el rRNA de 5S, p. 839) y todas las moléculas de RNA de transferencia (p. 840) son sintetizadas por la *RNA polimerasa III*, que está localizada en el nucleoplasma en vez de en los nucleolos. La *RNA polimerasa II*, que también se encuentra en el nucleoplasma, sintetiza los precursores de los RNA mensajeros así como varias moléculas pequeñas de RNA, tales como las que se encuentran en el aparato de maduración (p. 844).

Aunque todas las RNA polimerasas eucarióticas son homólogas entre sí y con la RNA polimerasa procariótica, la RNA polimerasa II presenta en la subunidad de 220 kd un *dominio carboxilo terminal* característico, denominado CTD; este dominio es atípico porque contiene múltiples repeticiones de una secuencia consenso YSPTSPS. La actividad de la RNA polimerasa II se regula mediante fosforilación, principalmente en los residuos de serina del dominio carboxilo terminal. Otra diferencia importante entre las polimerasas se basa en su respuesta ante la toxina *α-amanitina*, un octapéptido cíclico que contiene varios aminoácidos modificados.

TABLA 29.2 RNA polimerasas de eucariotas

Tipo	Localización	Transcripciones celulares	Efectos de la α -amanitina
I	Nucleolo	rRNA de 18S, 5,8S y 28S	Insensitive
II	Nucleoplasma	Precursors del mRNA y snRNA	Fuerte inhibición
III	Nucleoplasma	tRNA y rRNA 5S	Inhibición a altas concentraciones

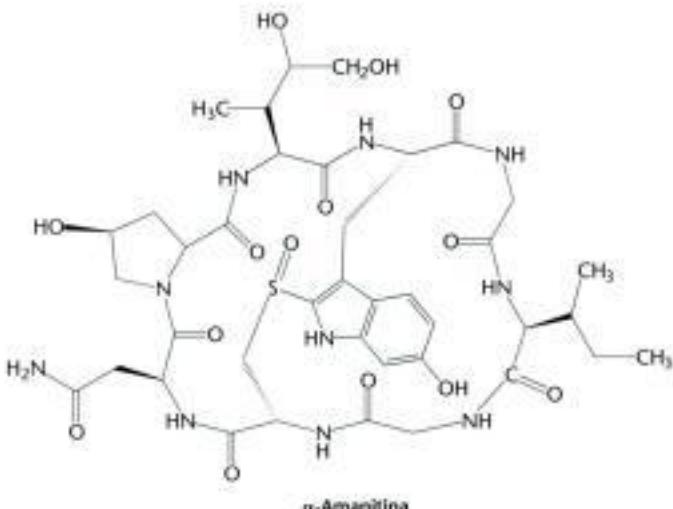


Figura 29.16 Veneno para la RNA polimerasa. *Amanita phalloides*, una seta venenosa que produce la α -amanitina. [Tomado de G. Lincoff y D. H. Mitchel, *Toxic and Hallucinogenic Mushroom Poisoning* (Van Nostrand Reinhold, 1977), p. 30.]

La α -amanitina se obtiene a partir de la seta venenosa *Amanita phalloides*, también conocida como *copa de la muerte* o *ángel destructor* (Figura 29.16). Cada año se producen más de cien muertes en todo el mundo como consecuencia de la ingestión de setas venenosas. La α -amanitina se une muy fuertemente ($K_d = 10 \text{ nM}$) a la RNA polimerasa II y por tanto bloquea la fase de elongación de la síntesis de RNA. Concentraciones más elevadas de α -amanitina (1 mM) inhiben a la RNA polimerasa III, mientras que la RNA polimerasa I es insensible a esta toxina. Este patrón de sensibilidad se encuentra muy conservado en los reinos animal y vegetal.

Los genes eucarióticos, al igual que los procarióticos, necesitan promotores para la iniciación de la transcripción. Los promotores de eucariotas, como los de procariotas, están formados por secuencias conservadas que sirven para atraer a la polimerasa hacia el punto de partida. Sin embargo, los promotores eucarióticos difieren claramente, tanto en su secuencia como en su ubicación, en función del tipo de RNA polimerasa al que se unen (Figura 29.17).

1. **RNA polimerasa I.** El DNA ribosómico (rDNA) transcrit por la polimerasa I está organizado en forma de varios cientos de repeticiones dispuestas en tandem, cada una con una copia de cada uno de los tres genes rRNA. Las secuencias promotoras se localizan en los tramos del DNA que separan los genes. En el punto de partida de la transcripción se encuentra una secuencia de tipo TATA denominada *elemento iniciador ribosomal* (rInr). Más lejos corriente arriba, a una distancia de entre 150 y 200 pb del punto de partida, se encuentra el *elemento promotor situado corriente arriba* (UPE). Ambos elementos ayudan en la transcripción uniéndose a proteínas que facilitan la incorporación de la RNA polimerasa I.

2. **RNA polimerasa II.** Los promotores de la RNA polimerasa II, al igual que los promotores procarióticos, incluyen un conjunto de elementos con secuencias conservadas que definen el punto de partida y que reclutan a la polimerasa. Sin embargo, el promotor puede contener cualquier combinación de cierto número de elementos posibles. Una característica exclusiva de los promotores eucarióticos es que también incluyen elementos intensificadores que pueden estar a mucha distancia (más de 1 kb) del punto de partida (p. 838).

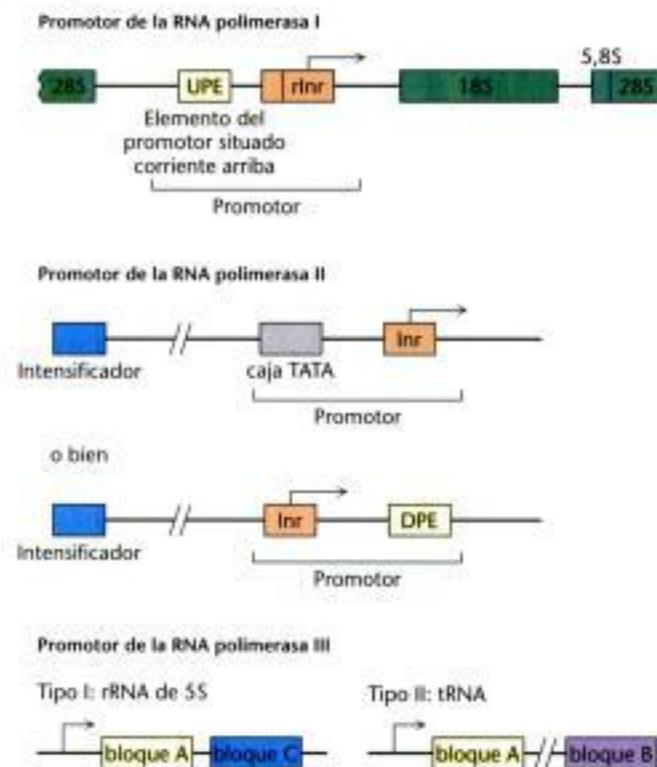


Figura 29.17 Elementos comunes de los promotores eucarióticos. Cada RNA polimerasa eucariótica reconoce un conjunto de elementos del promotor (secuencias del DNA que promueven la transcripción). El promotor de la RNA polimerasa I consta de un iniciador ribosomal (rInr) y de un elemento del promotor situado corriente arriba (UPE). Análogamente, el promotor de la RNA polimerasa II incluye un elemento iniciador (Inr) y también puede incluir o una caja TATA o un elemento del promotor situado corriente abajo (DPE). Lejos de la región del promotor, los elementos intensificadores se unen a factores de transcripción específicos. Los promotores de la RNA polimerasa III están formados por secuencias conservadas situadas dentro de los genes que se transcriben.

3. *RNA polimerasa III*. Los promotores de la RNA polimerasa III se encuentran dentro de la secuencia transcrita, corriente abajo del punto de partida. Hay dos tipos de promotores intragénicos para la RNA polimerasa III. Los promotores de tipo I, que se encuentran en el gen para el rRNA de 5S, contienen dos secuencias conservadas cortas que reciben el nombre de bloque A y bloque C. Los promotores de tipo II, que se encuentran en los genes para los tRNA, están formados por dos secuencias de 11 pb, el bloque A y el bloque B, situadas a unos 15 pb de cada uno de los extremos del gen.

En la región promotora de la RNA polimerasa II se pueden encontrar tres elementos comunes

Los promotores de la RNA polimerasa II, al igual que los de las polimerasas bacterianas, están situados generalmente del lado 5' del punto de partida de la transcripción. Los resultados de experimentos de mutagénesis, de estudios con la técnica de la impronta ("footprinting") y las comparaciones de muchos genes de eucariotas superiores han demostrado la importancia de diversas regiones situadas corriente arriba. En el caso de los genes transcritos por la RNA polimerasa II, el elemento que actúa en cis que se observa con más frecuencia es la caja TATA, denominada así en base a su secuencia consenso (Figura 29.18). Normalmente, la caja TATA se encuentra centrada entre las posiciones -30 y -100. Hay que destacar el hecho de que la caja TATA de los eucariotas se parece mucho a la secuencia -10 de los procariotas (TATAAT), pero se encuentra más alejada del punto de partida. La mutación de una única base de la caja TATA perjudica notablemente la actividad del promotor. Por tanto, no basta únicamente con un elevado contenido en pares AT; es la secuencia concreta la que resulta esencial.

Con frecuencia, la caja TATA está ligada a un *elemento iniciador* (Inr), una secuencia que se encuentra en el punto de partida de la transcripción, entre las posiciones -3 y +5. Esta secuencia define el punto de partida, ya que los otros elementos promotores se encuentran a distancias variables del punto de partida. Su presencia produce un aumento de la actividad transcripcional.

Un tercer elemento, el *elemento del núcleo del promotor situado corriente abajo* (DPE), se encuentra frecuentemente junto con Inr en los transcritos que carecen de la caja TATA. Al contrario que en el caso de la caja TATA, el DPE se encuentra corriente abajo del punto de partida, entre las posiciones +28 y +32.

Entre las posiciones -40 y -150 se sitúan secuencias reguladoras adicionales. Muchos promotores contienen una caja CAAT y algunos presentan una caja GC (Figura 29.19). Los genes constitutivos (genes que se expresan continuamente, no de forma regulada) suelen presentar cajas GC en sus promotores. Las posiciones de estas secuencias situadas corriente arriba varían de un promotor a otro, a diferencia de lo que ocurre con la región -35 de los procariotas, que ocupa una posición prácticamente constante. Otra diferencia consiste en que la caja CAAT y la caja GC pueden ser eficaces cuando están ubicadas en la hebra molde (antisentido), a diferencia de la región -35, que tiene que estar situada en la hebra codificadora (con sentido). Estas diferencias entre procariotas y eucariotas obedecen a mecanismos fundamentalmente distintos a la hora de reconocer los elementos que actúan en cis. En los promotores procarióticos, las secuencias -10 y -35 son lugares de unión para la RNA polimerasa y su factor σ asociado. Por el contrario, en los promotores eucarióticos, las cajas TATA, CAAT y GC, así como otros elementos que actúan en cis, no son reconocidas por la propia RNA polimerasa, sino por otras proteínas.

El complejo proteico TFIIID inicia el ensamblaje del complejo de transcripción activo

Los elementos que actúan en cis constituyen tan solo una parte del rompecabezas que supone la expresión génica en eucariotas. También se necesitan factores de transcripción que se unen a dichos elementos. Por ejemplo, la RNA polimerasa II es guiada hacia el punto de partida por medio de un conjunto de factores de transcripción denominados colectivamente como *TFII* (*TF* hace referencia a factores de transcripción, y *II* a la RNA polimerasa II). Los distintos factores TFII se denominan TFIIA, TFIIB y así sucesivamente. La iniciación comienza con la unión de TFIIID a la caja TATA (Figura 29.20).

5' T₈₂ A₉₇ T₉₃ A₆₅ A₆₃ A₆₈ A₅₀ 3'
Caja TATA

Figura 29.18 Caja TATA. Comparando las secuencias de más de 100 promotores eucarióticos se ha obtenido la secuencia consenso mostrada. Los subíndices indican la frecuencia (%) con que la base aparece en esa posición.

5' GGNCAATCT 3'
Caja CAAT
5' GGGCGG 3'
Caja GC

Figura 29.19 Caja CAAT y caja GC. Secuencias consenso de la caja CAAT y de la caja GC de los promotores eucarióticos para los precursores del mRNA.

Figura 29.20 Iniciación de la transcripción. Los factores de transcripción TFIID, B, D, E, F y H son imprescindibles para que la RNA polimerasa II inicie la transcripción. El ensamblaje secuencial de estos factores de transcripción generales comienza con la unión de TFIID (en color púrpura) a la caja TATA. [La proteína de unión a la caja TATA (TBP), un componente de TFIID, reconoce la caja TATA]. Una vez unido, TFIID abre la doble hélice del DNA y fosforila el dominio carboxilo terminal (CTD), permitiendo a la polimerasa abandonar el promotor y comenzar la transcripción. La flecha roja indica el punto de partida de la transcripción.

En los promotores que poseen caja TATA, el suceso clave inicial es el reconocimiento de la caja TATA por parte de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), un componente de 30 kd perteneciente al complejo TFIID de 700 kd. En los promotores que carecen de caja TATA, otras proteínas del complejo TFIID se unen a los elementos del núcleo del promotor pero, como se sabe menos acerca de estas interacciones, consideraremos únicamente la interacción de unión entre la caja TATA y TBP. TBP se une a la caja TATA con una fuerza 10^5 veces mayor que a secuencias no afines; la constante de disociación del complejo específico es aproximadamente de 1 nM. La TBP es una proteína con forma de silla de montar formada por dos dominios similares (Figura 29.21). La caja TATA del DNA se une a la superficie cóncava de TBP. Esta unión provoca grandes cambios conformacionales en el DNA unido. La doble hélice se desenrolla de forma sustancial para ensanchar su *surco menor*, permitiéndole establecer un extenso contacto con las hebras β antiparalelas situadas sobre la parte cóncava de TBP. En esta interfase abundan las interacciones hidrofóbicas. Por ejemplo, entre los pares de bases de la caja TATA se intercalan cuatro residuos de fenilalanina. Por regla general, se aprovecha la flexibilidad de las secuencias ricas en AT para doblar el DNA en ese punto. Justo fuera de la caja TATA, se vuelve a formar el B-DNA clásico. Este complejo es claramente asimétrico. La asimetría es crucial a la hora de especificar un único punto de partida y de asegurar que la transcripción prosiga de forma unidireccional.

La TBP unida a la caja TATA constituye el *núcleo primordial del complejo de iniciación* (ver Figura 29.20). La superficie con forma de silla de montar de TBP proporciona lugares de anclaje para la unión de otros componentes (Figura 29.22). Sobre este núcleo primordial se ensamblan factores de transcripción adicionales siguiendo un orden establecido. Primero se incorpora TFIID, después TFIIB y, a continuación, TFIIF, RNA polimerasa II, TFIIE y TFIIDH se unen a los otros factores para formar un complejo denominado *aparato de transcripción basal*. Durante la formación del aparato de transcripción basal, el dominio carboxilo terminal (CTD) no está fosforilado y desempeña un papel en la regulación de la transcripción mediante su unión a un complejo asociado al intensificador y que recibe el nombre de mediador (ver Sección 31.3). La *fosforilación del CTD por parte de TFIIDH* marca la transición de la fase de iniciación a la fase de elongación. El CTD fosforilado estabiliza la fase de elongación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II e incorpora los enzimas que intervienen en la maduración del RNA y que actúan durante la elongación (p. 846). La importancia del dominio carboxilo terminal queda subrayada por el descubrimiento de que no son viables las levaduras que contienen una polimerasa II mutante con menos de 10 repeticiones en el CTD. La mayor parte

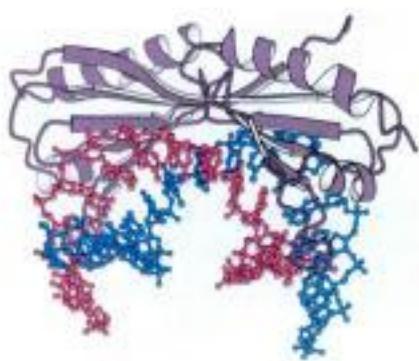
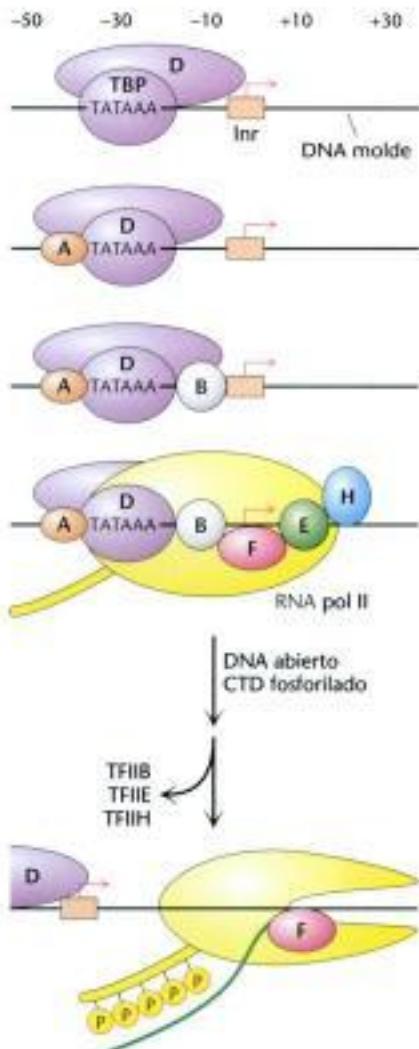


Figura 29.21 Complejo formado por la proteína de unión a la caja TATA y el DNA. La estructura en forma de silla de montar de la proteína se asienta sobre un fragmento de DNA. Obsérvese que el DNA está desenrollado y doblado de forma significativa. [Tomado de 1CDW.pdb.]

Hidden page

TABLA 29.3 Partículas de ribonucleoproteína nuclear pequeñas (snRNPs) implicadas en la maduración de los precursores de mRNA

snRNP	Tamaño de snRNA (nucleótidos)	Función
U1	165	Se une al centro de corte empalme 5' y después al 3'
U2	185	Se une al centro de ramificación y forma parte del centro catalítico
U5	116	Se une al centro de empalme 5'
U4	145	Enmascara la actividad catalítica de U6
U6	106	Cataliza el corte y empalme

En las células de mamífero, la maduración comienza con el reconocimiento del centro de corte y empalme del extremo 5' por medio de la snRNP U1 (Figura 29.32). De hecho, el snRNA U1 contiene una secuencia de seis nucleótidos muy conservada, que no está cubierta por ninguna proteína en el interior de la snRNP y que se empareja mediante pares de bases con el centro de corte y empalme del extremo 5' del pre-mRNA. Esta unión marca el comienzo del ensamblaje del espliceosoma sobre la molécula de pre-mRNA.



A continuación, snRNP U2 se une al lugar de ramificación del intrón mediante la formación de pares de bases entre una secuencia muy conservada de snRNA U2 y el pre-mRNA. La unión de snRNP U2 precisa de la hidrólisis de ATP. Una tri-snRNP U4-U5-U6 ensamblada previamente se une al complejo formado por U1, U2 y el precursor del mRNA para formar el espliceosoma. Esta asociación también precisa de la hidrólisis de ATP.

Analizando la distribución de los entrecruzamientos provocados por el *psoraleno*, un reactivo fotoactivable que une pirimidinas colindantes en regiones aparentadas mediante pares de bases, se obtuvo una imagen reveladora de las interacciones que se establecen entre las moléculas de RNA en este ensamblaje. Estos entrecruzamientos sugieren que la maduración se desarrolla de la siguiente manera. En primer lugar, U5 interacciona con secuencias del exón pertenecientes al centro de corte y empalme del extremo 5' y, posteriormente, con el exón situado en 3'. A continuación, U6 se disocia de U4 y experimenta una reorganización intramolecular que permite tanto el emparejamiento mediante pares de bases con U2 como la interacción con el extremo 5' del intrón, con lo que U1 queda desplazado del espliceosoma. La hélice U2-U6 es indispensable para la maduración, lo que sugiere que, probablemente, los snRNAs U2 y U6 constituyen el centro catalítico del espliceosoma (Figura 29.33). U4 actúa como un inhibidor que enmascara a U6 hasta que los centros de corte y empalme específicos se encuentran alineados. Estos reordenamientos dan como resultado la primera reacción de transesterificación, que provoca un corte en el exón situado en 5' y genera el intermediario con forma de lazo.

Reordenamientos posteriores del RNA en el espliceosoma facilitan la segunda reacción de transesterificación. Durante estos reordenamientos, U5 alinea el exón situado en 5' libre con el exón situado en 3', de modo que el grupo hidroxilo en posición 3' del exón situado en 5' se encuentre en la posición adecuada para realizar

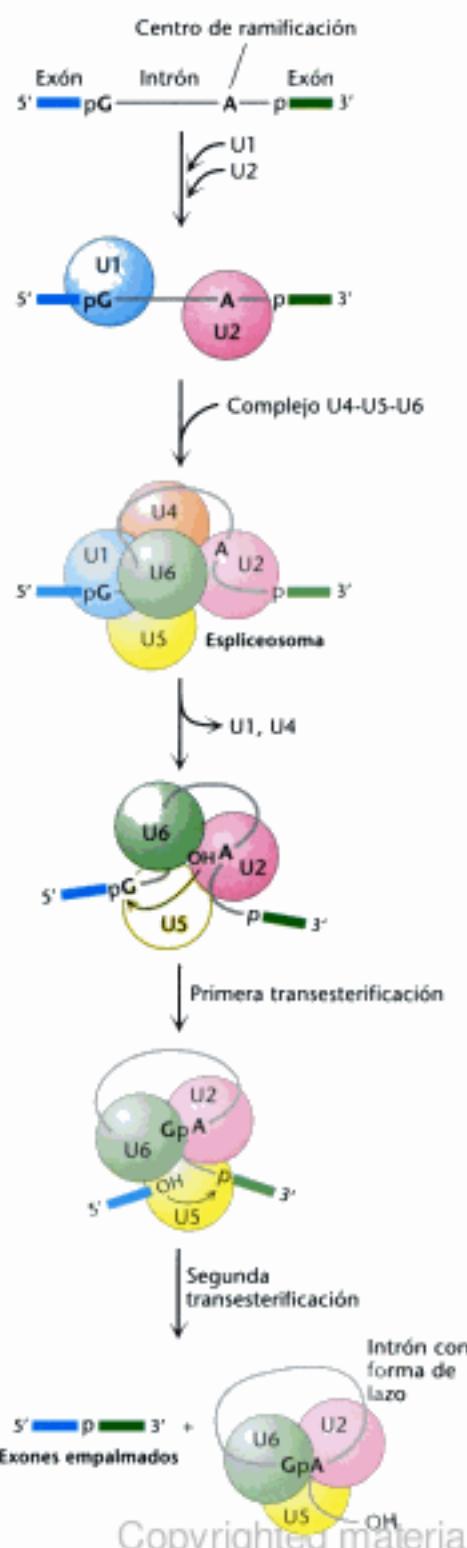


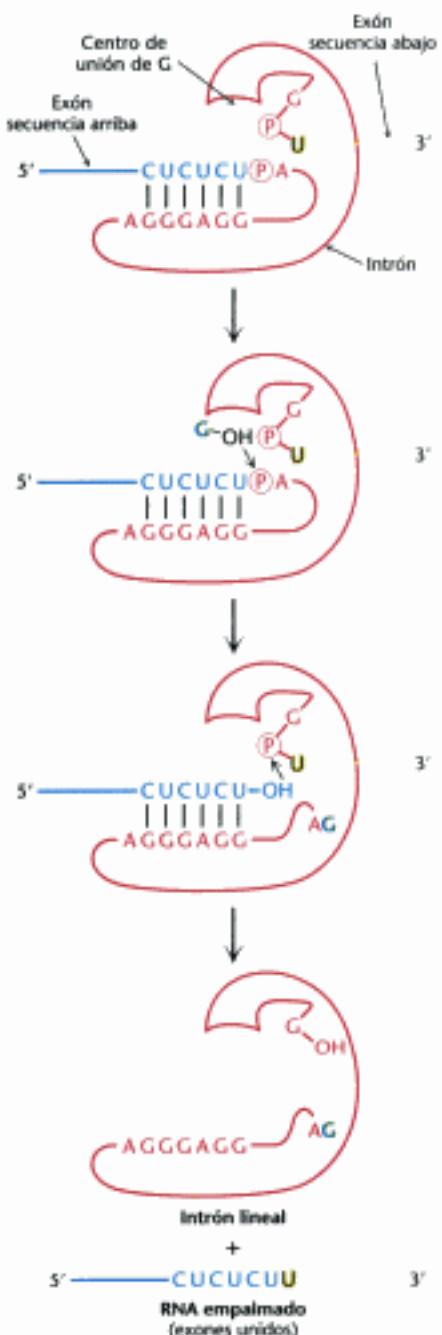
Figura 29.32 Ensamblaje y actividad del espliceosoma. U1 se une al centro de corte y empalme del extremo 5' y U2 se une al centro de ramificación. A continuación, se incorpora un complejo U4-U5-U6 formado previamente, con lo que se obtiene el espliceosoma completo. El snRNA U6 adopta un nuevo plegamiento y se une al centro de corte y empalme del extremo 5', desplazando a U1. Las numerosas interacciones que se establecen entre U6 y U2 desplazan a U4. Posteriormente, en la primera etapa de transesterificación, la adenosina del centro de ramificación ataca al centro de corte y empalme del extremo 5', generando un intermediario con forma de lazo. U5 mantiene muy juntos a los dos exones y se produce la segunda transesterificación, en la que el grupo hidroxilo del centro de corte y empalme del extremo 5' ataca al lugar de corte y empalme del extremo 3'. Estas reacciones dan lugar al mRNA maduro y a un intrón con forma de lazo al que se unen U2, U5 y U6. [Tomado de T. Villa, J. A. Pleiss y C. Guthrie, *Cell* 109 (2002):149-152.]

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page



Los análisis de la secuencia de bases del precursor del rRNA sugerían que los centros de corte y empalme se encuentran alineados con los residuos catalíticos gracias a la formación de pares de bases entre una *secuencia guía interna* del intrón (IGS) y los exones situados en 5' y 3' (Figura 29.39). En primer lugar, IGS acerca el cofactor guanosina al centro de corte y empalme del extremo 5' de manera que el grupo OH en posición 3' de G pueda realizar un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo de este centro de corte y empalme. A continuación, la IGS mantiene al exón situado corriente abajo en la posición adecuada para que sea atacado por el grupo OH recién formado en el extremo 3' del exón situado corriente arriba. Se forma un enlace fosfodiéster entre los dos exones y el intrón se libera en forma de una molécula lineal. Al igual que en la catálisis efectuada por proteínas con actividad enzimática, la autocatálisis que permite formar y romper enlaces en este precursor del rRNA es muy específica.

El descubrimiento de actividad enzimática en el intrón capaz de automadurar y en el componente RNA de la RNasa P ha abierto nuevas áreas de investigación y ha cambiado el modo de pensar sobre la evolución molecular. El descubrimiento de que el RNA puede ser tanto un catalizador como un soporte de información sugiere que en las etapas tempranas de la evolución de la vida pudo haber existido un mundo de RNA, anterior a la aparición del DNA y de las proteínas.

Los precursores del RNA mensajero de las mitocondrias y hongos también experimentan automaduración, al igual que algunos RNA precursores de los cloroplastos de organismos unicelulares como *Chlamydomonas*. Las reacciones de automaduración se pueden clasificar en función de la naturaleza de la unidad que ataca al centro de corte y empalme situado corriente arriba. En la automaduración del grupo I interviene un cofactor de guanosina, como en el caso de *Tetrahymena*. En la maduración del grupo II, la unidad atacante es el grupo OH en posición 2' de un adenilato específico del intrón (Figura 29.40).

La automaduración de los grupos I y II recuerda a la maduración catalizada por los espliceosomas en dos aspectos. Primero, en la etapa inicial, en la que un grupo hidroxilo de la ribosa ataca al centro de corte y empalme del extremo 5'. A continuación, el OH recién formado en el extremo 3' del exón situado corriente arriba ataca al centro de corte y empalme del extremo 3' para formar un enlace fosfodiéster con el exón situado corriente abajo. Segundo, ambas reacciones son transesterificaciones en las que los fosfatos pertenecientes a cada uno de los centros de corte y empalme se mantienen en los productos. El número de enlaces fosfodiéster permanece constante. La maduración del grupo II se asemeja a la maduración de los precursores de los mRNAs catalizada por los espliceosomas en varios aspectos adicionales. El ataque al centro de corte y empalme del extremo 5' lo realiza una parte del propio intrón (el grupo OH en posición 2' de la adenosina) en vez de un cofactor externo (G). En ambos casos, el intrón se libera en forma de un lazo. Y no sólo eso, en algunos casos, los intrones del grupo II se transcriben en fragmentos que se ensamblan después de formar puentes de hidrógeno con el intrón catalítico, de un modo análogo al ensamblaje de los snRNAs en el espliceosoma.

Estas similitudes hacen suponer que la maduración de los precursores de los mRNAs catalizada por los espliceosomas evolucionó a partir de la automaduración catalizada por RNA. La maduración del grupo II bien podría ser un intermediario entre la maduración del grupo I y la maduración que tiene lugar en el núcleo de los eucariotas superiores. Una etapa fundamental en esta transición fue la transferencia del poder catalítico desde el propio intrón a otras moléculas. La formación de los espliceosomas otorgó a los genes una nueva libertad, ya que los intrones dejaron de estar obligados a suministrar el centro catalítico para la maduración. Otra ventaja de los catalizadores externos para la maduración es que se pueden regular más fácilmente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las similitudes no suponen parentesco. Las similitudes entre los intrones del grupo II y la maduración del mRNA pueden ser el resultado de una evolución convergente. Quizás sólo haya un número limitado de formas que permitan escindir los intrones de manera eficiente y específica. Para determinar si estas similitudes derivan de un antepasado común o de la química habrá que ampliar nuestro conocimiento sobre la bioquímica del RNA.

Figura 29.39 Mecanismo de la automaduración. El mecanismo catalítico de la maduración de los intrones del grupo I incluye una serie de reacciones de transesterificación. [Tomado de T. Cech. RNA as an enzyme. Copyright © 1986 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

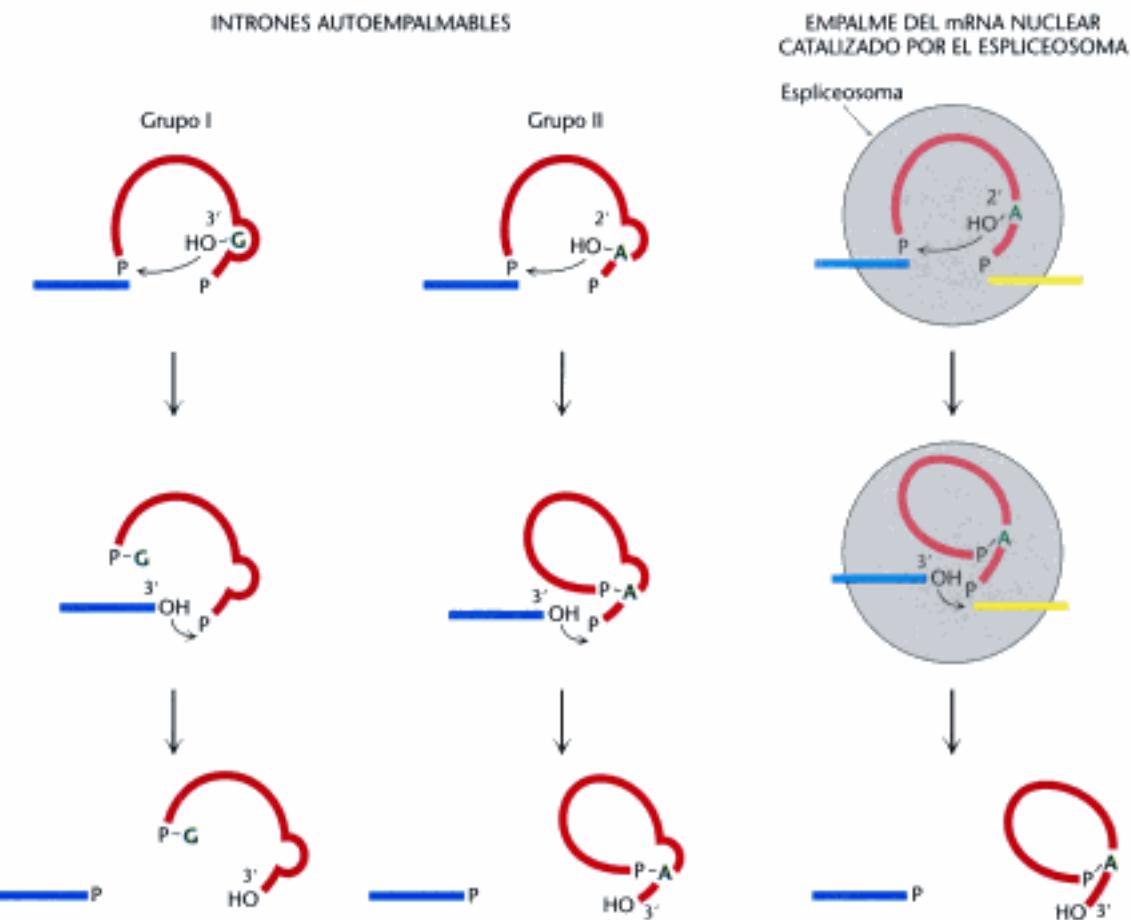


Figura 29.40 Comparación de las vías de maduración. Los exones que se van a juntar se representan en azul y en amarillo y la unidad atacante se muestra en verde. En la maduración del grupo I y del grupo II el centro catalítico está formado por el propio intrón (en rojo). Por el contrario, la maduración de los precursores nucleares del mRNA está catalizada en el espliceosoma por los snRNAs y sus proteínas asociadas. [Tomado de P. A. Sharp. Science 235(1987): 766-771.]

Resumen

29.1 La transcripción está catalizada por la RNA polimerasa

Todas las moléculas de RNA de la célula se sintetizan por RNA polimerasas según las instrucciones proporcionadas por los moldes de DNA. Los sustratos monoméricos activados son ribonucleósidos trifosfato. La dirección de la síntesis del RNA es $5' \rightarrow 3'$, como en la síntesis del DNA. Las RNA polimerasas, a diferencia de las DNA polimerasas, no necesitan un cebador ni poseen actividad nucleasa para la corrección de errores.

La RNA polimerasa de *E. coli* es un enzima con múltiples subunidades. La organización de las subunidades del holoenzima de ~500 kd es $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ y la del núcleo enzimático es $\alpha_2\beta\beta'$. La transcripción se inicia en los centros promotores, que están formados por dos secuencias, una centrada en torno a la posición -10 y otra en torno a la posición -35; es decir, a 10 y 35 nucleótidos de distancia del punto de partida en el sentido 5' (corriente arriba). La secuencia consenso de la región -10 es TATAAT. La subunidad σ permite al holoenzima reconocer los centros promotores. Cuando se eleva la temperatura del medio de cultivo, *E. coli* expresa una subunidad σ especial que se une selectivamente al promotor característico de los genes de choque térmico. Para que la transcripción tenga lugar, la RNA polimerasa tiene que desenrollar la doble hélice del molde. El desenrollamiento expone unas 17 bases de la hebra molde y prepara el escenario para la formación del primer enlace fosfodiéster. Las cadenas de

Hidden page

29.4 El descubrimiento del RNA catalítico resultó esclarecedor tanto desde el punto de vista del mecanismo como de la evolución

853

Lecturas seleccionadas

Algunas moléculas de RNA, como las que contienen intrones del grupo I, experimentan una automaduración en ausencia de proteínas. En el caso del precursor del rRNA de 16S de *Tetrahymena*, una versión automodificada de este intrón posee una auténtica actividad catalítica y es, por tanto, un ribozima. La maduración catalizada por el espliceosoma puede haber evolucionado a partir de la automaduración. El descubrimiento del RNA catalítico ha abierto nuevos horizontes a nuestra investigación sobre las etapas tempranas de la evolución molecular y sobre el origen de la vida.

Términos clave

transcripción (p. 822)	dominio carboxilo terminal (CTD) (p. 834)	maduración del RNA (p. 843)
RNA polimerasa (p. 823)	caja TATA (p. 836)	espliceosoma (p. 843)
centro promotor (p. 823)	intensificador (p. 838)	RNA pequeño nuclear (snRNA) (p. 844)
factor de transcripción (p. 823)	ribonucleoproteínas pequeñas del nucleolo (snoRNPs) (p. 839)	partículas de ribonucleoproteína nucleares pequeñas (snRNPs) (p. 847)
técnica de la impronta (<i>footprinting</i>) (p. 824)	pre-mRNA (p. 840)	maduración alternativa (p. 847)
secuencia consenso (p. 825)	capuchón del extremo 5' (p. 840)	RNA catalítico (p. 848)
subunidad sigma (σ) (p. 825)	cola de poli(A) (p. 841)	automaduración (p. 849)
burbuja de transcripción (p. 828)	corrección del RNA (p. 842)	
proteína rho (p.) (p. 830)		

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Woychik, N. A., 1998. Fractions to functions: RNA polymerase II thirty years later. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63: 311-317.
Losick, R., 1998. Summary: Three decades after sigma. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 63:653-666.
Ast, G., 2005. The alternative genome. *Sci. Am.* 292(4):40-47.
Sharp, P. A., 1994. Split genes and RNA splicing. (Nobel Lecture). *Annu. Rev. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:1229-1240.
Cech, T. R., 1990. Nobel lecture: Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Biosci. Rep.* 10:239-261.
Villa, T., Pleiss, J. A., y Guthrie, C., 2002. Spliceosomal snRNAs : Mg²⁺ dependent chemistry at the catalytic core? *Cell* 109:149-152.

Libros

- Lewin, B., 2000. *Genes* (7^a ed.). Oxford University Press.
Kornberg, A. y Baker, T. A., 1992. *DNA Replication* (2^a ed.). W. H. Freeman and Company.
Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, P., Scott, M. P., Zipursky, S. L., y Darnell, J., 2004. *Molecular Cell Biology* (5^a ed.). W. H. Freeman and Company.
Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., y Losick, R., 2004. *Molecular Biology of the Gene* (5^a ed.). Pearson/Benjamin Cummings.
Gesteland, R. F., Cech, T., y Atkins, J. F., 2006. *The RNA World: The nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA* (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

RNA polimerasas

- Darst, S. A., 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:155-162.
Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igashiki, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., y Gourse, R. L., 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407-1413.

- Cramer, P., Bushnell, D. A., y Kornberg, R. D., 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science* 292:1863-1875.
Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., y Kornberg, R. D., 2001. Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292:1876-1882.
Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., y Darst, S. A., 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98: 811-824.
Campbell, E. A., Korzhev, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., y Darst, S. A., 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901-912.
Darst, S. A., 2004. New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.* 29:159-160.
Cheetham, G. M., y Steitz, T. A., 1999. Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* 286:2305-2309.
Ebright, R. H., 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Mol. Biol.* 304:687-698.
Paule, M. R., y White, R. J., 2000. Survey and summary: Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28: 1283-1298.

Iniciación y elongación

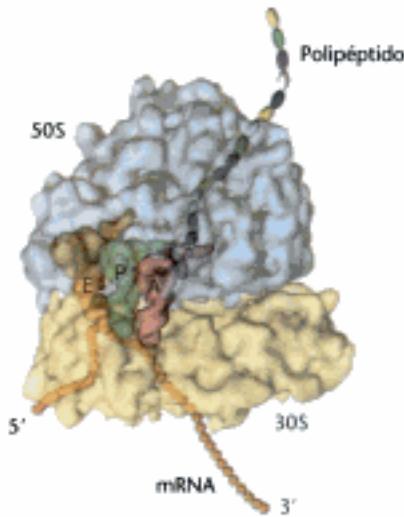
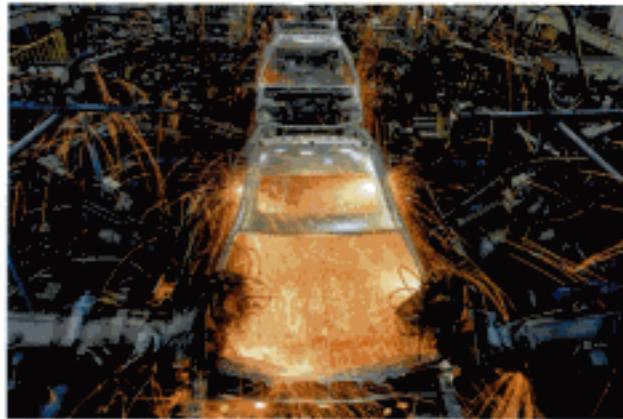
- Murakami, K. S., y Darst, S. A., 2003. Bacterial RNA polymerases: The whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:31-39.
Buratowski, S., 2000. Snapshots of RNA polymerase II transcription initiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:320-325.
Conaway, J. W., y Conaway, R. C., 1999. Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68:301-319.
Conaway, J. W., Shilatifard, A., Dvir, A., y Conaway, R. C., 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25:375-380.
Korzhev, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., y Darst, S. A., 2000. A structural model of transcription elongation. *Science* 289:619-625.
Reines, D., Conaway, R. C., y Conaway, J. W., 1999. Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:342-346.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Síntesis de proteínas



El ribosoma, representado a la derecha, es una fábrica para la manufactura de polipéptidos. Los aminoácidos se transportan al ribosoma uno a uno, unidos a las moléculas de RNA de transferencia. Cada aminoácido se une a la cadena polipeptídica en crecimiento que se separa del ribosoma sólo una vez que se ha completado. Este ensamblaje por aproximación en línea permite que incluso cadenas polipeptídicas muy largas se ensamblen rápidamente y con una fidelidad impresionante. [(Izquierda) Doug Martin/Photo Researchers].

La importancia de la información genética reside en las proteínas que codifican ya que estas proteínas desempeñan la mayor parte de las funciones de las células. En los Capítulos 28 y 29, hemos estudiado cómo se replica el DNA y cómo el DNA se transcribe en RNA. Ahora enfocamos el mecanismo de la síntesis de proteínas, un proceso llamado traducción debido a que el alfabeto de cuatro letras de los ácidos nucleicos se traduce al alfabeto completamente distinto de veinte letras de las proteínas. La traducción es un proceso conceptualmente más complejo que la replicación o la transcripción, porque éstos tienen lugar con un mismo lenguaje de apareamiento de bases. Incidiendo en una encrucijada entre los lenguajes de los ácidos nucleicos y de las proteínas, el proceso de la síntesis depende de forma crítica de ambos tipos de factores, ácidos nucleicos y proteínas. La síntesis de proteínas se produce en los *ribosomas*: complejos enormes que contienen tres grandes moléculas de RNA y más de cincuenta proteínas. Uno de los brillantes triunfos de la bioquímica en los años recientes ha sido la determinación de la estructura del ribosoma y sus componentes de modo que su función puede ser analizada con detalle atómico. Quizás la conclusión más significativa de estos estudios es que *el ribosoma es un ribozima*; es decir, los componentes de RNA desempeñan en él los papeles fundamentales. Esas observaciones refuerzan la idea de que el ribosoma es un superviviente del primitivo mundo de RNA, de modo que el ribosoma es rico en información respecto a las etapas muy primitivas de la evolución biológica.

Contenido

- 30.1 La síntesis de proteínas requiere la traducción de secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos
- 30.2 Las aminoacil-tRNA sintetases interpretan el código genético
- 30.3 Un ribosoma es una partícula ribonucleoproteica (70S) formada por una subunidad pequeña (30S) y otra grande (50S)
- 30.4 Los factores proteicos desempeñan papeles clave en la síntesis de las proteínas
- 30.5 La síntesis de proteínas eucarióticas difiere de la síntesis de proteínas procarióticas principalmente en la iniciación de la traducción
- 30.6 Los ribosomas unidos al retículo endoplásmico elaboran las proteínas de secreción y de membrana
- 30.7 Muchos antibióticos y toxinas pueden inhibir la síntesis de las proteínas

Las moléculas de RNA de transferencia (tRNAs), el RNA mensajero, y muchas proteínas participan con los ribosomas en la síntesis proteica. Las uniones entre los aminoácidos y los ácidos nucleicos se realizan al principio por enzimas llamados aminoacil-tRNA sintetasas. Debido a que unen un aminoácido particular a cada tRNA, estos enzimas contribuyen a aplicar el código genético. Este capítulo está dedicado en principio a la síntesis de proteínas en procariotas debido a que ilustra muchos principios generales y se conoce bastante bien. También se presentan algunas características distintivas de la síntesis de proteínas en eucariotas.

30.1 La síntesis de proteínas requiere la traducción de secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos

Las bases de la síntesis de proteínas son las mismas en todos los reinos de la vida, evidenciando el hecho de que el sistema de la síntesis de proteínas apareció muy pronto en la evolución. Las proteínas se sintetizan en el sentido desde el extremo amino hacia el carboxilo mediante la adición sucesiva de aminoácidos en el carboxilo terminal de la cadena peptídica en crecimiento (Figura 30.1). Los aminoácidos llegan a la cadena en crecimiento en forma activada como aminoacil-tRNAs, creados por la unión del grupo carboxilo de un aminoácido con el extremo 3' de la molécula de un RNA de transferencia. La unión de un aminoácido a su correspondiente tRNA viene catalizada por una *aminoacid-tRNA sintetasa*. La activación para esta reacción se obtiene por la hidrólisis de ATP. Para cada aminoácido hay normalmente un enzima activador y al menos un tipo de tRNA.

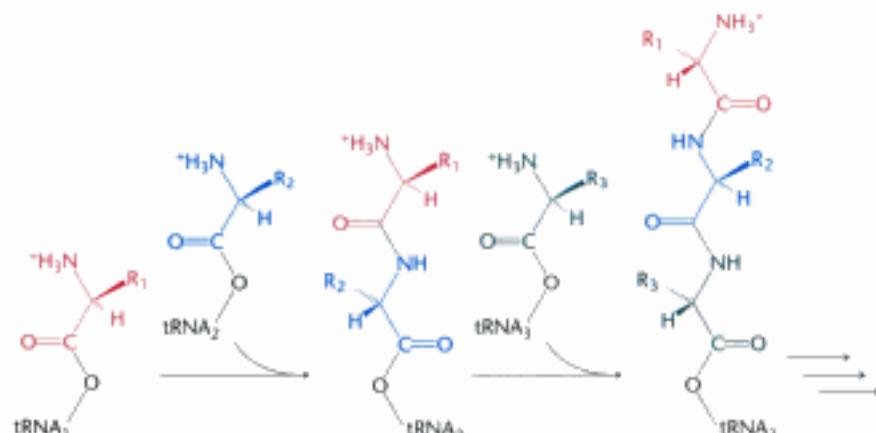


Figura 30.1 Crecimiento de la cadena polipeptídica. Las proteínas se sintetizan por adición sucesiva de aminoácidos al extremo carboxilo terminal.

La síntesis de proteínas largas requiere una frecuencia de error pequeña

El proceso de la transcripción es análogo a copiar, palabra por palabra, una página de un libro. En este caso no hay cambio en el alfabeto o vocabulario; así la posibilidad de un cambio en el significado es pequeña. Traducir la secuencia de bases de una molécula de un RNA en una secuencia de aminoácidos es similar a traducir la página de un libro a otro idioma distinto; la traducción es un proceso complejo, que se produce en muchas etapas y requiere docenas de moléculas. Existe una posibilidad de error en cada uno de los pasos. La complejidad de la traducción crea un conflicto entre dos requerimientos: el proceso no sólo debe ser preciso, sino lo suficientemente rápido para cubrir las necesidades celulares. En *E. coli*, la traducción se produce a razón de 20 aminoácidos por segundo, una velocidad realmente impresionante si consideramos la complejidad del proceso.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

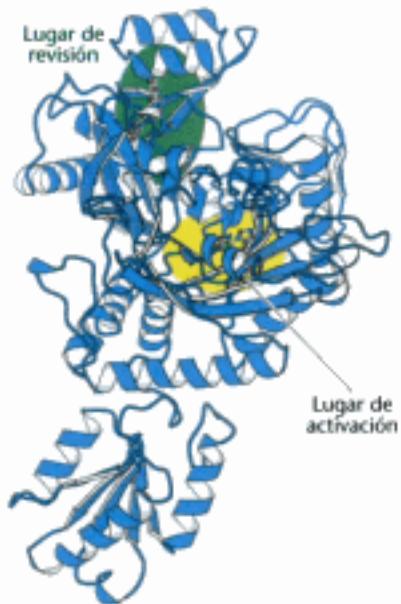


Figura 30.8 Lugar de revisión. Los resultados de estudios de mutagénesis revelan la posición del lugar de revisión (en verde) en la treonil-tRNA sintetasa. Se muestra sólo una subunidad del enzima dímerico, aquí y en las ilustraciones siguientes. [Tomado de 1QF6.pdb.]

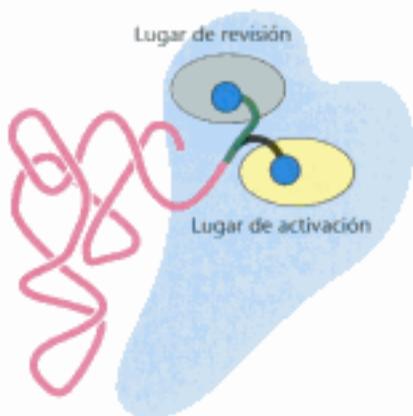


Figura 30.9 Revisión de un aminoacil-tRNA. El brazo flexible CCA de un aminoacil-tRNA puede trasladar al aminoácido entre el lugar de activación y el de revisión. Si el aminoácido encaja bien en el lugar de revisión, el aminoácido se separa por hidrólisis.

de la anhidrasa carbónica (p. 255), el resto de los lugares de coordinación están disponibles para unirse al sustrato. La treonina se coordina con el ion de zinc con su grupo amino y su grupo hidroxilo de la cadena lateral. El grupo hidroxilo de la cadena lateral es reconocido posteriormente por un resto de aspartato que se une a él por medio de un puente de hidrógeno. El grupo metilo presente en la valina en lugar de este hidroxilo no puede participar en esas interacciones; se excluye del centro activo, y por ello no se adenila y transfiere al treonil-tRNA (abreviadamente tRNA^{Thr}). El uso del ion de zinc parece ser exclusivo de la treonil-tRNA sintetasa; otras aminoacil-tRNA sintetasas presentan diferentes estrategias para reconocer a sus aminoácidos propios. El grupo carboxilato de la treonina posicionada correctamente está disponible para atraer el grupo α fosforilo del ATP y así formar el aminoacil-adenilato.

El lugar del zinc es menos adecuado para discriminar a la serina debido a que este aminoácido tiene un grupo hidroxilo que puede unirse al zinc. Por ello, si poseyese este único mecanismo, la treonil-tRNA tomaría serina en vez de treonina con una tasa de 10^{-2} a 10^{-3} veces menor. Como se especifica en la p. 858 este error sería capaz de producir muchos errores en la traducción. ¿Cómo se alcanza un nivel más alto de especificidad?

La revisión hecha por las aminoacil-tRNA sintetasas aumenta la fidelidad en la síntesis de las proteínas.

La treonil-tRNA sintetasa puede incubarse con tRNA^{Thr} que esté unido covalentemente con serina (Ser-tRNA^{Thr}); el tRNA “se carga erróneamente”. La reacción es inmediata: una hidrólisis rápida del aminoacil-tRNA produce serina y tRNA libre. Por el contrario, la incubación con el Thr-tRNA^{Thr}, correctamente cargado, no produce reacción. De ahí que la treonil-tRNA sintetasa contenga un lugar funcional añadido que hidroliza Ser-tRNA^{Thr} pero no Thr-tRNA^{Thr}. Este lugar de revisión y corrección confiere una oportunidad a la sintetasa para corregir sus errores y aumenta su fidelidad hasta alcanzar menos de un error en 10^4 veces. Los resultados de estudios estructurales y por mutagénesis revelan que el lugar de revisión está situado a más 20 Å del lugar de activación (Figura 30.8). Este lugar acepta sin esfuerzos y corta a Ser-tRNA^{Thr} pero no corta a Thr-tRNA^{Thr}. La discriminación entre la serina y la treonina es relativamente fácil debido a que la treonina tiene un grupo metilo extra; un lugar conformado para la estructura de la serina excluirá estéricamente a la treonina.

La mayoría de las aminoacil-tRNA sintetasas contienen lugares de revisión además de lugares de acilación. Esta complementariedad de pares de lugares funciona como un *doble tamiz* para asegurar una fidelidad muy alta. Por regla general los lugares de acilación rechazan *aminoácidos mayores* que el correcto debido a que el tamaño del lugar es insuficiente para ellos, mientras que el lugar hidrolítico rompe las especies activadas *menores* que la correcta.

La estructura del complejo entre la treonil-tRNA sintetasa y su sustrato revela que el CCA aminoacilado puede balancearse entre el lugar de activación y el lugar de revisión (Figura 30.9). Por ello, el aminoacil-tRNA puede revisarse sin disociarse de la sintetasa. Esta corrección de pruebas, que depende de la flexibilidad conformacional de una corta extensión de secuencia polinucleotídica, es completamente análoga a la de la DNA polimerasa (p. 807). En ambos casos, la revisión sin disociación significativa aumenta la fidelidad con sólo modestos costes de tiempo y energía.

Algunas sintetasas alcanzan una gran precisión sin revisión. Por ejemplo, la tirosil-tRNA sintetasa no tiene dificultad en discriminar entre tirosina y fenilalanina; el grupo hidroxilo del anillo de la tirosina proporciona la capacidad a la tirosina de unirse al enzima 10^4 veces más fuertemente que la fenilalanina. *La revisión se*

ha seleccionado durante la evolución sólo cuando se necesita mejorar la fidelidad por encima de la obtenida por la interacción de unión inicial.

Las sintetasas reconocen diversos rasgos de las moléculas de RNA de transferencia

¿Cómo escogen las sintetasas sus tRNA correspondientes? Este paso enormemente importante es el punto en que la "traducción" tiene lugar, en el cual se produce la correlación entre los mundos del aminoácido y del ácido nucleico. En cierto sentido, las aminoacil-tRNA sintetasas son las únicas moléculas en biología que "conocen" el código genético. Su conocimiento preciso de los tRNAs es tan importante para una alta fidelidad en la síntesis de proteínas como lo es la exacta selección de los aminoácidos. En general, el reconocimiento del tRNA por la sintetasa es diferente para cada una de las parejas sintetasa y tRNA. En consecuencia, resulta difícil hacer generalizaciones. Vamos a estudiar la interacción de dos sintetasas con sus correspondientes tRNAs.

A priori, el anticodón del tRNA puede parecer un buen identificador debido a que cada tipo de tRNA es diferente de los demás. Realmente, *algunas sintetasas reconocen su tRNA correspondiente principalmente por las bases de sus anticodones*, a pesar de que pueden reconocer también otros aspectos de la estructura de tRNA. La evidencia más directa proviene de los resultados de los estudios cristalográficos de complejos formados entre sintetasas y sus tRNAs correspondientes. Consideremos por ejemplo la estructura del complejo entre treonil-tRNA sintetasa y tRNA^{Thr} (Figura 30.10). Como se esperaba, el brazo CCA se introduce en el sitio de activación que contiene zinc, donde queda bien colocado para aceptar la treonina del treoniladenilato. El enzima interacciona extensivamente no sólo con el tallo aceptor del tRNA, sino también con el lazo anticodón. Las interacciones con el lazo anticodón son particularmente reveladoras. Cada base de la secuencia 5'-CGU-3' del anticodón establece puentes de hidrógeno con el enzima; aquellos en que toman parte G y U parecen ser los más importantes porque la C puede ser reemplazada por G o U sin pérdida en la eficiencia aciladora.

Estudios de mutagénesis establecieron que no todas las sintetasas interaccionan con los anticodones de sus tRNAs respectivos. Así, por ejemplo, el tRNA^{Cys} de *E. coli* difiere del tRNA^{Ala} en 40 posiciones y contiene un par de bases C-G en la posición 3:70. Cuando se cambia este par de bases C - G por el par G - U, que no es de Watson y Crick, el tRNA^{Cys} es reconocido por la alanil-tRNA sintetasa como si fuese tRNA^{Ala}. Este hallazgo planteó la cuestión de si un fragmento de tRNA es suficiente para la aminoacilación por la alanil-tRNA sintetasa. Además, una "microhélice" que contiene 24 de los 76 nucleótidos del tRNA nativo es aminoacilada específicamente por la alanil-tRNA sintetasa. Esta microhélice contiene sólo el tallo aceptor y un bucle en horquilla (Figura 30.11). De ahí que, la aminoacilación específica es posible para algunas sintetasas incluso si el lazo anticodón falta por completo.

Las aminoacil-tRNA sintetasas pueden dividirse en dos clases

Existen al menos una aminoacil-tRNA sintetasa para cada aminoácido. Los diversos tamaños, la composición en subunidades, y las secuencias de estos enzimas fueron desconcertantes durante muchos años. ¿Pudo ser que todas las sintetasas evolucionasen de forma prácticamente independiente? La determinación de estructuras tridimensionales de varias sintetasas seguida por comparaciones más cui-

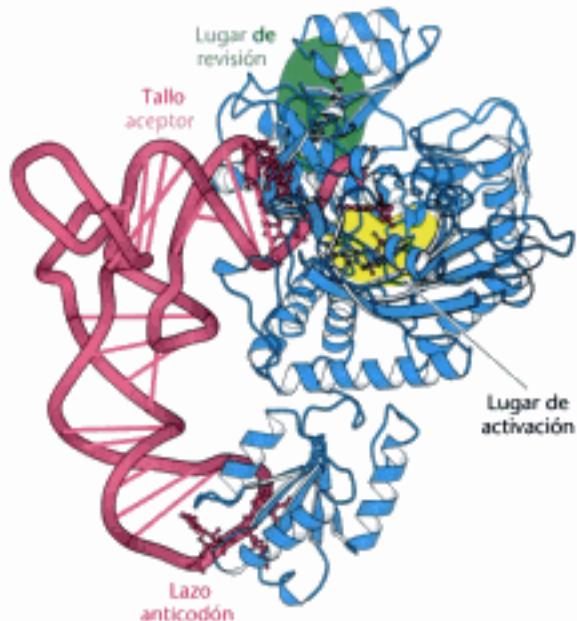
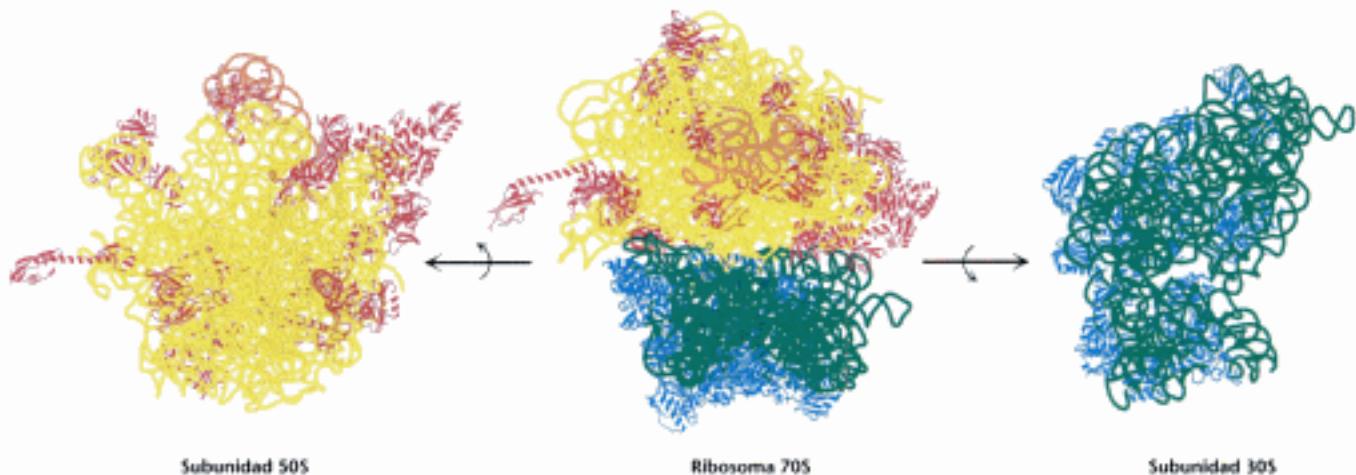


Figura 30.10 Complejo treonil-tRNA sintetasa. La estructura muestra el complejo formado por la treonil-tRNA sintetasa y el tRNA^{Thr}. Nótese que la sintetasa se une tanto al tallo aceptor como al lazo anticodón. [Tomado de 1QF6.pdb.]

A	76
C	
C	
A	
1	G • C
	G • C
3	G • U 70
	G • C
	C • G
	U • A
	A • U 66
U	C 13
A	
	G C
	10

Figura 30.11 Microhélice reconocida por la alanil-tRNA sintetasa. Un tallo-bucle que contiene únicamente 24 nucleótidos correspondientes al tallo aceptor es aminoacilado por la alanil-tRNA sintetasa.

Hidden page



de “large”, grande) y dos moléculas de RNA, una de 23S y otra de 5S. Cada ribosoma contiene una copia de cada una de las moléculas de RNA, dos copias de las proteínas L7 y L12 y una de las restantes. L7 es prácticamente idéntica a L12, y sólo difiere de ella porque su extremo amino está acetilado. Tanto la subunidad 30S como la 50S se pueden reconstruir *in vitro* a partir de sus proteínas constituyentes y el RNA, tal como demostró por vez primera Masayasu Nomura, en 1968. *Esta reconstitución es un ejemplo destacado del principio de que los complejos supramoleculares pueden formarse espontáneamente a partir de sus constituyentes macromoleculares.*

Los estudios de microscopía electrónica del ribosoma con alta resolución creciente aportan visiones sobre la estructura general y revelan las posiciones de los lugares de unión con el tRNA. Se han realizado asombrosos avances sobre la estructura del ribosoma por medio de métodos cristalográficos con rayos X tras el trabajo pionero de Ada Yonath. Las estructuras de las subunidades 30S y 50S se han determinado casi hasta resolución atómica, y la averiguación de la estructura del ribosoma 70S intacto a similar resolución las ha seguido con rapidez (Figura 30.13). La determinación de esta estructura requiere fijar la posición de más de 100 000 átomos. Las características de esas estructuras están en plena concordancia con las interpretaciones de pruebas experimentales menos directas. Estas estructuras aportan un armazón inestimable para examinar el mecanismo de la síntesis proteica.

Los RNAs ribosómicos (5S, 16S y 23S rRNAs) desempeñan un papel fundamental en la síntesis de las proteínas

El prefijo *ribo* del nombre *ribosoma* es adecuado, porque el RNA representa casi las dos terceras partes de la masa de estas grandes asociaciones moleculares. Los tres RNAs presentes (5S, 16S y 23S) son fundamentales para la arquitectura y función de los ribosomas. Se forman mediante la ruptura de transcritos primarios de 30S y su posterior procesamiento o maduración. Estas moléculas se pliegan para formar estructuras que les permiten establecer pares de bases internos. Las pautas de emparejamiento de bases de estas moléculas se han deducido mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos de muchas especies. Por ejemplo, una especie de RNA puede tener el par de bases G–C, mientras que otra tiene A–U, pero ambos pares están localizados en el mismo sitio en ambas moléculas. Los experimentos de modificación química y de digestión confirman las estructuras deducidas de la comparación de las secuencias (Figura 30.14). El hallazgo sorprendente es que los *RNA ribosómicos (rRNAs)* están plegados en estructuras definidas con muchas regiones dúplex bastante cortas. Esta conclusión y esencialmente todas las características de la estructura secundaria han sido confirmadas por las estructuras determinadas por cristalografía de rayos X.



Figura 30.13 El ribosoma a alta resolución. Modelos detallados del ribosoma basados en los resultados de estudios cristalográficos con rayos X del ribosoma 70S y de las subunidades 30S y 50S. El RNA 23S se muestra en amarillo, el RNA 5S en color naranja, el RNA 16S en verde, las proteínas de la subunidad 50S en rojo, y las proteínas de la subunidad 30S en azul. Nótese que la interfase entre las subunidades 50S y 30S está constituida por entero por RNA. [Tomado de 1GIX.pdb y 1GIY.pdb.]

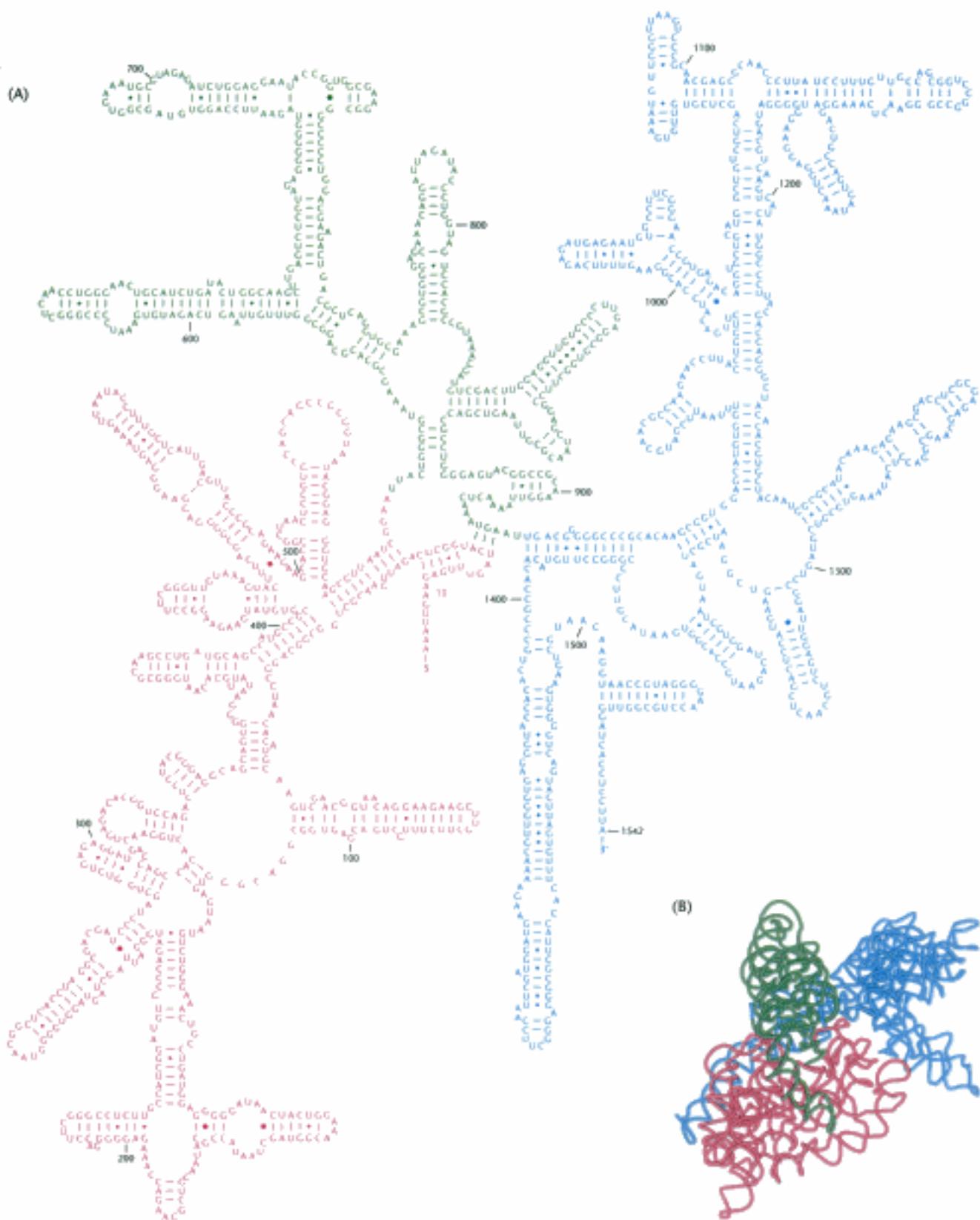


Figura 30.14 Modelo de plegamiento de RNA ribosómico. (A) La estructura secundaria del RNA ribosómico 16S deducida a partir de la comparación de la secuencia y los resultados de estudios químicos. (B) La estructura terciaria del RNA 16S determinada por cristalografía de rayos X. [Parte (A) cortesía del Dr. Bryn Weiser y del Dr. Harry Soller. Parte (B) tomada de 1FG.pdb.]

Hidden page

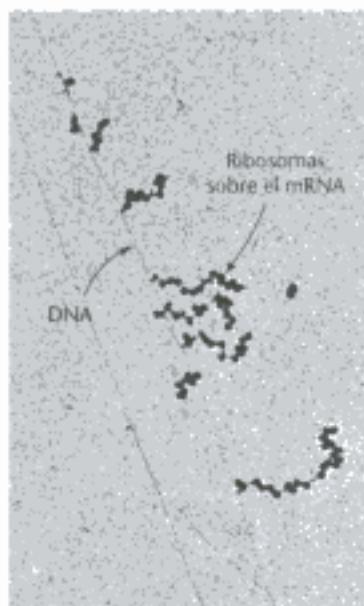


Figura 30.15 Polisomas. La transcripción de un segmento de DNA de *E. coli* genera moléculas de mRNA que son inmediatamente traducidas por numerosos ribosomas. [De O. L. Miller, Jr., B. A. Hamkalo y C. A. Thomas, Jr. *Science* 169 (1970): 392-395.]

tizado, mucho antes de que se haya terminado el extremo 3' de la molécula de mRNA. *Un aspecto importante de la expresión genética en procariotas es que la traducción y la transcripción están estrechamente acopladas en el espacio y en el tiempo.* Muchos ribosomas pueden traducir simultáneamente una misma molécula de mRNA. Esta síntesis paralela aumenta de manera importante la eficacia de la traducción del mRNA. El grupo de ribosomas unidos a una molécula mRNA se llama *polirribosoma* o *polisoma* (Figura 30.15).

La señal de partida es AUG (o GUG) precedida por varias bases que se aparean con el rRNA de 16S

¿Cómo comienza la síntesis de las proteínas? La posibilidad más sencilla podría ser que los tres primeros nucleótidos de cada mRNA sirvieran como primer codón; entonces no sería necesaria ninguna señal especial. Sin embargo, los hechos experimentales denotan que la traducción no comienza inmediatamente en el extremo 5' del mRNA. De hecho, el primer codón traducido está a unos 25 nucleótidos de distancia del extremo 5'. Por otra parte, en procariotas, muchas moléculas de mRNA son *policistrónicas*, o poligénicas, es decir, que codifican dos o más cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, en *E. coli*, una simple molécula de mRNA de aproximadamente 7000 nucleótidos de longitud codifica cinco enzimas de la vía biosintética del triptófano. Cada una de esas cinco proteínas dispone de sus propias señales de comienzo y de parada en el mRNA. De hecho, *todas las moléculas de mRNA conocidas contienen señales que definen el comienzo y el final de cada cadena polipeptídica que codifican.*

Una de las claves para conocer el mecanismo de iniciación fue el hallazgo de que casi la mitad de los residuos amino terminales de las proteínas de *E. coli* son metionina. Realmente, el codón de iniciación del mRNA es AUG (metionina) o, con menor frecuencia, GUG (valina) y rara vez UUG (leucina). ¿Qué otras señales son necesarias para especificar el lugar de iniciación de la traducción? El primer paso para responder a esta pregunta fue el aislamiento de las regiones de iniciación de varios mRNAs. Este aislamiento se consiguió utilizando ribonucleasa pancreática para digerir los complejos mRNA-ribosoma (formados en condiciones que permitían la iniciación de la cadena, pero su elongación). En cada caso, una secuencia de unos treinta nucleótidos quedaba protegida de la digestión. Como se esperaba, cada una de estas regiones de iniciación contenía un codón AUG (o GUG o bien UUG) (Figura 30.16). Además, cada región de iniciación contiene una secuencia rica en bases púricas cuyo centro está situado unos 10 nucleótidos más allá del extremo 5' del codón iniciador.

La función de esta región rica en purinas, llamada *secuencia de Shine-Dalgarno*, se hizo evidente al averiguar la secuencia del RNA de 16S. El extremo 3' de este RNA integrante de la subunidad 30S contiene una secuencia de varias bases que resulta complementaria a la región rica en purinas de los sitios de iniciación de los mRNAs. La mutagénesis de la secuencia CCUCC cerca del extremo 3' de los rRNA 16S a ACACA interfiere notoriamente en el reconocimiento de los lugares de iniciación del mRNA. Esa y otras evidencias demuestran que la región iniciadora del mRNA se une

5'	3'	
AGCACGAGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC	trpA de <i>E. coli</i>	
UUUUGGAU <u>GGAGU</u> GAAC <u>CGA</u> U <u>GCG</u> GAUUGCA	araB de <i>E. coli</i>	
GGUAAC <u>CAGGU</u> AAC <u>CCA</u> <u>AUC</u> CGAGGUUG	thrA de <i>E. coli</i>	
CAAUUCAGGGUGGU <u>G</u> A <u>AUG</u> U <u>GAACC</u> AGUA	lacI de <i>E. coli</i>	
AAUCUU <u>GGAGC</u> UUUUUU <u>A</u> UGGUUCGUUCU	Proteína A del fago ϕ X174	
UAAC <u>UAGGA</u> U <u>GA</u> AUG <u>CA</u> U <u>GUCAAGAC</u> A	Replicasa del fago Qb	
UCCU <u>AGGAGG</u> U <u>U</u> U <u>AC</u> CUA <u>UGC</u> G <u>GU</u> UUU	Proteína A del fago R17	
AUGUAC <u>UAGGAGG</u> U <u>GU</u> A <u>UGG</u> A <u>ACAA</u> CGC	cro del fago λ	
Se aparea con el rRNA 16S Se aparea con el tRNA iniciador		

Figura 30.16 Lugares de iniciación. Secuencias de los lugares de iniciación para la síntesis de proteínas de algunas bacterias y moléculas de mRNA virico. La comparación de esas secuencias revela algunas características comunes.

al rRNA 16S cerca de su extremo 3'. El número de pares de bases que unen al mRNA y al rRNA 16S varía entre tres y nueve. Así pues, dos tipos de interacciones determinan donde comienza la síntesis de proteínas: (1) el apareamiento de bases de su mRNA con el extremo 3' del rRNA 16S y (2) el apareamiento del codón de iniciación de su mRNA con el anticodón de la molécula de tRNA iniciador.

La síntesis de proteínas en las bacterias se inicia con el formilmetyionil-RNA de transferencia

El resto de metionina que se encuentra en el extremo amino terminal de las proteínas de *E. coli* está por lo general modificado. En realidad, la síntesis de las proteínas en las bacterias empieza con *N*-formilmetyionina (*fMet*). Hay un tRNA especial que coloca la formilmetyionina en el ribosoma para iniciar la síntesis de las proteínas. Este tRNA iniciador (abreviado como tRNA_f) es diferente del que inserta metionina en posiciones internas de la proteína (abreviado como tRNA_m). El subíndice "f" indica que la metionina unida al tRNA iniciador puede formilarse, mientras que si está unida al tRNA_m no puede hacerlo. El RNA_f de transferencia puede unirse a los tres codones de iniciación, pero con afinidad decreciente (AUG>GUG>UUG). En la mitad aproximadamente de las proteínas de *E. coli*, la N-formilmetyionina es arrancada de la cadena polipeptídica naciente cuando sale del ribosoma.

La metionina se une a estas dos clases de tRNA por medio de la misma aminoacil-tRNA sintetasa. Un enzima específico formila después el grupo amino de la metionina que está unida al tRNA_f (Figura 30.17). El dador de formilo activado para esta reacción es el *N*¹⁰-formiltetrahidrofolato (p. 689). Es significativo que ni la metionina libre ni la metionil-tRNA_m sean sustratos aptos para esta transformilasa.

Los ribosomas tienen tres lugares de unión para los tRNAs conformados por las subunidades 30S y 50S

Una instantánea de un momento significativo en la síntesis de proteínas se obtuvo determinando la estructura del ribosoma unido a tres moléculas de tRNA y a un fragmento de mRNA (Figura 30.18). Como se esperaba, el fragmento de mRNA se unió a la subunidad 30S. Cada una de las moléculas de tRNA hace de puente entre las subunidades 30S y 50S. En el 30S, dos de las tres moléculas de tRNA están unidas al

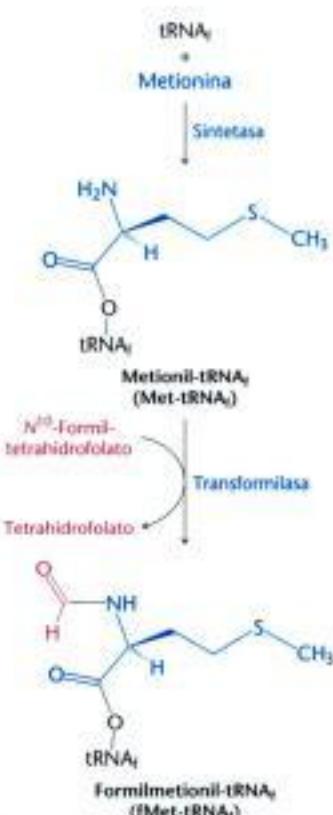


Figura 30.17 Formulación del metionil-tRNA. El tRNA iniciador (tRNA_f) se carga primero con metionina, y después se transfiere un grupo formilo al metionil-tRNA_f, a partir de *N*¹⁰-formiltetrahidrofolato.

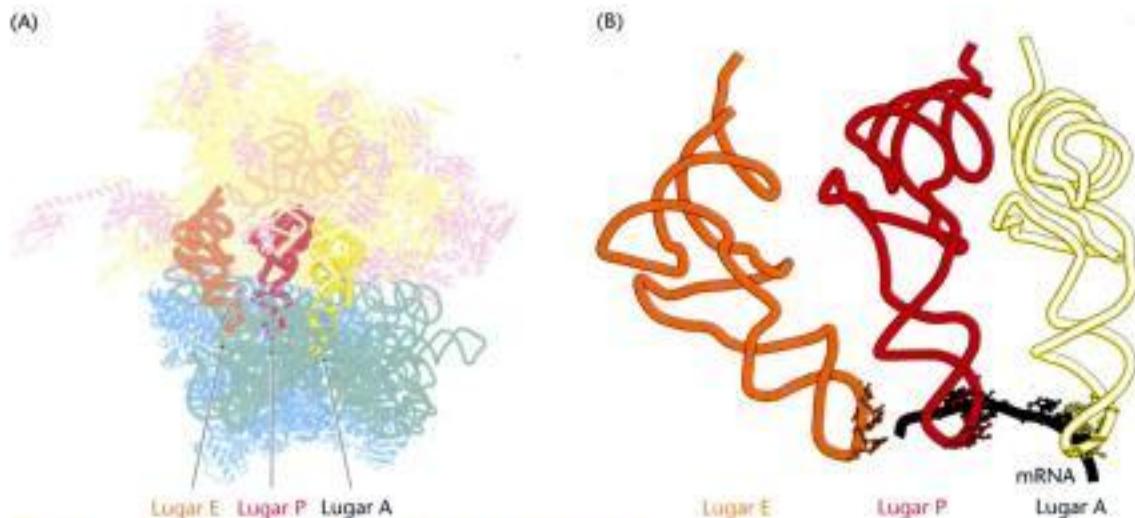


Figura 30.18 Lugares de unión del RNA de transferencia. (A) Existen tres lugares de unión para los tRNAs en el ribosoma 70S. Se llaman sitio A (por aminoacilo), P (por peptidilo) y E (por "exit", salida). Cada molécula de tRNA contacta con la subunidad 30S y conjuntamente con la 50S. (B) Las moléculas de tRNA están apareadas con el mRNA en los lugares A y P. [Tomado de 1JGP.pdb.]

fragmento de mRNA a través de parejas de bases codón-anticodón. Esos lugares de unión se llaman lugar A (por aminoacilo) y lugar P (por peptidilo). La tercera molécula de tRNA está unida a un sitio adyacente llamado lugar E (de “exit”, salida).

El otro extremo de cada molécula de tRNA interacciona con la subunidad 50S. Los tallos aceptores de las moléculas de tRNA que ocupan los lugares A y P convergen hacia el sitio donde se forma el enlace peptídico. Un examen posterior de este lugar ha revelado que un túnel conecta este lugar con la parte posterior del ribosoma. *La cadena polipeptídica creciente escapa a través de este túnel durante la síntesis.*

Cuando se forma del enlace peptídico, la cadena polipeptídica en crecimiento es transferida de un tRNA a otro.

La síntesis de proteínas comienza con la interacción de la subunidad 30S y el mRNA a través de la secuencia Shine-Delgarno. En la formación de este complejo, el tRNA iniciador cargado con formilmetionina se une al codón iniciador AUG y la subunidad 50S se une a la subunidad 30S para formar el ribosoma 70S completo. ¿Cómo podrá aumentar la cadena polipeptídica en longitud (Figura 30.19)? Los tres lugares en nuestra instantánea de la síntesis proteica nos dan la clave. El tRNA iniciador se une al lugar P del ribosoma. Un aminoacil-tRNA con un anticodón complementario al codón que está en el lugar A se une a continuación. La escena está preparada para la formación del enlace peptídico: la molécula de formilmetionina unida al tRNA iniciador va a ser transferida al grupo amino del aminoácido que ocupa el lugar A. La formación del enlace peptídico, una de las reacciones más importantes de la vida, es termodinámicamente espontánea y está catalizada por el lugar del rRNA 23S conocido como *el centro peptidiltransferasa*.

El grupo amino del aminoacil-tRNA del lugar A está bien posicionado para atacar el enlace éster entre el tRNA iniciador y la molécula de formilmetionina (Figura 30.20). El centro peptidiltransferasa posee bases que promueven esta reacción ayudando a formar un grupo $-NH_2$ en el aminoacil-tRNA del lugar A y ayudando a es-

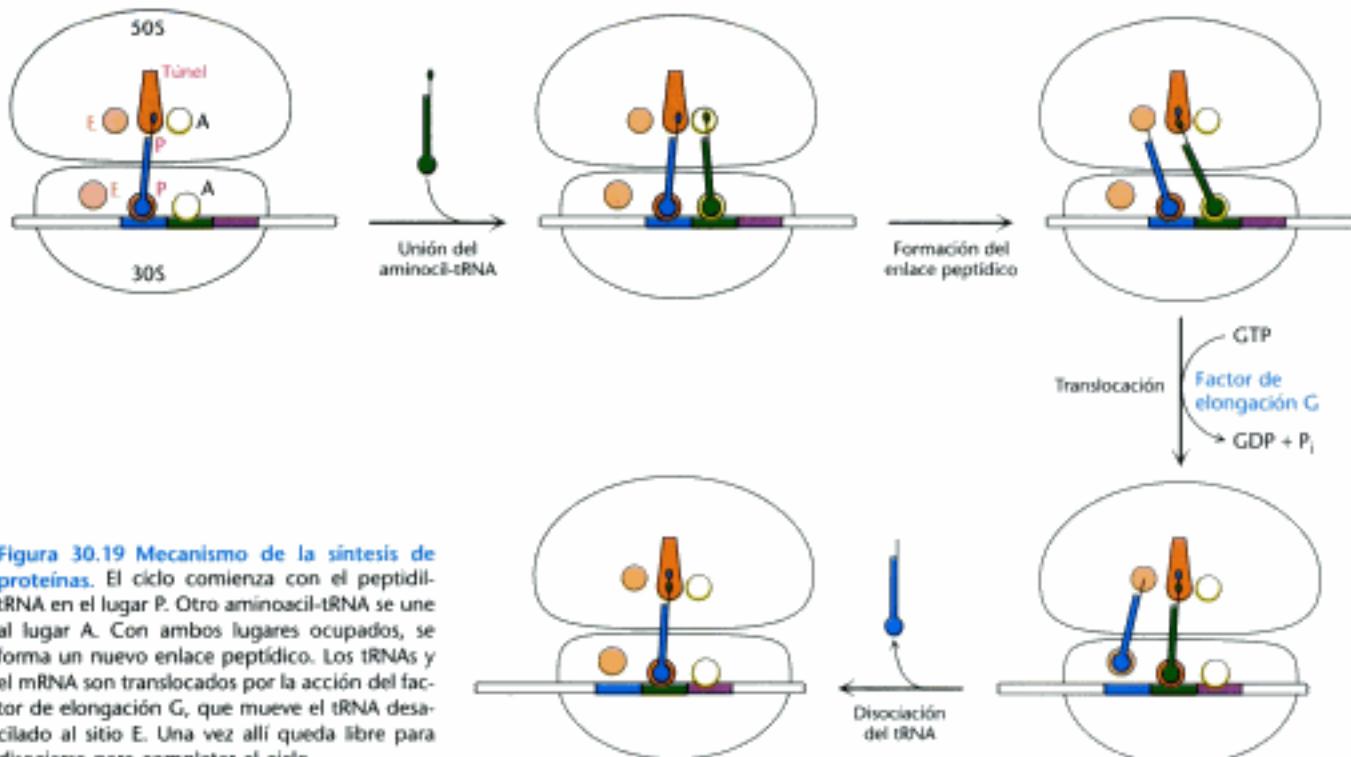


Figura 30.19 Mecanismo de la síntesis de proteínas. El ciclo comienza con el peptidil-tRNA en el lugar P. Otro aminoacil-tRNA se une al lugar A. Con ambos lugares ocupados, se forma un nuevo enlace peptídico. Los tRNAs y el mRNA son translocados por la acción del factor de elongación G, que mueve el tRNA desacilado al sitio E. Una vez allí queda libre para disociarse para completar el ciclo.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

tRNA sólo en la forma GTP (Figura 30.23). La unión del EF-Tu al aminoacil-tRNA cumple dos funciones. En primer lugar, EF-Tu protege de la hidrólisis al delicado enlace éster del aminoacil-tRNA. En segundo lugar, el GTP del EF-Tu es hidrolizado a GDP cuando se forma un complejo apropiado entre el conjunto EF-Tu-aminoacil-tRNA y el ribosoma. Si el anticodón no está correctamente apareado con el codón, no tiene lugar la hidrólisis y el aminoacil-tRNA no es transferido al ribosoma. Este mecanismo permite que la energía libre de la hidrólisis del GTP contribuya a la fiabilidad en la síntesis de las proteínas. La hidrólisis del GTP también libera a EF-Tu del ribosoma.

El factor EF-Tu en su forma GDP debe unirse a otro aminoacil-tRNA. *El factor de elongación Ts*, que es el segundo factor de elongación, se une al complejo EF-Tu e induce la disociación del GDP. Finalmente se une GTP a EF-Tu, y se suelta EF-Ts. Es digno de mención que *el EF-Tu no interacciona con fMet-tRNA_f*. Por eso, este tRNA iniciador no se sitúa en el lugar A. En cambio, el Met-tRNA_m, como todos los demás aminoacil-tRNAs, sí se une a EF-Tu. Estos hallazgos explican el hecho de que *los codones AUG internos no sean leídos por el tRNA iniciador*. Inversamente, el factor de iniciación 2 reconoce al fMet-tRNA_f pero no a los demás tRNAs.

 Este ciclo GTP-GDP del EF-Tu recuerda el de las proteínas G heterotriméricas en la transducción de señales (p. 387) y al de las proteínas Ras en el control del crecimiento (p. 398). Esta semejanza es debida a su herencia evolutiva, ya que el dominio terminal de EF-Tu es homólogo al dominio de las NTPasas con lazo P de otras proteínas G. Los otros dos dominios del factor EF-Tu son distintivos; estos producen interacciones con el aminoacil-tRNA y con el ribosoma. En todos estos enzimas emparentados, el cambio de conformación entre las formas que contienen GTP y GDP permite un cambio en las moléculas interaccionantes. Una semejanza posterior es el requerimiento de una proteína adicional que cataliza el intercambio de GTP por GDP; ET-Ts cataliza el cambio a ET-Tu igual a como un receptor activado lo hace para la proteína G heterotrimérica.

La formación de un enlace peptídico va seguida de la translocación, dependiente de GTP, de los tRNAs y el mRNA

Una vez que el aminoacil-tRNA correcto se ha colocado en el lugar A, la transferencia de la cadena polipeptídica desde el tRNA situado en el lugar P es un proceso espontáneo, dirigido por la formación de un enlace peptídico más fuerte a partir del enlace éster. Sin embargo, la síntesis de proteínas no puede continuar sin la translocación del mRNA y del tRNA dentro del ribosoma. El mRNA debe desplazarse una distancia de tres nucleótidos de modo que el próximo codón se coloque en el lugar A para interaccionar con el próximo aminoacil-tRNA, y el tRNA desacilado se desplace del lugar P al E en la subunidad 30S. El desplazamiento del peptidil-tRNA del lugar A al P hace que el mRNA se desplace un codón, exponiendo el siguiente codón que va a ser traducido al lugar A del ribosoma.

La estructura tridimensional del ribosoma experimenta un cambio significativo durante la translocación, y las evidencias sugieren que la translocación puede ser el resultado de las propiedades peculiares del ribosoma. Sin embargo, unos factores proteicos aceleran el proceso. La translocación se potencia por el *factor de elongación G* (EF-G, también llamado *translocasa*). En la Figura 30.24 se presenta un posible mecanismo para acelerar el proceso de translocación. Primero, el factor EF-G en la forma GTP se une al ribosoma cerca del lugar A, interactuando con el rRNA 23S de la Subunidad 50S. La unión de EF-G al ribosoma estimula la actividad GTPasa de EF-G. La hidrólisis de GTP induce un cambio conformacional que desplaza el peptidil-tRNA del lugar A al lugar P, arrastrando el mRNA y el tRNA desacilado con él. La disociación de EF-G deja al ribosoma preparado para aceptar el próximo aminoacil-tRNA en el lugar A.

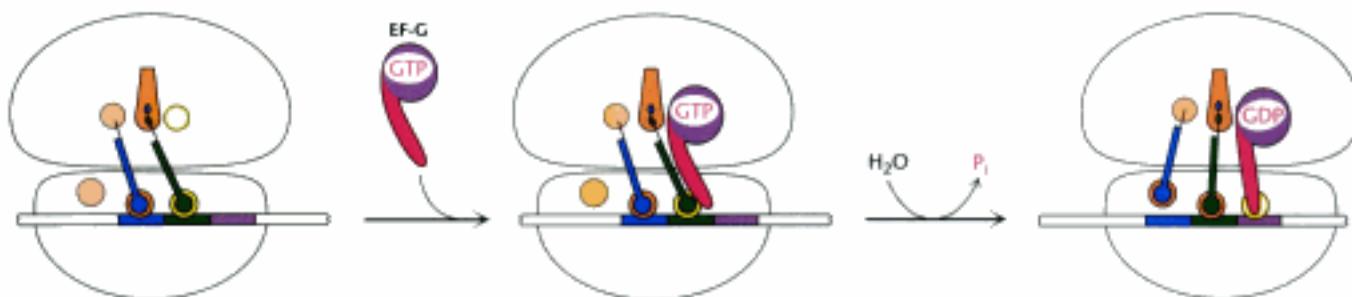
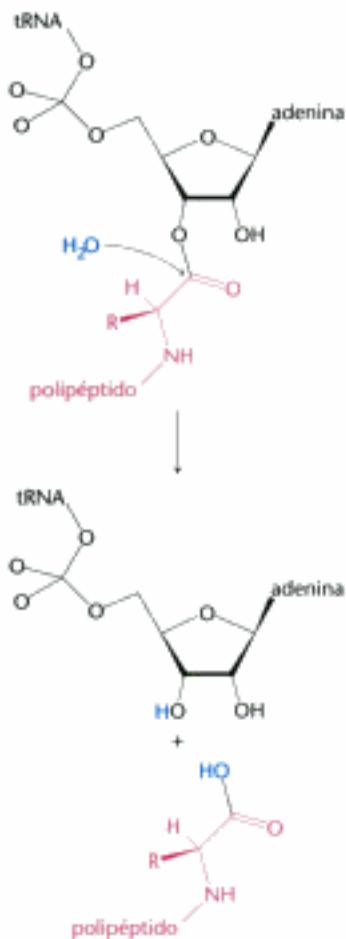


Figura 30.24 Mecanismo de la translocación. En la forma GTP, EF-G se une al lugar de unión de EF-Tu en la subunidad 50S. Esto estimula la hidrólisis del GTP, induciendo un cambio de conformación en EF-G, lo que fuerza a que los tRNAs y el mRNA se desplacen dentro del ribosoma la distancia correspondiente a un codón.



La síntesis de la proteína se termina por medio de factores de liberación que leen los codones stop

La fase final de la traducción es la terminación. ¿Cómo termina la síntesis de una cadena polipeptídica cuando aparece un codón stop? Normalmente los aminoacil-tRNAs no se unen al lugar A del ribosoma si el codón allí situado es UAA, UGA, ó UAG, ya que las células normales, no contienen tRNAs con anticodones complementarios a estas señales de parada. Sin embargo, *factores de liberación* (*RFs*, "release factors"), que son proteínas, reconocen a estos codones de parada y promueven la liberación de la proteína terminada del último tRNA. Uno de estos factores, RF1, reconoce a UAA ó UAG. Un segundo factor, RF2, reconoce a UAA ó UGA. Un tercer factor, RF3, media en las interacciones entre RF1 ó RF2 y el ribosoma. RF3 es otra proteína G homóloga de EF-Tu.

RF1 y RF2 son proteínas compactas que en los eucariotas recuerdan a una molécula de tRNA. Cuando están unidas al ribosoma, las proteínas se despliegan puentando el boquete entre el codón stop del mRNA y el centro peptidiltransferasa de la subunidad 50S. Aunque el mecanismo preciso de la liberación aun no se conoce, el factor de liberación puede promover, ayudando por la peptidiltransferasa, el ataque de una molécula de agua sobre la unión éster, liberando la cadena polipeptídica. El polipéptido liberado abandona al ribosoma. Los RNA de transferencia y mensajero permanecen unidos al ribosoma 70S hasta que el complejo entero se disocia de una manera dependiente de GTP, en respuesta a la unión de EF-G y otro factor, llamado *factor de liberación del ribosoma* (RRF) (Figura 30.25).

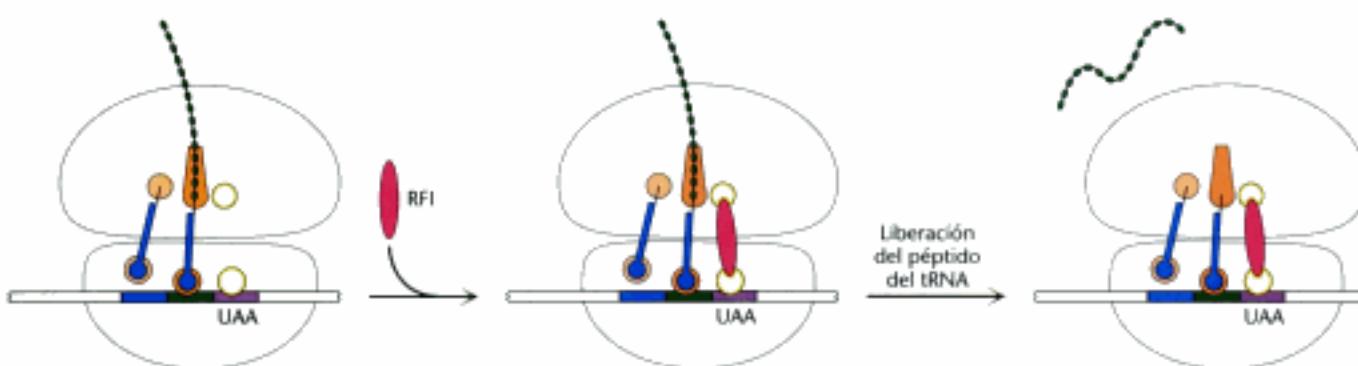


Figura 30.25 Terminación de la síntesis proteica. Un factor de liberación reconoce a un codón stop en el lugar A y estimula la liberación de la proteína terminada del tRNA que ocupaba el lugar P.

30.5 La síntesis de proteínas euacarióticas difiere de la síntesis de proteínas procarióticas principalmente en la iniciación de la traducción

El plan básico para la síntesis de proteínas en eucariotas y arqueas es similar al de las bacterias. La mayor parte de los temas estructurales y mecanísticos se repiten en todos los dominios de la vida. Sin embargo la síntesis de proteínas en eucariotas lleva más componentes proteicos que la síntesis de proteínas en procariotas, y algunos pasos son más complicados. Algunas de las semejanzas y diferencias más significativas son las que siguen:

1. Ribosomas. Los ribosomas eucarióticos son mayores. Constan de una subunidad grande de 60S y otra pequeña de 40S que se unen para formar una partícula de 80S, con una masa de 4200 kd, a diferencia de los 2700 kd del ribosoma procariótico de 70S. La subunidad 40S contiene un RNA de 18S homólogo del RNA procariótico de 16S. La subunidad 60S contiene tres RNAs; los RNAs de 5S y 28S son los equivalentes a las moléculas procarióticas de 5S y 23S; y el RNA de 5,8S que es homólogo del extremo 5' del RNA 23S de los procariotas.

2. tRNA iniciador. En los eucariotas, el aminoácido de iniciación es la metionina en vez de la N-formilmetionina. Sin embargo, como en los procariotas, en la iniciación participa un tRNA especial. Este aminoacil-tRNA se denomina Met-tRNA_i o Met-tRNA_f (el subíndice *i* deriva de iniciación y el subíndice *f* indica que puede formarse *in vitro*).

3. Iniciación. El codón de iniciación en eucariotas es siempre AUG. Los eucariotas, a diferencia de los procariotas, no utilizan una secuencia rica en purinas, situada hacia el extremo 5', para distinguir los AUGs de iniciación de los AUGs internos, sino que normalmente se selecciona como punto de partida el AUG más próximo al extremo 5' del mRNA. Los ribosomas 40S se unen al casquete o cofia del extremo 5' de los mRNAs eucarióticos (p. 846) y buscan el codón AUG moviéndose base-a-base hacia el extremo 3' (Figura 30.26). En la síntesis de proteínas en eucariotas, este proceso de búsqueda está dirigido por helicasas que se desplazan a lo largo del mRNA, consumiendo ATP. El apareamiento del anticodón de Met-tRNA_i con el codón AUG del mRNA constituye la señal que indica que el objetivo se ha cumplido. En la mayoría de los casos, un mRNA eucariótico sólo tiene un lugar de iniciación y es, por tanto, el molde para una única proteína. Por el contrario, los mRNAs procarióticos tienen múltiples secuencias Shine-Dalgarno y, por tanto, varios lugares de iniciación por lo que pueden actuar como molde para la síntesis de varias proteínas.

Los eucariotas poseen muchos más factores de iniciación que los procariotas y sus interrelaciones son más complicadas. El prefijo *eIF* significa factor de iniciación eucariótico. Así, por ejemplo, *eIF-4E* es una proteína que se une directamente a la cofia 7-metilguanosina (p. 846) mientras que el *eIF-2*, asociado al GTP, deja el Met-tRNA_i sobre el ribosoma. La diferencia en el mecanismo de iniciación entre procariotas y eucariotas es, en parte, una consecuencia de la diferencia en la maduración del RNA. En los procariotas, el extremo 5' del mRNA se une fácilmente al ribosoma, inmediatamente después de la transcripción. Por contraste en los eucariotas, el pre-mRNA debe ser procesado y transportado al citoplasma antes del inicio de la traducción. La cofia en 5' proporciona un punto de iniciación fácilmente reconocible. Además, la complejidad de la iniciación de la traducción eucariótica provee otro mecanismo para la expresión genética que estudiaremos más adelante, en el capítulo 31.

4. La estructura del mRNA. El mRNA eucariótico es circular. La proteína *eIF-4E* que se une a la estructura de cofia del mRNA también se une a la cola de poli(A) a través de dos proteínas intermedias. La proteína se une primero a la proteína

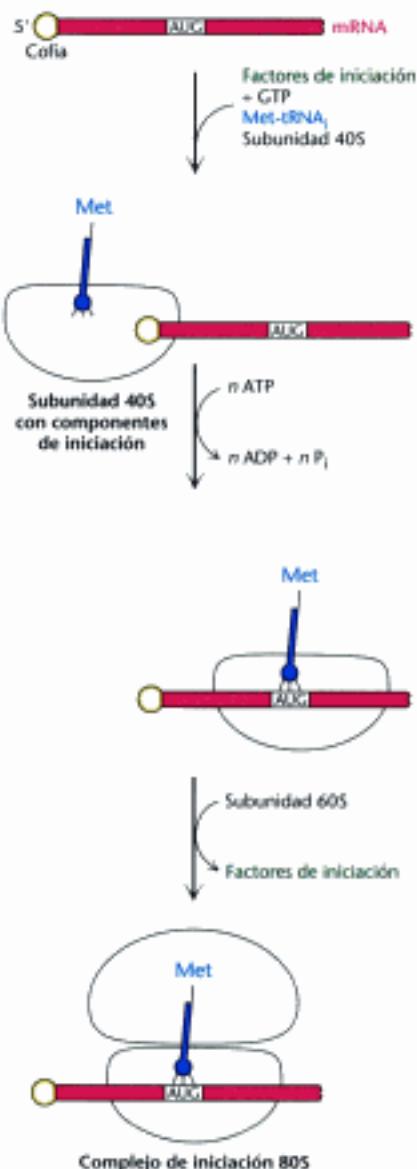


Figura 30.26 Iniciación de la traducción en eucariotas. En los eucariotas, la iniciación de la traducción comienza con el ensamblaje sobre la cofia en 5' de un complejo que incluye la subunidad 40S y el Met-tRNA_i. Dirigido por la hidrólisis de ATP este complejo recorre el mRNA hasta que alcanza el primer AUG. Entonces se une la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S.

Hidden page

dirige al lado citoplasmático del retículo endoplásmico. Cuando el ribosoma toma contacto con la membrana, la síntesis proteica comienza de nuevo. A medida que la cadena peptídica que se está formando sale del ribosoma, ésta se transporta, mientras se va traduciendo, a través de la membrana hacia el lumen del retículo endoplásmico.

Los ribosomas libres que sintetizan proteínas para el uso en la célula son idénticos a los que están unidos al ER. ¿Cuál es el proceso que dirige al ribosoma que sintetiza una proteína destinada a entrar en el ER para que se una al ER? La translocación consta de cuatro componentes.

	Síntesis de ruptura
Hormona de crecimiento humana	MATGSR <u>T</u> SLLLA <u>F</u> GLLCLPWLQEGSA FPT
Proinsulina humana	MALWMR <u>L</u> LLPL <u>L</u> AL LALW <u>G</u> PDPAAA FVN
Proalbúmina bovina	M <u>K</u> WVTF I <u>S</u> LLLFSSAYS RGV
Cadena H de anticuerpo de ratón	M <u>K</u> V <u>L</u> SLLYLLTA <u>I</u> PHIMS DVQ
Usozima de pollo	M <u>R</u> SLLI <u>L</u> VLCFLPKLAA <u>L</u> G KVF
Promelitina de abeja	M <u>K</u> F <u>L</u> VNVALVFMVVYISYIYA APE
Proteína adhesiva de <i>Drosophila</i>	M <u>K</u> L <u>V</u> VAVIA <u>C</u> MLI <u>G</u> FADPASG CKD
Proteína 19 del maíz	MA <u>A</u> K <u>I</u> F <u>C</u> LIM <u>L</u> GL SASAATA SIF
Invertasa de levadura	M <u>L</u> LOA <u>F</u> L <u>L</u> AGFA <u>A</u> KISA SMT
Virus A de la gripe humana	M <u>K</u> A <u>K</u> L <u>V</u> L <u>L</u> YAFVAG DQI

Figura 30.29 Secuencias señal amino terminales de algunas proteínas de secreción y de membrana plasmática de eucariotas. El núcleo hidrofóbico (en amarillo) está precedido por unos residuos básicos (en azul) y seguido por un lugar de ruptura (en rojo) para la peptidasa señal.

1. *La secuencia señal.* La secuencia señal está formada por una secuencia de 9 a 12 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, que a veces contienen aminoácidos cargados positivamente (fig. 30.29). Esta secuencia normalmente está cerca del extremo amino terminal de la cadena polipeptídica naciente. La presencia de esta secuencia identifica al péptido naciente como uno de los que deben atravesar la membrana del ER. Algunas secuencias señal permanecen en la proteína madura, mientras que otras son cortadas por la *peptidasa señal* del lado luminal de la membrana del ER (Figura 30.29).

2. *La partícula de reconocimiento de la señal (SRP).* Esta partícula reconoce a la secuencia señal y se une a ella y al ribosoma tan pronto como la secuencia señal sale de él. La SRP dirige entonces el ribosoma y la cadena polipeptídica naciente a la membrana del ER. La SRP es una ribonucleoproteína formada por un RNA de 7S y seis proteínas distintas (Figura 30.30). Una proteína, la SRP54, es una GTPasa crucial para la función de la SRP. La SRP se une a todos los ribosomas pero sólo lo hace con fuerza cuando el ribosoma muestra la secuencia señal. La SRP va probando los ribosomas hasta localizar a uno que exhibe la secuencia señal. Después de que la SRP se une a ella, la interacción entre el ribosoma y la SRP cierra el lugar de unión del factor de elongación de modo que se detiene la síntesis de la proteína.

3. *El receptor de SRP (SR).* El complejo SRP-ribosoma difunde hacia el retículo endoplásmico, donde la SRP se une a su receptor, una proteína intrínseca de membrana formada por dos subunidades SR α y SR β . El SR α es, al igual que la SRP54, una GTPasa.

4. *El translocón.* El complejo SRP-SR fija el ribosoma a la membrana del ER. Allí tropieza con la maquinaria de translocación, llamada translocón, una asociación de múltiples subunidades formada por proteínas intrínsecas y periféricas de membrana. El translocón es un conducto por el cual pueden pasar proteínas. Este conducto se abre cuando el translocón y el ribosoma se unen el uno al otro. Se reanuda la síntesis proteica con la cadena polipeptídica pasando, a través de conducto del translocón, hacia dentro del lumen del ER.

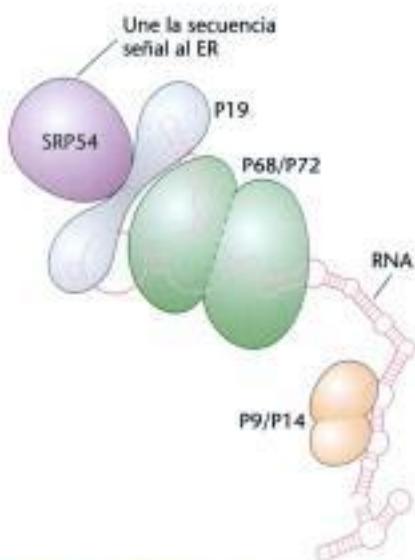


Figura 30.30 Partícula de reconocimiento de la señal. Esta partícula (SRP) consta de seis proteínas (una de las cuales es SRP54) y una molécula de RNA de 300 nucleótidos. El RNA tiene una estructura compleja con muchas regiones de doble helicoidal separadas por regiones de una hebra, mostradas como círculos. [Tomado de H. Lodish y col. Molecular Cell Biology, 5^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2004). Ver K. Strub y col. Mol. Cell Biol. 11 (1991): 3949-3959 y S. High y B. Dobberstein, J. Cell Biol. 113 (1991): 229-233.]

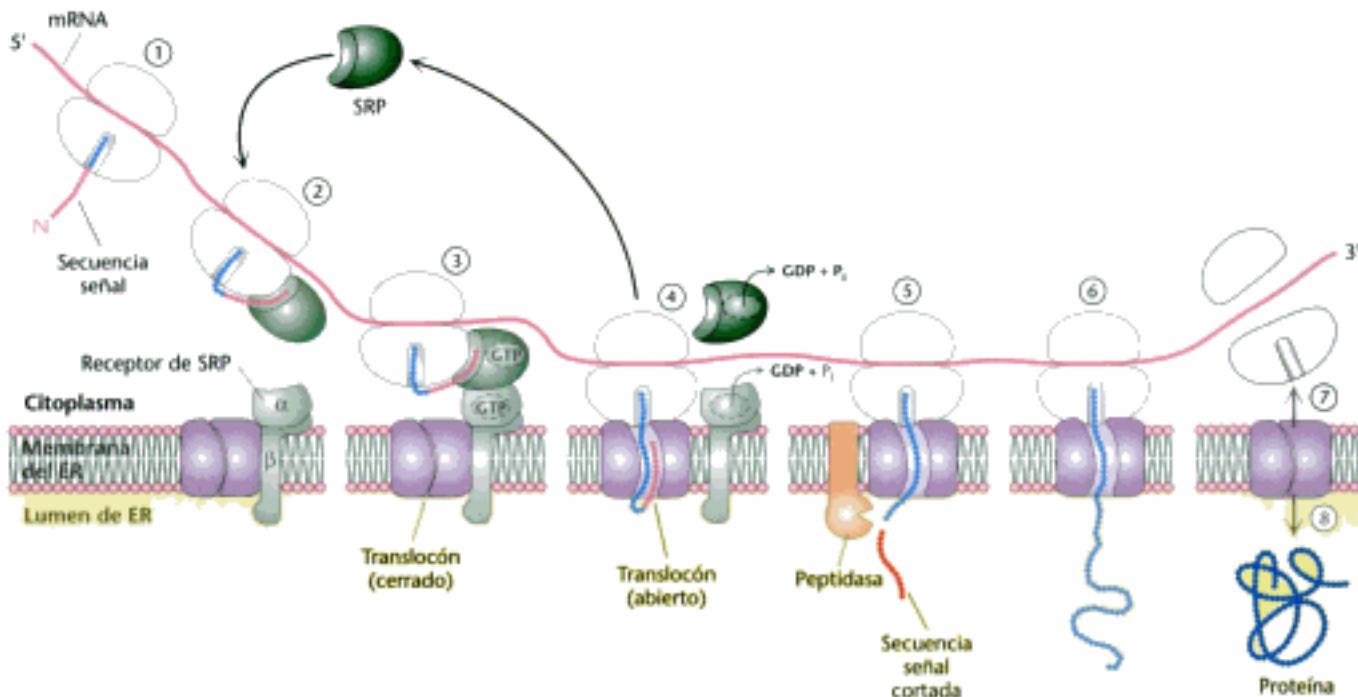


Figura 30.31 Ciclo operacional de la SRP. (1) La síntesis proteica empieza en los ribosomas libres. (2) Después que la secuencia señal sale del ribosoma, se une a la SRP y la síntesis proteica se detiene. (3) El complejo SRP-ribosoma contacta con el receptor de SRP en la membrana del ER. (4) La SRP y el receptor de SRP hidrolizan simultáneamente sus GTPs unidos. Se reanuda la síntesis proteica y se libera la SRP para unirse a otra secuencia señal. (5) La peptidasa señal puede cortar la secuencia señal en cuando entra en el lumen del ER. (6) La síntesis proteica continúa quedando la proteína dentro del ER. (7) Al completarse la síntesis de la proteína, se libera el ribosoma y se cierra el túnel del translocón. [Tomado de H. Lodish y col. *Molecular Cell Biology*, 5^a ed. (W. H. Freeman and Company, 2004). Fig. 16.6.]

En la Figura 30.31 se representan las interacciones entre los componentes de la maquinaria de la translocación. Para formar el complejo SRP-SR, tanto las subunidades SRP54 como la SR α deben unirse al GTP. Para que ese complejo transfiera el ribosoma al translocón, las dos moléculas de GTP (una de la SRP y la otra del SR) están alineadas en lo que es esencialmente un centro activo constituido por las dos proteínas. Después de que el ribosoma ha sido colocado a lo largo del transposón, los GTPs se hidrolizan. SRP y SR se disocian y la SRP queda libre para buscar una nueva secuencia señal e iniciar un nuevo ciclo. Por tanto, la SRP actúa de forma catalítica. La peptidasa señal, que está asociada con el transposón en el lumen del ER, corta la secuencia señal de la mayoría de las proteínas.

Las vesículas de transporte conducen la carga de proteínas hacia su destino final

A medida que las proteínas son sintetizadas, se pliegan para adoptar su estructura tridimensional en el lumen del ER. Algunas proteínas sufren modificaciones al unirse a azúcares mediante N-enlaces. Por último, las proteínas deben ser seleccionadas y enviadas a sus destinos finales. Con independencia del destino, los principios del transporte son los mismos. El transporte resulta mediado por unas vesículas de transporte que emergen del ER (Figura 30.32). Las vesículas de transporte trasladan su carga (proteica) desde el ER hasta el complejo Golgi, donde las vesículas se funden y depositan su cargamento dentro del complejo. Allí, el cargamento proteico resulta modificado, por ejemplo, con la unión de carbohidratos (p. 317). Desde el Golgi las vesículas de transporte conducen el cargamento de proteínas hasta sus destinos finales, como se aprecia en la Figura 30.32.

¿Cómo alcanza una proteína su destino correcto? La proteína recién sintetizada quedará flotando dentro del lumen del ER hasta que se une a una proteína intrínseca de membrana llamada *receptor de carga*. Esta unión secuestra la proteína cargo en una pequeña región de la membrana que después puede formar una yema de membrana. La yema transportará la proteína a un destino específico: membrana plasmática, lisosoma o exterior celular. La clave para garantizar que la proteína alcanzará su destino adecuado es que la proteína debe unirse a un receptor en la región del ER asociada al destino de esa proteína. Para asegurar el emparejamiento adecuado de la proteína con la región del ER, los receptores de carga reconocen varias características de la proteína de carga, tales como una particular secuencia de aminoácidos o a un carbohidrato añadido.

La formación de abultamientos resulta facilitada por la unión de *proteínas de envoltura* (COP_i) ("coat proteins") en el lado citoplasmático del abultamiento. Las proteínas de envoltura se asocian una con otra para liberar la vesícula. Después de que se ha formado y liberado la vesícula de transporte, las proteínas de envoltura se separan para revelar otra proteína intrínseca llamada v-SNARE ("v" de vesícula). La v-SNARE se unirá a una t-SNARE ("t" de "target": objetivo, destino) particular en la membrana de destino. Esta unión conduce a la fusión de la vesícula de transporte con la membrana de destino y la carga se libera. Así pues, la asignación de proteínas v-SNARE idénticas a la misma región de la membrana del ER origina que una región del ER queda asociada a un destino particular.

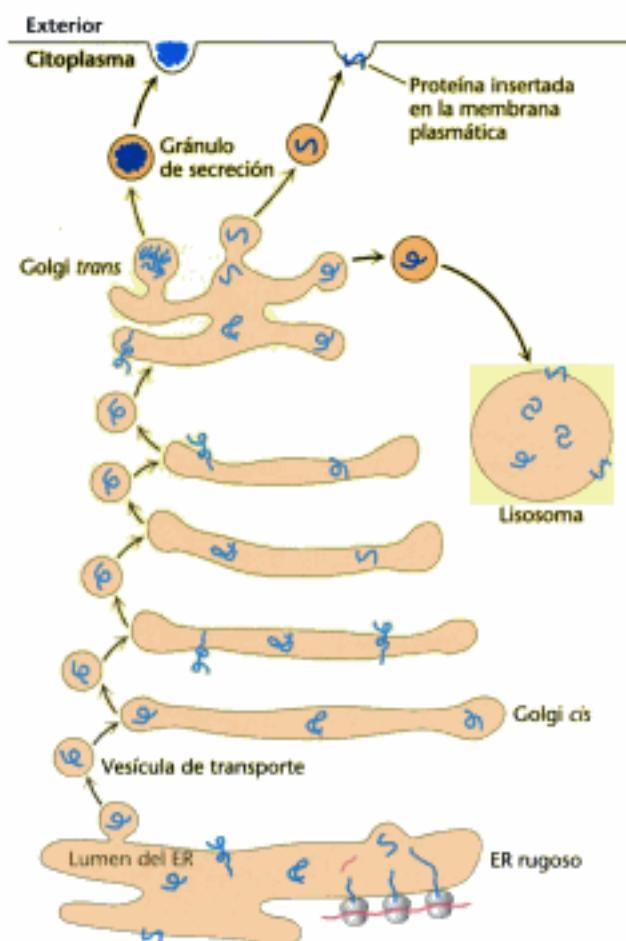


Figura 30.32 Vías de envío de proteínas. Las proteínas recién sintetizadas en el lumen del ER son recogidas en los abultamientos de membrana. Estas yemas se desprenden y forman vesículas de transporte. Las vesículas de transporte conducen las proteínas de carga al complejo de Golgi, donde se modifican. Las vesículas de transporte llevan entonces la carga hacia su destino final dirigidas por las proteínas v-SNARE y t-SNARE.

TABLA 30.4 Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas

Antibiótico	Acción
Estreptomicina y otros aminoglicósidos	Inhibe la iniciación y origina una lectura errónea del mRNA (en procariotas)
Tetraciclina	Se une a la subunidad 30S e inhibe la unión de los aminoacil-tRNAs (en procariotas)
Cloranfenicol	Inhibe la actividad peptidiltransferasa de la subunidad ribosómica 50S (en procariotas)
Cicloheximida	Inhibe la translocación (en eucariotas)
Eritromicina	Se une a la subunidad 50S e inhibe la translocación (en procariotas)
Puromicina	Provoca la terminación prematura de la cadena por actuar como un análogo del aminoacil-tRNA (en procariotas y eucariotas)

30.7 Muchos antibióticos y toxinas pueden inhibir la síntesis de las proteínas

Las diferencias entre los ribosomas procarióticos y eucarióticos pueden explotarse para el desarrollo de antibióticos (Tabla 30.4). Por ejemplo, el antibiótico *puromicina* inhibe la síntesis de proteínas liberando las cadenas polipeptídicas nacientes antes de completar su síntesis. La puromicina es un análogo de la porción terminal aminoaciladenosina del aminoacil-tRNA (Figura 30.33). Este antibiótico se acopla al lugar A del ribosoma e inhibe la entrada del aminoacil-tRNA. Además, la puromicina contiene un grupo α-amino. Este grupo amino, como el aminoacil-tRNA, forma un enlace peptídico con el grupo carboxilo de la cadena peptídica creciente. El producto, un péptido que tiene una puromicina unida covalentemente a su extremo carboxilo, se disocia del ribosoma.

La estreptomicina, un trisacárido fuertemente básico, interfiere con la unión de formilmetionil-tRNA a los ribosomas y, por tanto, impide la iniciación correcta de la síntesis de las proteínas. Otros *antibióticos aminoglicosídicos* como la neomicina, kanamicina, y gentamicina interfieren con el *lugar de descodificación* situado cerca del nucleótido 1492 del RNA 16S de la subunidad 30S (p. 875). El *cloranfenicol* actúa por inhibición de la actividad peptidiltransferasa. La eritromicina se une a la subunidad 50S y bloquea la translocación. Finalmente, la *cicloheximida* bloquea la translocación en los ribosomas eucarióticos, siendo así una herramienta de trabajo muy útil en el laboratorio para bloquear la síntesis de proteínas en células eucarióticas.

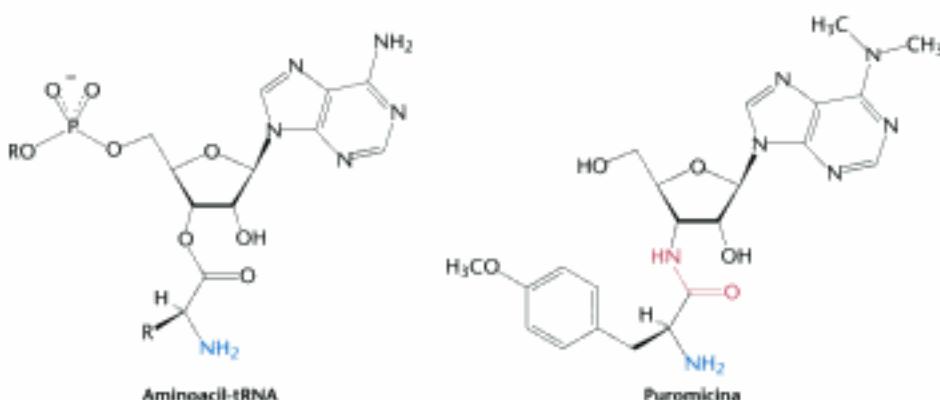
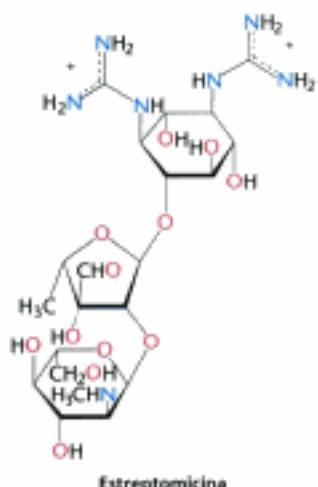


Figura 30.33 Acción antibiótica de la puromicina. La puromicina se parece al terminal de un aminoacil-tRNA. Su grupo amino se une al grupo carbonilo de la cadena polipeptídica en crecimiento para formar un aducto que se disocia del ribosoma. Este aducto es estable debido a que la puromicina tiene una unión amida (en rojo) en vez de la unión éster.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Términos clave

- | | | |
|--------------------------------------|---|--|
| traducción (p. 857) | secuencia Shine-Dalgarno (p. 870) | peptidasa señal (p. 881) |
| ribosoma (p. 857) | centro de la peptidiltransferasa (p. 872) | partícula de reconocimiento de la señal (SRP) (p. 881) |
| RNA de transferencia (tRNA) (p. 859) | hipótesis del balanceo (p. 874) | translocón (p. 881) |
| codón (p. 859) | factor de iniciación (p. 876) | vesícula de transporte (p. 882) |
| anticodón (p. 859) | factor de elongación Tu (EF-Tu) (p. 876) | proteínas de envoltura (p. 883) |
| aminoacil-tRNA sintetasa (p. 862) | factor de elongación Ts (EF-Ts) (p. 876) | v-SNARE (p. 883) |
| subunidad 50S (p. 866) | factor de elongación G (EF-G) (p. 877) | t-SNARE (p. 883) |
| subunidad 30S (p. 866) | Factores de liberación (p. 880) | |
| polisoma (p. 870) | Secuencia señal (p. 880) | |

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Noller, H. F. 2005. RNA structure: Reading the ribosome. *Science* 309: 1508–1514.
- Dahlberg, A. E., 2001. Ribosome structure: The ribosome in action. *Science* 292: 868–869.
- Ibba, M., Cusrow, A. W. y Söll, D., 1997. Aminoacyl-tRNA synthesis: Divergent routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.* 22: 39–42.
- Davis, B. K., 1999. Evolution of the genetic code. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 157–243.
- Schimmel, P. y Ribas de Pouplana, L., 2000. Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* 25: 207–209.

Libros

- Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 2001. Volume 66. *The Ribosome*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gesteland, R. F., Cech, T. y Atkins, J. F. (Eds.), 1999. *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Garrett, R., Douthwaite, S. R., Liljas, A., Matheson, A. T., Moore, P. B. y Noller, H. F., 2000. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Inventions*. The American Society for Microbiology.

Aminoacil-tRNA sintetasas

- Ibba, M. y Söll, D., 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 617–650.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Rees, B., Bovee, M., Caillet, J., Romby, P., Francklyn, C. S. y Moras, D., 2000. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* 7: 461–465.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B. y Moras, D., 1999. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* 97: 371–381.
- Dock-Bregeon, A., Sankaranarayanan, R., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Francklyn, C. S., Ehresmann, C. y Moras, D., 2000. Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase: The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* 103: 877–884.
- Serre, L., Verdon, G., Choinowski, T., Hervouet, N., Risler, J. L. y Zelwer, C., 2001. How methionyl-tRNA synthetase creates its amino acid recognition pocket upon L-methionine binding. *J. Mol. Biol.* 306: 863–876.
- Beuning, P. J. y Musier-Forsyth, K., 2000. Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8916–8920.
- Bovee, M. L., Yan, W., Sproat, B. S. y Francklyn, C. S., 1999. tRNA discrimination at the binding step by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 38: 13725–13735.
- Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Tao, J., Vassylyev, D. G. y Yokoyama, S., 2000. Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase. *Cell* 103: 793–803.
- de Pouplana, L. R. y Schimmel, P., 2000. A view into the origin of life: Aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 865–870.

RNA de transferencia

- Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., Tumbula, D. L. y Söll, D., 2000. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* 25: 311–316.
- Weisblum, B., 1999. Back to Camelot: Defining the specific role of tRNA in protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 24: 247–250.

Ribosomas y RNA ribosómico

- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., VillaSanjurjo, A., Holton, J. M. y Doudna, Cate, J. H., 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310: 827–834.
- Moore, P. B., 2001. The ribosome at atomic resolution. *Biochemistry* 40: 3243–3250.
- Yonath, A. y Franceschi, F., 1998. Functional universality and evolutionary diversity: Insights from the structure of the ribosome. *Structure* 6: 679–684.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Ernest, T. N., Cate, J. H. y Noller, H. F., 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883–896.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. y Steitz, T. A., 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920.
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. y Ramakrishnan, V., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340–348.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., Hartsch, T. y Ramakrishnan, V., 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327–339.
- Agalarov, S. C., Sridhar Prasad, G., Funke, P. M., Stout, C. D. y Williamson, J. R., 2000. Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: Assembly of the 30S ribosome central domain. *Science* 288: 107–113.
- Frank, J., 2000. The ribosome: A macromolecular machine par excellence. *Chem. Biol.* 7: R133–R141.

Hidden page

Hidden page

Problemas de mecanismo

15. *Ataque molecular.* ¿Cuál es el grupo nucleofílico en la reacción catalizada por la peptidiltransferasa? Escribir un posible mecanismo para esta reacción.

16. *Eleción evolutiva de aminoácidos.* La ornitina es estructuralmente semejante a la lisina excepto en que la cadena lateral de la ornitina tiene metileno menos que la de la lisina. Los intentos para sintetizar y aislar ornitil-tRNA no han tenido éxito. Proponer una explicación mecanicista. (Sugerencia: los anillos de seis miembros son más estables que los anillos de siete miembros).

Problemas de integración del capítulo

17. *Ya visto.* ¿Qué proteína en las cascadas de proteínas G juega un papel similar al de factor de elongación Ts?

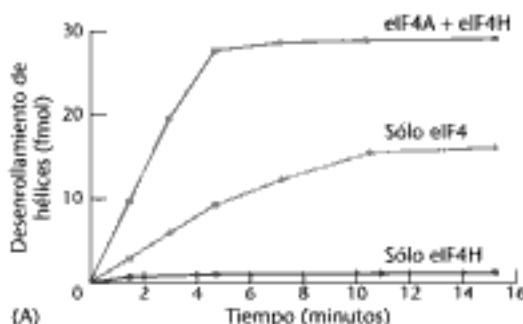
18. *Parecido familiar.* El factor de elongación eucariótico 2 es inhibido por ADP-ribosilación catalizada por la toxina de la difteria. ¿Qué otras proteínas G son sensibles a este modo de inhibición?

Problema de interpretación de datos

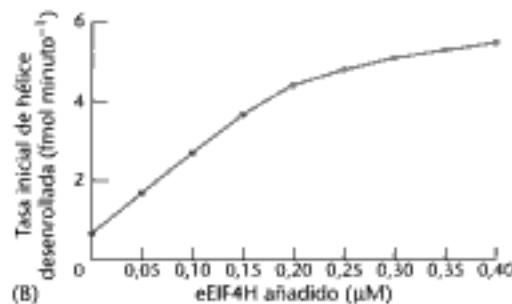
19. *Auxiliar de la helicasa.* El factor de iniciación eIF-4 presenta actividad helicasa de RNA, dependiente de ATP. Otro factor de iniciación, eIF-4H, ha sido propuesto como auxiliar de la acción del eIF-4. El gráfico A presenta algunos resultados experimentales de un ensayo que permite medir la actividad helicasa de eIF-4 en presencia de eIF-4H.

(a) ¿Cuáles son los efectos sobre la actividad helicasa de eIF-4 por la presencia de eIF-4H?

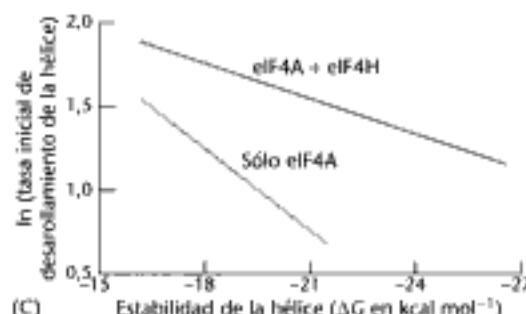
(b) ¿Por qué la medida de la actividad helicasa de eIF-4H por sí sola sirve como un control importante?



(c) La tasa inicial de la actividad helicasa de eIF-4 0,2 μ M fue medida a continuación variando las cantidades de eIF-4H (gráfico B). ¿Qué relación de eIF-4H respecto a eIF-4 produce la actividad óptima?



(d) A continuación, se ensayó el efecto de la estabilidad de la hélice RNA-RNA en la tasa inicial de desenrollamiento, en presencia y en ausencia de eIF-4H (gráfico C). ¿Cómo varía el efecto eIF-4H con la estabilidad de la hélice?



(e) ¿Cómo puede el eIF-4H afectar a la actividad helicasa de eIF-4A? [Datos de N. J. Richter, G. W. Rodgers, Jr., J. O. Hensold y W. C. Merrick, 1999. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J. Biol. Chem.* 274:35415-35424.]

Hidden page

Hidden page

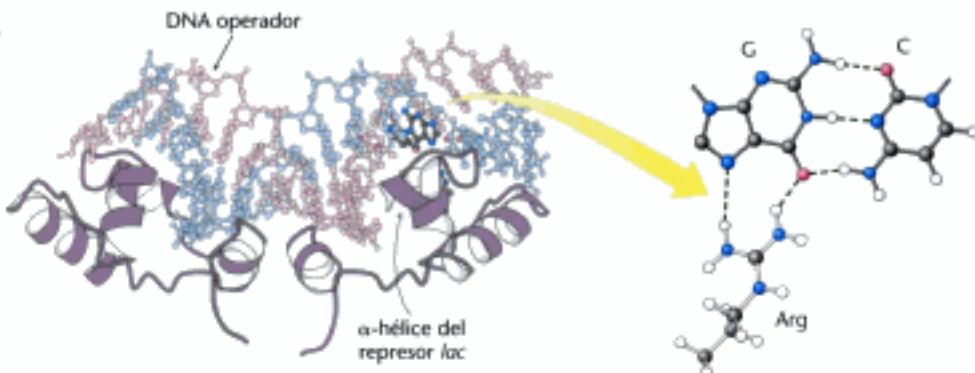


Figura 31.2 Complejo represor lac - DNA. El dominio de unión al DNA perteneciente a una proteína que regula los genes, el represor lac, se une a un fragmento del DNA que contiene su centro de unión preferente (y que recibe el nombre de DNA operador) insertando una α -hélice en el surco mayor del DNA operador. Observe que se establece un contacto específico entre un residuo de arginina del represor y un par de bases G-C del lugar de unión. [Tomado de 1EFA.pdb.]

La estructura del complejo formado por un oligonucleótido que contiene esta secuencia y la región de una proteína de unión al DNA que la reconoce pone de manifiesto las interacciones que dan lugar a la unión específica al DNA (Figura 31.2). La región de unión al DNA pertenece a una proteína denominada *represor lac*, que reprime la expresión del gen que permite degradar la lactosa. Como era de esperar, esta proteína se une en forma de dímero y el eje de simetría binaria del dímero se ajusta a la simetría del DNA. Una α -hélice de cada monómero de la proteína se inserta en el surco mayor del DNA, donde las cadenas laterales de los aminoácidos establecen contactos específicos con los bordes expuestos de los pares de bases. Por ejemplo, la cadena lateral de un residuo de arginina forma un par de puentes de hidrógeno con un residuo de guanina, algo que sería imposible con cualquier otra base. Esta interacción y otras parecidas permiten que el represor lac se una a este sitio con más fuerza que a los otros muchos sitios que contiene el genoma de *E. coli*.

El motivo hélice-giro-hélice es frecuente en muchas proteínas procarióticas que se unen al DNA

¿Es posible que otras proteínas procarióticas de unión al DNA adopten estrategias parecidas? Hasta la fecha, se ha determinado la estructura de muchas proteínas de este tipo y se conocen las secuencias de aminoácidos de muchas más. Sorprendentemente, las superficies que se unen al DNA de muchas de estas proteínas (aunque no de todas) están formadas por un par de α -hélices separadas por un giro cerrado (Figura 31.3). Al formar complejos con el DNA, la segunda de estas dos hélices (denominada frecuentemente *hélice de reconocimiento*) se sitúa en el surco mayor, donde las cadenas laterales de los aminoácidos establecen contactos con los bordes de los pares de bases. Por el contrario, los residuos de la primera hélice participan funda-

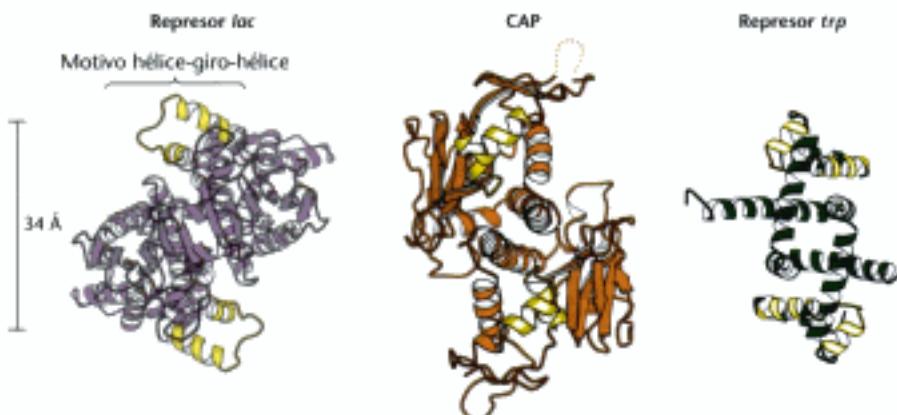


Figura 31.3 Motivo hélice-giro-hélice. Estas estructuras representan tres proteínas que se unen a secuencias específicas del DNA y que interactúan con el DNA mediante un motivo hélice-giro-hélice (representado en color amarillo). Observe que, en los tres casos, en cada dímero de proteína los motivos hélice-giro-hélice están separados unos 34 Å, lo que corresponde a una vuelta completa del DNA. [Tomado de 1EFA, 1RUN, y 1TRO.pdb.]

Hidden page

Hidden page

tos coloreados (Figura 31.8). Una célula de *E. coli* que esté creciendo utilizando como fuente de carbono la glucosa o el glicerol contiene menos de 10 moléculas de β -galactosidasa. Por el contrario, cuando la misma célula esté creciendo en presencia de lactosa contendrá varios miles de moléculas del enzima (Figura 31.9). La presencia de lactosa en el medio de cultivo provoca un gran aumento de la cantidad de β -galactosidasa, no porque active algún precursor inactivo preexistente sino porque induce la síntesis de nuevas moléculas de enzima.

Una pista crucial para comprender el mecanismo de regulación génica fue la observación de que junto con la β -galactosidasa se sintetizaban otras dos proteínas, la *galactósido permeasa* y la *tiogalactósido transacetilasa*. La permeasa es necesaria para transportar la lactosa a través de la membrana celular de la bacteria (p. 360). La transacetilasa no es esencial para el metabolismo de la lactosa, pero parece desempeñar un papel en la destoxicificación de otros compuestos que también pueden transportarse mediante la permeasa. Por tanto, los niveles de expresión de una serie de enzimas implicados en la adaptación a una determinada modificación del entorno cambian de manera conjunta. Esta unidad de expresión génica coordinada recibe el nombre de *operón*.

Un operón está formado por elementos de regulación y por genes que codifican proteínas

La regulación en paralelo de la β -galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa sugería que la expresión de los genes que codifican estos enzimas está controlada por un mecanismo común. François Jacob y Jacques Monod propusieron el *modelo del operón* para explicar tanto esta regulación en paralelo como los resultados de otros experimentos genéticos (Figura 31.10). Los elementos genéticos de este modelo son un *gen regulador*, una secuencia de DNA reguladora denominada *centro operador* y un *conjunto de genes estructurales*.

El gen regulador codifica una proteína *represora* que se une al centro operador. La unión del represor al centro operador impide la transcripción de los genes estructurales. El operador y sus genes estructurales asociados constituyen el operón. Para el *operón de la lactosa* (*lac*), el gen *i* codifica el represor, *o* es el centro operador y los genes *z*, *y* y *a* son los genes estructurales para la β -galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa, respectivamente. El operón también contiene un centro promotor (designado como *p*) que dirige a la RNA polimerasa al lugar correcto para el inicio de la transcripción. La transcripción de los genes *z*, *y* y *a* origina una única molécula de mRNA que codifica las tres proteínas. Una molécula de mRNA que codifica más de una proteína recibe el nombre de transcripto *poligénico* o *policistrónico*.

En ausencia de lactosa, la proteína represora *lac* se une al operador y bloquea la transcripción

¿Cómo inhibe el represor *lac* la expresión del operón *lac*? El represor *lac* puede presentarse en forma de un dímero de subunidades de 37 kd y, con frecuencia, dos dímeros se juntan para formar un tetramero. En ausencia de lactosa, el represor se une rápidamente y con mucha fuerza al centro operador. Cuando el represor *lac* está unido al DNA impide que la RNA polimerasa unida descarrolle el DNA para dejar expuestas las bases que puedan servir como molde para la síntesis de una hebra de RNA.

¿Cómo localiza el represor *lac* el centro operador en el cromosoma de *E. coli*? El represor *lac* se une al DNA del operador 4×10^6 veces más intensamente que a cualquier otro lugar del genoma seleccionado al azar. Este grado tan alto de selectividad

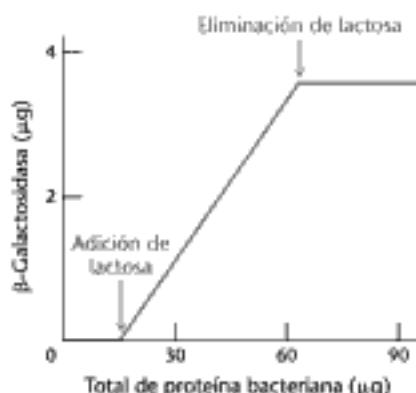


Figura 31.9 Inducción de la β -galactosidasa. La adición de lactosa a un cultivo de *E. coli* hace que la cantidad de β -galactosidasa producida pase de ser muy pequeña a ser mucho mayor. El aumento de la cantidad de enzima sigue un curso paralelo al incremento del número de células que están creciendo en el cultivo. La β -galactosidasa constituye el 6,6% del total de proteína que se sintetiza en presencia de lactosa.

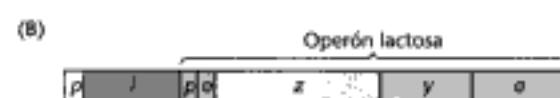
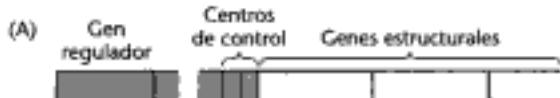


Figura 31.10 Operones. (A) Estructura general de un operón, tal y como lo imaginaron Jacob y Monod. (B) Estructura del operón de la lactosa. En el operón, además del promotor, *p*, existe un segundo promotor justo antes del gen regulador, *i*, que dirige la síntesis del regulador.

Hidden page

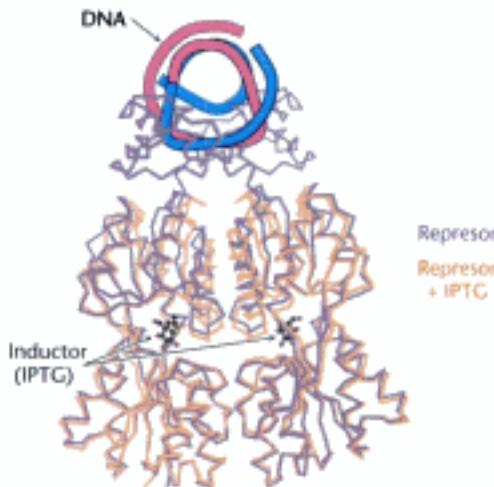


Figura 31.12 Efectos del IPTG sobre la estructura del represor lac. La estructura del represor lac unido al inductor isopropilitiogalactósido (IPTG), mostrada en color naranja, está superpuesta a la estructura del represor lac unido al DNA, mostrada en color púrpura. Observe que la unión del IPTG provoca cambios estructurales que alteran la relación entre los dos dominios de unión al DNA, de modo que ya no pueden interaccionar eficazmente con el DNA. Los dominios de unión al DNA del represor lac unido al IPTG no se muestran porque en los cristales analizados estas regiones no están muy bien ordenadas.

bios conformacionales que alteran la relación entre los dos dominios pequeños de unión al DNA (Figura 31.12). Para estos dominios ya no resulta fácil establecer contactos con el DNA de forma simultánea, lo que provoca una drástica reducción en la afinidad de la unión al DNA.

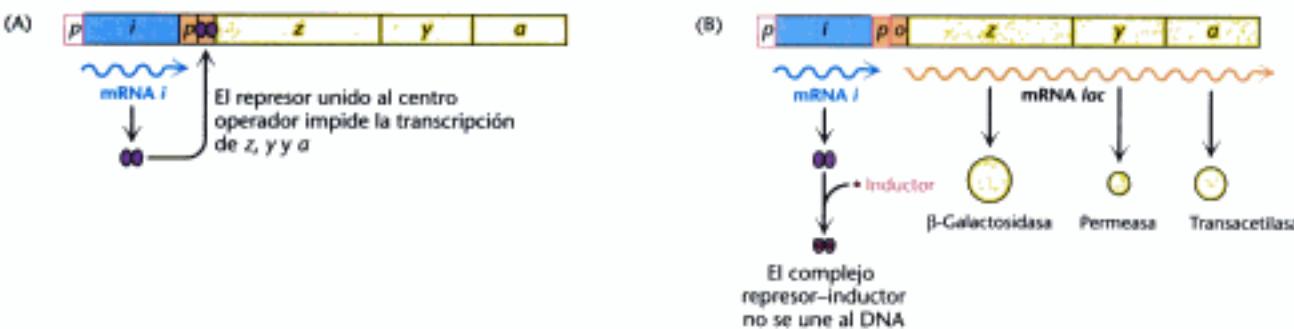
Recapitulemos sobre los procesos que regulan la expresión génica en el operón de la lactosa (Figura 31.13). En ausencia del inductor, el represor lac se encuentra unido al DNA de forma que impide la transcripción de los genes *z*, *y* y *a* por parte de la RNA polimerasa. Por tanto, se produce una cantidad muy pequeña de β -galactosidasa, permeasa o transacetilasa. La adición de lactosa al medio da lugar a la formación de alolactosa. Este inductor se une al represor lac provocando cambios conformacionales que disocian al represor lac del DNA. Con el lugar operador desocupado, la RNA polimerasa puede entonces transcribir el resto de los genes lac y la bacteria producirá las proteínas necesarias para utilizar la lactosa de manera eficiente.

 La estructura del dominio grande del represor lac es parecida a la de una amplia clase de proteínas que se encuentran tanto en *E. coli* como en otras bacterias. Esta familia de proteínas homólogas se une por su parte central a ligandos tales como azúcares y aminoácidos. Sorprendentemente, los eucariotas utilizan dominios pertenecientes a esta familia en proteínas del gusto y en receptores de neurotransmisores, tal y como se verá con más detalle en el Capítulo 32.

En procariotas, el operón es una unidad de regulación habitual

Otras muchas redes de regulación génica funcionan de forma análoga a la del operón lac. Por ejemplo, los genes que intervienen en la biosíntesis de las purinas, y en menor medida, los que participan en la biosíntesis de las pirimidinas, están reprimidos por el represor pur. El 31% de la secuencia de esta proteína dimérica es idéntica a la del represor lac y tiene una estructura tridimensional parecida. Sin embargo,

Figura 31.13 Inducción del operón lac. (A) En ausencia de lactosa, el represor lac se une al DNA y reprime la transcripción del operón lac. (B) La alolactosa u otro inductor se une al represor lac provocando su disociación del DNA y la producción del mRNA de lac.



Hidden page

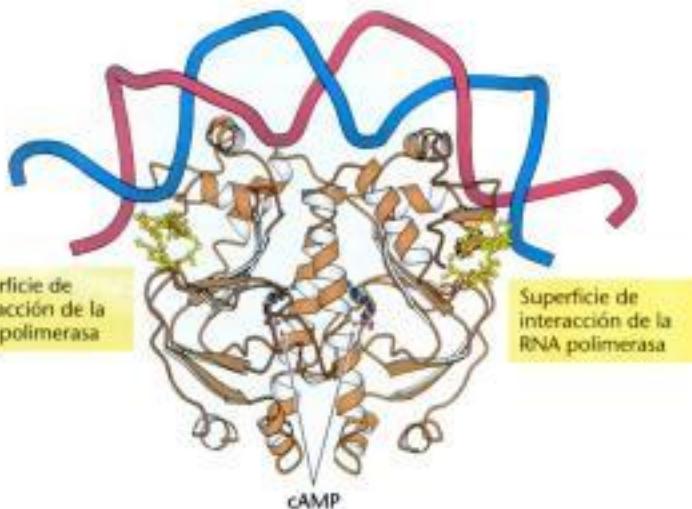


Figura 31.16 Estructura de un dímero de CAP unido al DNA. Los residuos de cada uno de los monómeros de CAP que se representan de color amarillo intervienen en las interacciones directas con la RNA polimerasa. [Tomado de 1RUN.pdb.]

un aumento en los niveles de cAMP en el interior de una bacteria *E. coli* da lugar a la formación de complejos CAP-cAMP que se unen a multitud de promotores y que estimulan la transcripción de genes que codifican diversos enzimas catabólicos.

31.3 La mayor complejidad de los genomas eucarióticos requiere mecanismos intrincados de regulación génica

Por varias razones, la regulación génica en eucariotas es significativamente más compleja que en procariotas. En primer lugar, el genoma que se tiene que regular es bastante más grande. El genoma de *E. coli* consta de un único cromosoma circular de 4,6 Mb. Este genoma codifica aproximadamente 2000 proteínas. A modo de comparación, *Saccharomyces cerevisiae* (la levadura de panadería), uno de los eucariotas más sencillos, contiene 16 cromosomas cuyo tamaño oscila entre 0,2 y 2,2 Mb (Figura 31.17). El genoma de levadura está formado por 12 Mb y codifica unas 6000 proteínas. El genoma de una célula humana contiene 23 pares de cromosomas cuyo tamaño varía entre 50 y 250 Mb. Existe aproximadamente 25 000 genes en las 3000 Mb del DNA humano. Para una proteína de unión al DNA resultaría muy difícil reconocer un único lugar en esta vasta colección de secuencias de DNA. Por tanto, para conseguir especificidad se requieren mecanismos más intrincados.

Otra fuente de complejidad en la regulación de los genes eucariotas es la diversidad de *tipos celulares* presente en la mayoría de los eucariotas. Las células del hígado y las células del páncreas, por ejemplo, difieren drásticamente en cuanto a los genes que más se expresan (ver la Tabla 31.1). Además, los genes eucarióticos no suelen estar organizados en operones. En vez de ello, con frecuencia, los genes que codifican proteínas para las distintas etapas de una vía determinada estén ampliamente desperdigados por el genoma. Por último, en eucariotas la transcripción y la traducción no están acopladas, lo que descarta algunos posibles mecanismos de regulación.

A pesar de estas diferencias, algunos aspectos de la regulación génica en eucariotas son bastante parecidos a los de procariotas. Concretamente, las proteínas activadoras y represoras que reconocen secuencias específicas del DNA son cruciales para multitud de procesos de regulación génica. Otros aspectos de la regulación génica en

Megabase (Mb)

Longitud de DNA correspondiente a 10^6 pares de bases (si es de doble hebra) o a 10^6 bases (si es de hebra sencilla).

$$1\text{ Mb} = 10^3 \text{ kb} = 10^6 \text{ bases}$$

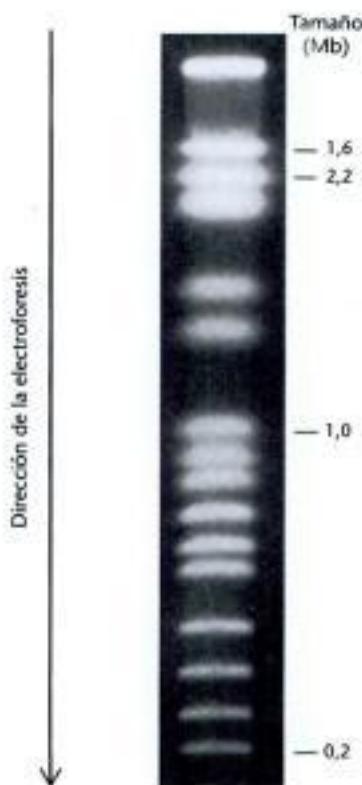


Figura 31.17 Cromosomas de levadura. La electroforesis de campo pulsado permite separar los 16 cromosomas de la levadura. [Tomado de G. Chu, D. Vollrath y R. W. Davis. Science 234 (1986):1582-1585.]

Hidden page

punte entre los factores de transcripción y la polimerasa. Un objetivo importante para los activadores es el *mediador*, un complejo formado por entre 25 y 30 subunidades que forma parte del complejo de preiniciación. El mediador actúa a modo de puente entre los activadores unidos al centro intensificador y la RNA polimerasa II unida al promotor (Figura 31.18).

Los dominios de activación están menos conservados que los dominios de unión al DNA. De hecho, se ha encontrado muy poca similitud entre sus secuencias. Por ejemplo, pueden ser ácidos, hidrofóbicos, ricos en glutamina o ricos en prolina. Sin embargo, existen ciertas características comunes a los dominios de activación. En primer lugar, son *redundantes*. Es decir, se puede eliminar una parte del dominio de activación sin que se pierda la función. En segundo lugar, como ya se ha indicado anteriormente, son *modulares* y pueden activar la transcripción cuando se encuentran asociados con diversos dominios de unión al DNA. En tercer lugar, los dominios de activación *actúan de forma sinérgica*: dos dominios de activación que actúan juntos ocasionan un efecto mucho más intenso que cuando cualquiera de ellos actúa por separado.

Hemos estado considerando el caso en el que el control de los genes requiere la expresión de un gen. En muchos casos, hay que detener la expresión de un gen para que cese la transcripción génica. En estos casos, los agentes son represores transcripcionales. A diferencia de los activadores, los represores se unen a proteínas que impiden la asociación de la RNA polimerasa II con el DNA.

Los nucleosomas son complejos de DNA e histonas

En eucariotas, el control de la transcripción de genes se complica por el hecho de que en los cromosomas eucarióticos el DNA no se encuentra desnudo. En vez de ello, el DNA eucariótico se encuentra íntimamente asociado a un grupo de pequeñas proteínas básicas denominadas *histonas*. De hecho, las histonas constituyen la mitad de la masa de un cromosoma eucariótico. La totalidad del complejo formado por el DNA de una célula y la proteína asociada recibe el nombre de *cromatina*. En la chromatina se encuentran cinco tipos principales de histonas: cuatro histonas que se asocian entre sí, denominadas H2A, H2B, H3 y H4, y otra histona que se denomina H1. Las histonas tienen un marcado carácter básico ya que una cuarta parte de los residuos de cada histona es arginina o lisina.

La chromatina se compone de unidades repetitivas formadas, cada una de ellas, por 200 pb de DNA y dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que constituyen el denominado *octámero de histonas*. Estas unidades repetitivas reciben el nombre de *nucleosomas*. Este modelo está sólidamente respaldado por los resultados de una serie de experimentos, entre los que se incluyen las observaciones realizadas con el microscopio electrónico de muestras de chromatina convenientemente tratadas (Figura 31.19). La chromatina, observada con un microscopio electrónico, tiene el aspecto de un collar de cuentas; cada una de ellas con un diámetro aproximado de 100 Å. La digestión parcial de la chromatina con DNase permite aislar las cuentas. Estas partículas están formadas por un fragmento de DNA de una longitud

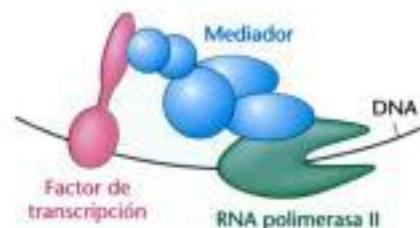


Figura 31.18 Mediador. El mediador, un complejo de gran tamaño formado por subunidades proteicas, actúa a modo de puente entre los factores de transcripción que albergan los dominios de activación y la RNA polimerasa II. Estas interacciones ayudan a que la RNA polimerasa II se incorpore y a que se establezca cerca de los genes específicos que, posteriormente, serán transcritos.

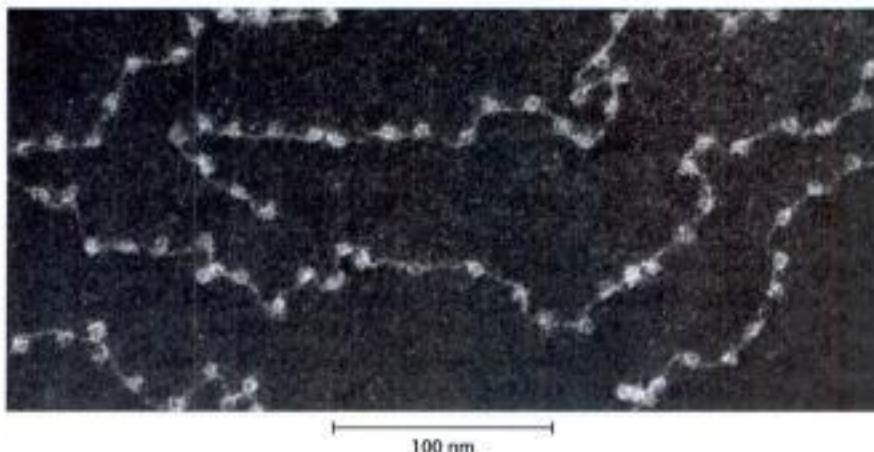


Figura 31.19 Estructura de la chromatina. Micrografía electrónica de la chromatina que muestra su aspecto de "collar de cuentas". [Cortesía de la Dra. Ada Ollins y del Dr. Donald Ollins.]

Hidden page

Hidden page

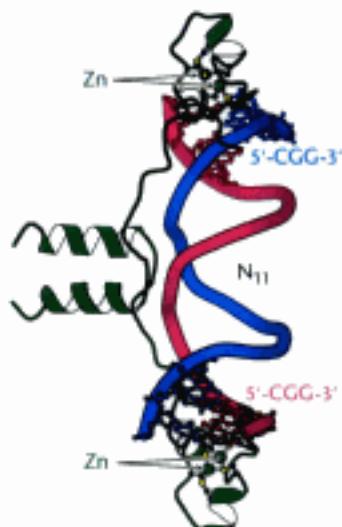


Figura 31.23 Centros de unión a GAL4. El factor de transcripción de levaduras GAL4 se une a secuencias del DNA del tipo 5'-CGG(N)₁₁CCG-3'. En las regiones de esta proteína que se unen al DNA existen dos dominios basados en el zinc. Obsérvese que estos dominios establecen contactos con las secuencias 5'-CGG-3', dejando libre la parte central de la secuencia. [Tomado de 1D66.pdb.]

En levaduras, los genes necesarios para utilizar la galactosa se activan por medio de una proteína de unión al DNA denominada GAL4, que reconoce centros de unión al DNA que presentan dos secuencias 5'-CGG-3' separadas por 11 pares de bases (Figura 31.23). En el genoma de levadura existen aproximadamente 4000 lugares del tipo 5'-CGG(N)₁₁CCG-3' a los que podría unirse GAL4, pero sólo 10 de ellos regulan los genes necesarios para el metabolismo de la galactosa. ¿A qué fracción de los posibles lugares de unión se une realmente GAL4? Para responder a esta pregunta se ha utilizado una técnica conocida como *inmunoprecipitación de la cromatina* (*ChIP*, "chromatin immunoprecipitation"). En primer lugar se entrecruza GAL4 con sus centros de unión al DNA de la cromatina. Posteriormente se fragmenta el DNA en trozos pequeños y se utilizan anticuerpos contra GAL4 para aislar aquellos fragmentos de la cromatina que contienen GAL4. Se revierte el entrecruzamiento y se procede a aislar y caracterizar el DNA. El resultado de estos estudios demuestra que únicamente 10 de los 4000 lugares posibles para GAL4 están ocupados por GAL4 cuando las células están creciendo en presencia de galactosa; más del 99% de los lugares parecen estar bloqueados. Por tanto, mientras que en procariotas todos los lugares parecen estar igual de accesibles, en las células eucarióticas la estructura de la cromatina encubre un gran número de posibles centros de unión. Así se evita que GAL4 se una a centros que carecen de importancia para el metabolismo de la galactosa.

Estas y otras evidencias ponen de manifiesto que la estructura de la cromatina de los genes activos está alterada, si la comparamos con la de los genes inactivos. ¿Cómo se modifica la estructura de la cromatina? Tal y como veremos más adelante (p. 910), las modificaciones covalentes específicas de las proteínas histonas son decisivas. Además, la unión de determinadas proteínas a los centros intensificadores situados en regiones específicas del genoma también desempeña un papel.

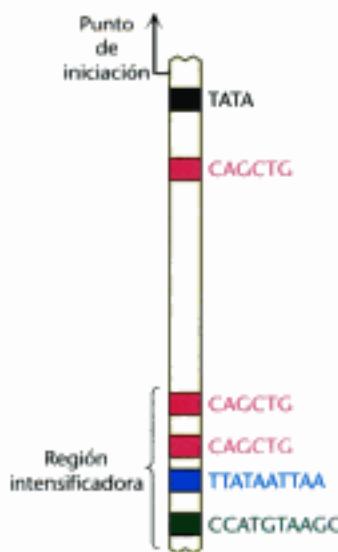


Figura 31.24 Centros de unión intensificadores. Representación esquemática de la región localizada 1 kb por delante (corriente arriba) del punto de iniciación del gen de la creatina quinasa de músculo. Hay un centro de unión del tipo 5'-CACCTG-3' cerca de la caja TATA. La región intensificadora situada aún más lejos, corriente arriba, presenta dos centros de unión para la misma proteína y otros dos centros de unión para otras proteínas.

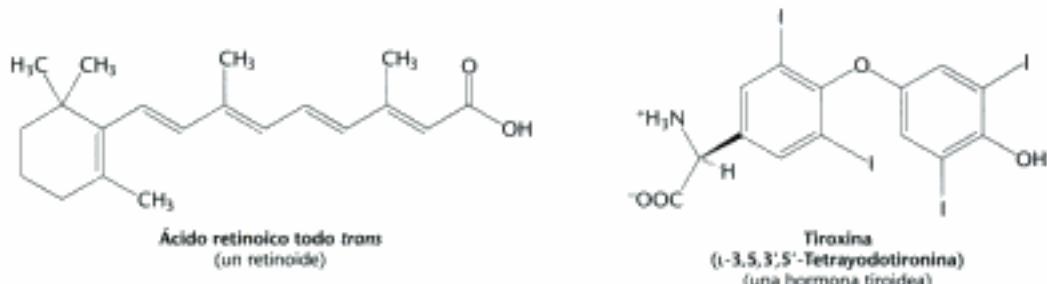
Los centros intensificadores pueden estimular la transcripción en determinados tipos celulares

Volvemos ahora a considerar la actividad de los intensificadores (p. 902). Recorremos que estas secuencias de DNA, aunque por sí mismas carecen de actividad promocional, aumentan notablemente la actividad de muchos promotores eucarióticos, incluso cuando los intensificadores se encuentran a una distancia de varios miles de pares de bases del gen que se está expresando.

La función de los intensificadores consiste en servir como centros de unión a determinadas proteínas reguladoras (Figura 31.24). Un intensificador sólo será eficaz en aquellos tipos celulares concretos en los que se expresen las proteínas reguladoras apropiadas. En muchos casos, estas proteínas de unión al DNA afectan a la iniciación de la transcripción perturbando la estructura local de la cromatina y exponiendo un gen o sus centros de regulación, sin tener que interaccionar directamente con la RNA polimerasa. Este mecanismo explica la capacidad de los intensificadores para actuar a distancia.

Hidden page

bros de una vasta familia de proteínas que actúan como receptores para una amplia gama de moléculas hidrofóbicas, entre las que se incluyen otras hormonas esteroideas, hormonas tiroideas y retinoides.



El genoma humano codifica unos 50 miembros de esta familia, a la que a menudo se denomina *receptores nucleares de hormonas*. Los genomas de otros eucariotas pluricelulares codifican un número similar de receptores nucleares de hormonas, aunque no están presentes en levaduras.

Todos estos receptores actúan de forma similar. Al unirse a la molécula señal (denominada genéricamente *ligando*), el complejo ligando-receptor modifica la expresión de genes específicos uniéndose a elementos de control del DNA. Los receptores de estrógenos se unen a lugares específicos del DNA (denominados *elementos de respuesta a estrógenos* o *EREs*) que contienen la secuencia consenso 5'-AGGT-CANNNTGACCT-3'. Como cabe esperar a partir de la simetría de esta secuencia, un receptor de estrógenos se une a estos lugares en forma de dímero.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta familia pone de manifiesto la existencia de dos dominios muy conservados: un dominio de unión al DNA y un dominio de unión al ligando (Figura 31.26). El dominio de unión al DNA se encuentra hacia la parte central de la molécula y está formado por un conjunto de dominios basados en el zinc distintos de los dominios dedo de zinc del tipo Cys₂-His₂ que hemos visto al comienzo del capítulo. Estos dominios basados en el zinc se unen a secuencias específicas del DNA gracias a una α -hélice que se aloja en el surco mayor cuando se forman los complejos específicos entre los receptores de estrógenos y el DNA.

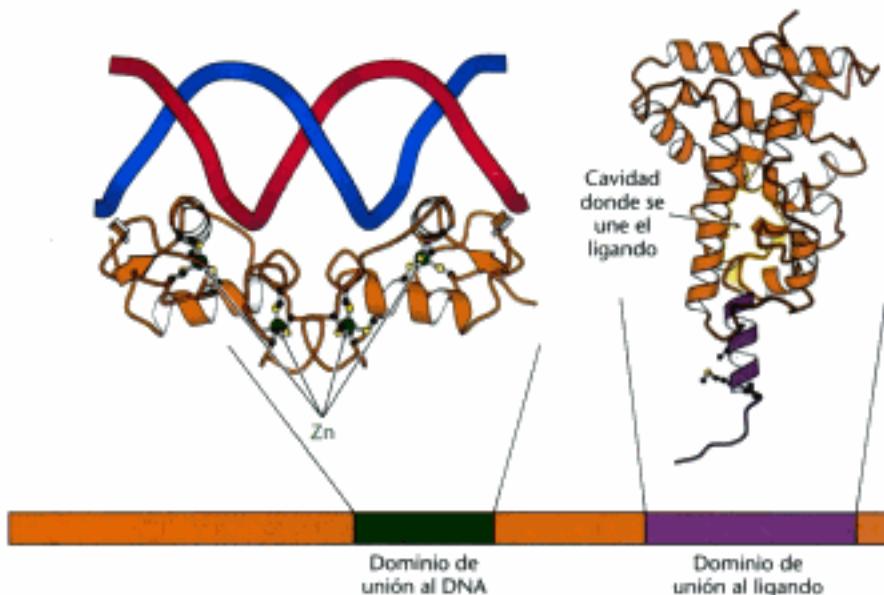
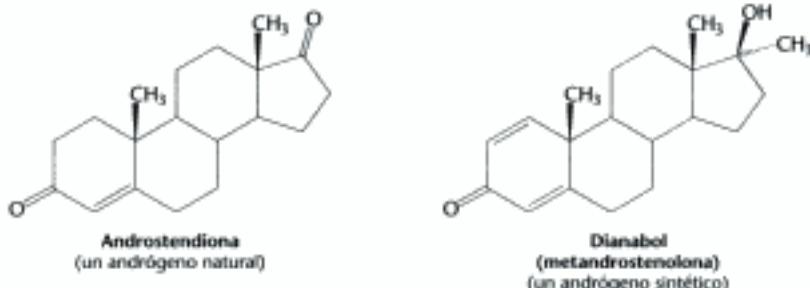


Figura 31.26 Estructura de dos dominios de receptores nucleares de hormonas. Los receptores nucleares de hormonas contienen dos dominios esenciales que están conservados: (1) un dominio de unión al DNA en la parte central de la secuencia y (2) un dominio de unión al ligando cerca del extremo carboxilo. Se muestra la estructura de un dímero del dominio de unión al DNA cuando está unido al DNA y la estructura de un monómero del dominio de unión al ligando, que normalmente se encuentra en forma dimérica. [Tomado de 1HCQ y 1LBD.pdb.]

Hidden page

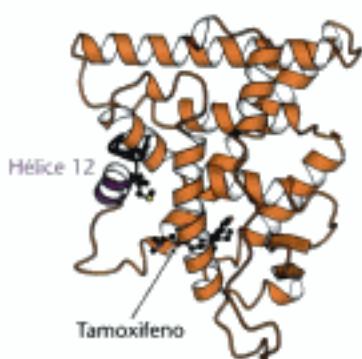
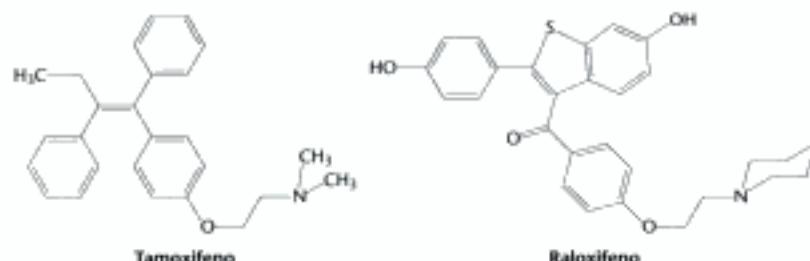
Ciertos fármacos actúan sobre los receptores de hormonas esteroideas

 Moléculas como el estradiol, que se unen a un receptor y ponen en marcha vías de señalización, reciben el nombre de *agonistas*. A veces, los atletas ingieren agonistas naturales o sintéticos para el receptor de andrógenos, un miembro de la familia de los receptores nucleares de hormonas, porque su unión al receptor de andrógenos estimula la expresión de genes que incrementan el desarrollo de masa muscular libre de grasa.



El uso excesivo de estos compuestos, denominados *esteroides anabólicos*, origina efectos secundarios. En hombres, su uso excesivo provoca una disminución de la secreción de testosterona, atrofia testicular y a veces, cuando parte del exceso de andrógenos se convierte en estrógenos, el crecimiento de las mamas (ginecomastia). En mujeres, el exceso de testosterona provoca una disminución de la ovulación y de la secreción de estrógenos; también provoca la regresión de las mamas y el crecimiento de pelo facial.

Otras moléculas se unen a los receptores nucleares de hormonas, pero sin activar ninguna vía de señalización. Estos compuestos se llaman *antagonistas* y son, desde muchos puntos de vista, parecidos a los inhibidores competitivos de los enzimas. Algunos fármacos importantes son antagonistas que actúan sobre el receptor de estrógenos. Por ejemplo, el *tamoxifeno* y el *raloxifeno* se utilizan para el tratamiento y la prevención del cáncer de mama, porque algunos tumores de mama dependen para su crecimiento de las vías en las que intervienen estrógenos. A veces, estos compuestos reciben el nombre de *moduladores selectivos de los receptores de estrógenos* (SERMs).



 **Figura 31.29 Complejo formado por el receptor de estrógenos y el tamoxifeno.** El tamoxifeno se une a la cavidad que normalmente es ocupada por el estrógeno. Sin embargo, obsérvese que parte de la estructura del tamoxifeno sobresale de esta cavidad y, por tanto, la hélice 12 no puede replegarse en su posición habitual. En vez de ello, esta hélice bloquea el lugar de unión al coactivador. [Tomado de 3ERT.pdb.]

La caracterización de las estructuras de los complejos formados por el receptor de estrógenos y estos fármacos ha puesto de manifiesto el mecanismo de su efecto antagonista (Figura 31.29). El tamoxifeno se une al mismo sitio que el estradiol. Sin embargo, el tamoxifeno posee un grupo que se proyecta hacia el exterior de la cavidad a la que normalmente se une el ligando, al igual que ocurre con otros antagonistas. Estos grupos impiden los cambios conformatacionales normales inducidos por el estrógeno. El tamoxifeno dificulta la unión de coactivadores y, por tanto, inhibe la activación de la expresión génica.

La estructura de la cromatina se modula mediante modificaciones covalentes de las colas de las histonas

Hemos visto que los receptores nucleares responden a las moléculas señal incorporando coactivadores. Ahora nos podemos preguntar: ¿qué hacen los coactivadores para modular la actividad transcripcional? *Estas proteínas actúan facilitando la dissociación del complejo de histonas del DNA, con lo que se exponen regiones adicionales del DNA a la maquinaria de transcripción.*

Hidden page

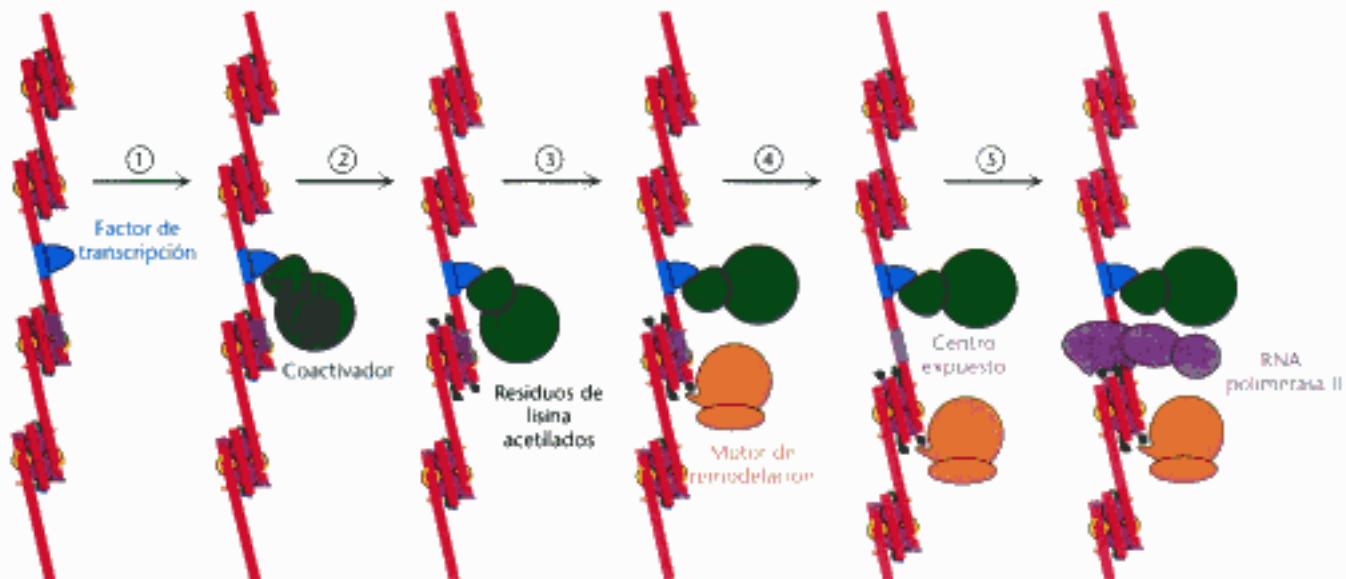


Figura 31.32 Remodelación de la cromatina. La regulación de los genes eucarióticos comienza cuando un factor de transcripción activado se une a un centro específico del DNA. Un esquema de la iniciación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II consta de cinco etapas: (1) incorporación de un coactivador, (2) acetilación de residuos de lisina en las colas de las histonas, (3) unión del complejo conocido como motor de remodelación a los residuos de lisina acetilados, (4) reorganización de la estructura de la cromatina dependiente de ATP, lo que deja expuesto un centro de unión para la RNA polimerasa o para otros factores, y (5) incorporación de la RNA polimerasa. Sólo se muestran dos subunidades de cada complejo, a pesar de que los complejos reales son mucho más grandes. Este esquema no es el único posible.

Los bromodomios también se encuentran en algunos de los componentes de los grandes complejos conocidos como *motores de remodelación de la cromatina*. Estos complejos, que también contienen dominios homólogos a los de las helicasas, utilizan la energía libre de la hidrólisis del ATP para modificar las posiciones de los nucleosomas a lo largo del DNA y para inducir otros cambios de conformación en la cromatina (Figura 31.32). La acetilación de las histonas puede provocar la reorganización de la estructura de la cromatina, pudiendo exponer centros de unión para otros factores. Por tanto, la acetilación de las histonas puede activar la transcripción mediante la combinación de tres mecanismos: la reducción de la afinidad de las histonas hacia el DNA, la incorporación de otros componentes de la maquinaria de transcripción, y dando comienzo a la reorganización de la estructura de la cromatina.

Los receptores nucleares de hormonas también presentan regiones que interactúan con componentes del complejo mediador. Por tanto, dos mecanismos de regulación génica pueden actuar de forma concertada. La modificación de las histonas y la reorganización de la cromatina pueden exponer regiones de la cromatina a las que se puede incorporar el complejo de transcripción mediante interacciones proteína–proteína.

Las desacetilasas de histonas contribuyen a reprimir la transcripción

Al igual que en procariotas, ciertos cambios en el entorno de una célula conducen a la represión de genes que habían estado activos. De nuevo, la modificación de las colas de histonas desempeña un importante papel. Sin embargo, una de las reacciones claves en la represión parece ser la desacetilación de las lisinas acetiladas, catalizada por enzimas *desacetilasas de histonas* específicas.

Desde muchos puntos de vista, la acetilación y la desacetilación de residuos de lisina en las colas de las histonas (y, probablemente, de otras proteínas) es análoga a la fosforilación y desfosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina en otras etapas de los procesos de señalización. Al igual que la adición de grupos fosforilo, la adición de grupos acetilo puede provocar cambios conformacionales y generar nuevos centros de unión. Sin embargo, si no hubiese una forma de retirar estos grupos, estos interruptores de la señalización quedarían bloqueados en una posición, perdiendo su eficacia. Al igual que las fosfatasas, las desacetilasas ayudan a colocar los interruptores en el estado inicial.

En los procesos de regulación génica, la acetilación no es la única modificación de las histonas y de otras proteínas. La metilación de residuos específicos de lisina y de arginina también puede ser importante. Actualmente, desentrañar el papel de estos procesos constituye un área de investigación muy activa.

Hidden page

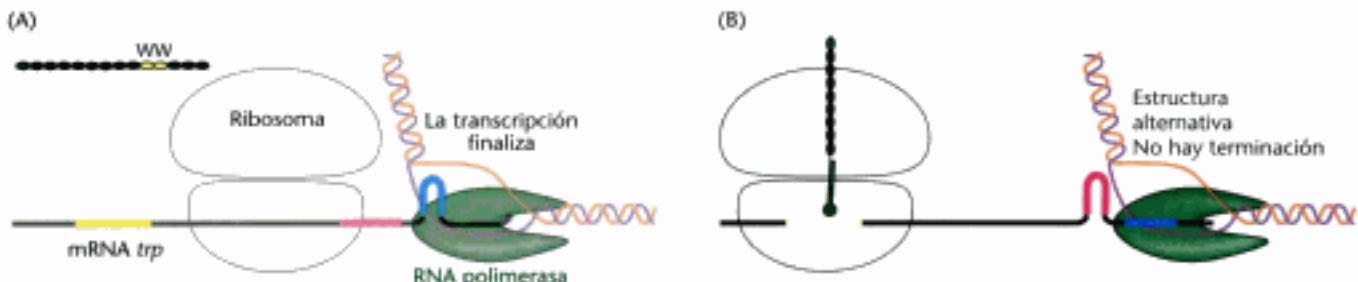


Figura 31.34 Atenuación. (A) En presencia de concentraciones adecuadas de triptófano (y, por tanto, de Trp-tRNA), la traducción sigue su curso con rapidez y se forma una estructura de RNA que finaliza la transcripción. (B) A concentraciones reducidas de triptófano, la traducción se atasca en espera de Trp-tRNA, dando tiempo para que se forme una estructura alternativa del RNA que no es eficaz a la hora de finalizar la transcripción.

polimerasa del DNA (Figura 31.34). Sin embargo, cuando el triptófano escasea, la frecuencia de terminación de la transcripción es menor. Hay poco triptofanil-tRNA presente y, por tanto, el ribosoma se atasca a la altura del tandem formado por los codones UGG que codifican el triptófano. Este retraso hace que la región adyacente del mRNA quede expuesta a medida que progresá la transcripción. Se forma una estructura alternativa del RNA que no actúa como señal de terminación y la transcripción sigue su curso y se adentra en las regiones que codifican los enzimas. Por tanto, la atenuación resulta ser una forma elegante de determinar si se dispone del triptófano necesario para la síntesis de proteínas.

En *E. coli*, otros operones para la biosíntesis de aminoácidos también se regulan por medio de centros atenuadores. El péptido líder de cada uno contiene gran cantidad de residuos de aminoácido del mismo tipo que el controlado por el operón (Figura 31.35). Por ejemplo, el péptido líder del operón fenilalanina contiene 7 residuos de fenilalanina de un total de 15. El operón treonina codifica los enzimas necesarios para la síntesis de treonina e isoleucina; el péptido líder contiene 8 residuos de treonina y 4 de isoleucina en una secuencia de 16 residuos. El péptido líder del operón histidina contiene 7 residuos de histidina seguidos. En cada caso, niveles reducidos de los correspondientes tRNA cargados hacen que el ribosoma se atasque, creando condiciones para que el mRNA naciente forme una estructura que permita a la RNA polimerasa seguir leyendo más allá del lugar atenuador.

Figura 31.35 Secuencias de péptidos líder. Secuencias de aminoácidos junto con las secuencias de los nucleótidos del mRNA correspondientes a (A) operón treonina, (B) operón fenilalanina y (C) operón histidina. En cada caso, la excesiva presencia de un aminoácido en la secuencia del péptido líder provoca la atenuación.

(A)	Met - Lys - Arg - Ile - Ser - Thr - Thr - Ile - Thr - Thr - Ile - Thr - Ile - Thr - Thr -
	5' AUG AAA CGC AUU ACC ACA 3'
(B)	Met - Lys - His - Ile - Pro - Phe - Phe - Phe - Ala - Phe - Phe - Phe - Thr - Phe - Pro - Stop
	5' AUG AAA CAC AUA CCG UUU UUC UUC GCA UUC UUU UUU ACC UUC CCC UGA 3'
(C)	Met - Thr - Arg - Val - Gln - Phe - Lys - His - His - His - His - His - Pro - Asp -
	5' AUG ACA CGC GUU CAA UUU AAA CAC CAC CAU CAU CAC CAU CCU GAC 3'

En animales, los genes relacionados con el metabolismo del hierro se regulan a nivel de la traducción

En eucariotas, la estructura secundaria del RNA desempeña una función en la regulación del metabolismo del hierro. El hierro es un nutriente esencial, necesario para la síntesis de hemoglobina, citocromos y muchas otras proteínas. Sin embargo, un exceso de hierro puede ser bastante perjudicial porque, desprovisto de un entorno proteico apropiado, puede iniciar una serie de reacciones que originan radicales libres capaces de dañar a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los animales han desarrollado sofisticados sistemas para acumular hierro en tiempos de escasez y para almacenar el exceso de hierro de forma segura para su utilización posterior. Entre las principales proteínas implicadas se encuentran la *transferrina*, una proteína que transporta el hierro en el suero, el *receptor de transferrina*, una proteína de membrana que se une a

la transferrina cargada de hierro y promueve su entrada en las células, y la *ferritina*, una proteína que almacena hierro de forma extraordinariamente eficaz y que se encuentra principalmente en el hígado y los riñones. Veinticuatro polipéptidos de ferritina forman una cápsula prácticamente esférica que encierra hasta 2400 átomos de hierro, una proporción de un átomo de hierro por cada aminoácido (Figura 31.36).

Los niveles de expresión de la ferritina y del receptor de transferrina en respuesta a los cambios en la concentración de hierro están inversamente relacionados. Cuando escasea el hierro, la cantidad del receptor de transferrina aumenta y la síntesis de nuevas moléculas de ferritina es muy pequeña o nula. Curiosamente, la síntesis del mRNA para estas proteínas no se modifica de forma acorde. En vez de ello, la regulación tiene lugar a nivel de la traducción.

Consideremos en primer lugar a la ferritina. El mRNA para la ferritina contiene en su región no traducida del extremo 5' una estructura en forma de horquilla denominada *elemento de respuesta al hierro (IRE)* (Figura 31.37). Esta horquilla se une a una proteína de 90 kd que recibe el nombre de *proteína de unión a IRE (IRP)*, que impide la iniciación de la traducción. Cuando aumenta el nivel de hierro, IRP capta hierro en forma de agrupaciones 4Fe-4S. La IRP unida a hierro no se puede unir al RNA porque los centros de unión para el hierro y para el RNA se solapan de forma considerable. Por tanto, en presencia de hierro, el mRNA de la ferritina se disocia de IRP y se traduce para originar ferritina, que se encarga de hacer acopio del exceso de hierro.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del mRNA del receptor de transferrina pone de manifiesto la existencia de varias regiones similares a IRE. Sin embargo, estas regiones están localizadas en la región no traducida del extremo 3' en vez de en la región no traducida del extremo 5' (Figura 31.38). En condiciones de escasez de hierro, IRP se une a estos IREs. Sin embargo, dada la situación de estos lugares de unión, el mRNA del receptor de transferrina se puede seguir traduciendo. ¿Qué pasa cuando los niveles de hierro aumentan y IRP ya no se une al mRNA del receptor de transferrina? Una vez liberado de IRP, el mRNA del receptor de transferrina se degrada rápidamente. Por tanto, un aumento de los niveles de hierro en el interior de la célula provoca la destrucción del mRNA del receptor de la transferrina y, por consiguiente, una disminución de la producción de la proteína receptora de transferrina.

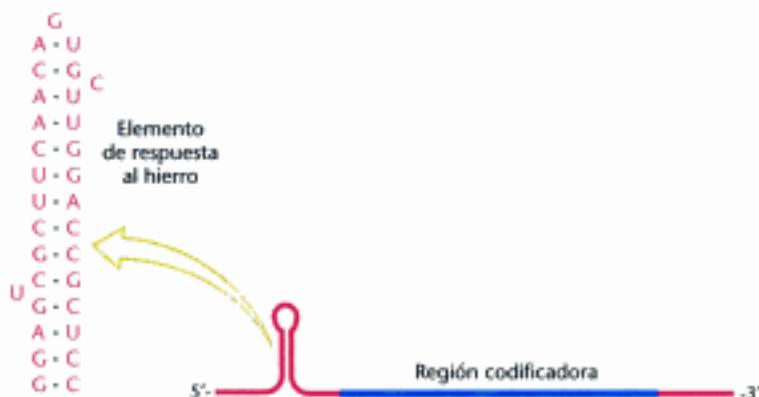


Figura 31.37 Elemento de respuesta al hierro. En la región no traducida de su extremo 5', el mRNA de la ferritina contiene una estructura en forma de horquilla denominada elemento de respuesta al hierro (IRE). Cuando el hierro escasea, el IRE se une a una proteína específica que bloques la traducción de este mRNA.

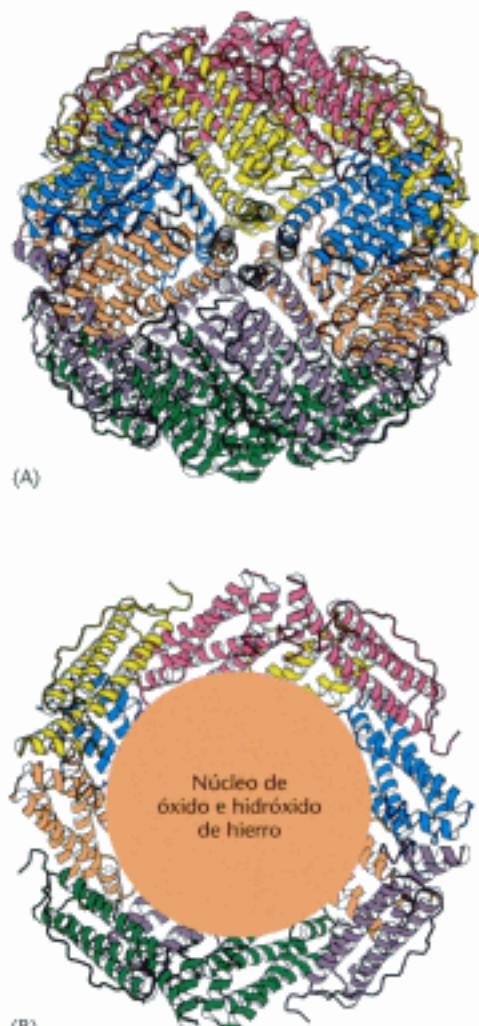


Figura 31.36 Estructura de la ferritina. (A) Veinticuatro polipéptidos de ferritina forman una cápsula prácticamente esférica. (B) Un corte transversal permite observar que en su interior el hierro se almacena en forma de un complejo compuesto por óxido e hidróxido de hierro. [Tomado de 1IE5.pdb.]

Figura 31.38 mRNA del receptor de transferrina. Este mRNA contiene un conjunto de elementos de respuesta al hierro (IREs) en su región no traducida del extremo 3'. La unión a estos elementos de la proteína que se une a los IRE estabiliza al mRNA pero no impide su traducción.

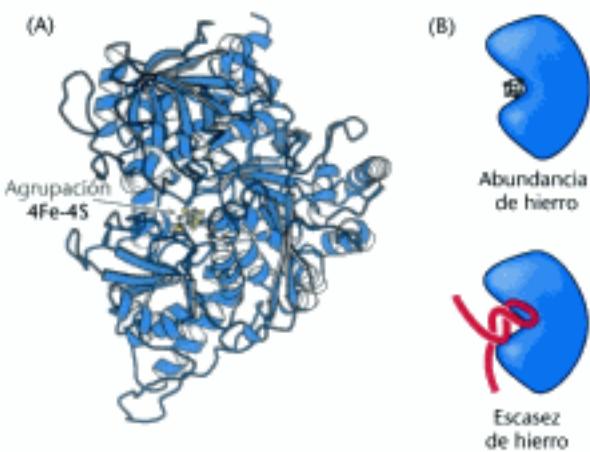


Figura 31.39 La IRP es una aconitasa. (A) La aconitasa presenta en su centro una agrupación 4Fe-4S inestable. (B) En condiciones de escasez de hierro, la agrupación 4Fe-4S se disocia y determinadas moléculas de RNA pueden ocupar su lugar. [Tomado de 1C96.pdb.]

La purificación de IRP y la clonación de su cDNA han generado una cantidad verdaderamente notable de información sobre la evolución. Se ha descubierto que la secuencia de aminoácidos de IRP coincide en aproximadamente un 30% con la de la aconitasa mitocondrial, un enzima que participa en el ciclo del ácido cítrico. Un estudio más detallado reveló que IRP es, de hecho, un enzima con actividad aconitasa; es una aconitasa del citoplasma cuya existencia se conocía desde hacía mucho tiempo pero cuya función no se comprendía del todo bien (Figura 31.39). La agrupación hierro-azufre del centro activo de IRP es bastante inestable y la pérdida del hierro desencadena importantes cambios en la conformación de la proteína. Por tanto, esta proteína puede actuar a modo de sensor de los niveles de hierro.

Se ha visto que otros mRNA, entre los que se incluyen aquéllos que participan en la síntesis del grupo hemo, presentan IREs. Por tanto, los genes que codifican proteínas necesarias para el metabolismo del hierro han adquirido secuencias que, una vez transcritas, sirven como centros de unión para la proteína sensible a los niveles de hierro. Una variable ambiental (la concentración de hierro) controla la traducción de las proteínas necesarias para el metabolismo de este metal. Por tanto se han seleccionado mutaciones en la región no traducida de los mRNA para conseguir una regulación beneficiosa mediante los niveles de hierro.

Resumen

31.1 Muchas de las proteínas que se unen al DNA reconocen secuencias específicas

La regulación de la expresión génica depende de las interacciones entre determinadas secuencias del genoma y proteínas que se unen a estos lugares de forma específica. Las proteínas que se unen de forma específica al DNA reconocen centros reguladores que habitualmente están situados junto a los genes cuya transcripción está regulada por estas proteínas. Se han identificado muchas familias de proteínas de unión al DNA. En procariotas, las proteínas que pertenecen a la familia más numerosa contienen un motivo hélice-giro-hélice. La primera hélice de este motivo se inserta en el surco mayor del DNA y establece puentes de hidrógeno específicos y otros tipos de contactos con los bordes de los pares de bases. En eucariotas, los principales tipos de proteínas de unión al DNA incluyen a los homeodomelios, a las proteínas que contienen una región básica y una cremallera de leucina (proteínas bZip), y a las proteínas dedos de zinc Cys₂-His₂. Cada uno de estos tipos de proteínas utiliza una α -hélice para establecer contactos específicos con el DNA. Aunque el empleo de α -hélices para reconocer lugares del DNA es lo más habitual, algunas proteínas utilizan otros elementos estructurales.

31.2 En procariotas, las proteínas que se unen al DNA lo hacen, de forma específica, a los centros reguladores de los operones

917

Resumen

En procariotas, muchos genes están agrupados formando operones, que son unidades de expresión genética coordinada. Un operón está formado por centros de control (un operador y un promotor) y un conjunto de genes estructurales. Además, los genes reguladores codifican proteínas que interaccionan con los centros operadores y promotores para estimular o inhibir la transcripción. La exposición de *E. coli* a la lactosa induce un aumento en la producción de β-galactosidasa y de otras dos proteínas más que están codificadas en el operón lactosa. En ausencia de lactosa o de otro galactósido inductor parecido, la proteína represor lac se une al centro operador del DNA y bloquea la transcripción. La unión de la alolactosa, un derivado de la lactosa, al represor lac provoca un cambio de conformación que hace que se disocie del DNA. A continuación, la RNA polimerasa puede avanzar más allá del centro operador y transcribir el operón lac.

Algunas proteínas activan la transcripción interaccionando directamente con la RNA polimerasa. Por ejemplo, el AMP cíclico, una señal de hambre, estimula la transcripción de muchos operones catabólicos uniéndose a la proteína activadora de catabolitos. La unión del complejo cAMP-CAP a un centro específico de la región del promotor de un operón catabólico inducible aumenta el grado de unión de la RNA polimerasa y de iniciación de la transcripción.

31.3 La mayor complejidad de los genomas eucarióticos requiere mecanismos intrincados de regulación génica

Los genomas eucarióticos son más grandes y más complejos que los procarióticos. Algunos de los mecanismos reguladores que utilizan los eucariotas son similares a los empleados por procariotas. Concretamente, la mayor parte de los genes eucarióticos no se expresan a menos que se activen mediante la unión de proteínas específicas, denominadas factores de transcripción, a determinados lugares del DNA. Estas proteínas que se unen al DNA de forma específica interaccionan directa o indirectamente con las RNA polimerasas o con sus proteínas asociadas. Los factores de transcripción eucarióticos son modulares: están formados por dominios diferenciados, uno para la unión al DNA y otro para la activación. Los dominios de activación interaccionan con las RNA polimerasas, con sus factores asociados o con otros complejos proteicos como, por ejemplo, el mediador. Los intensificadores son elementos del DNA que pueden modular la expresión génica desde lugares situados a más de 1.000 pb de distancia del lugar de inicio de la transcripción. Con frecuencia, los intensificadores son específicos para determinados tipos celulares, en función de qué proteínas de unión al DNA están presentes.

El DNA de eucariotas está íntimamente unido a proteínas básicas denominadas histonas; esta combinación recibe el nombre de cromatina. El DNA se enrolla en torno a un octámero central de histonas para formar un nucleosoma, impidiendo el acceso a multitud de posibles centros de unión del DNA. Los cambios en la estructura de la cromatina desempeñan un papel importante a la hora de regular la expresión génica. Los esteroides como los estrógenos se unen a unos factores de transcripción eucarióticos denominados receptores nucleares de hormonas. Estas proteínas son capaces de unirse al DNA tanto con el ligando unido como sin él. La unión de los ligandos provoca un cambio de conformación que permite la incorporación de proteínas adicionales denominadas coactivadores. Entre las funciones más importantes de los coactivadores se encuentra la adición de grupos acetilo a residuos de lisina de las colas de las proteínas histonas. La acetilación de las histonas hace disminuir la afinidad de las histonas hacia el DNA, haciendo que haya más genes accesibles para la transcripción. Además, las histonas acetiladas son las dianas para unas proteínas que contienen regiones de unión específicas denominadas bromodominios. Los bromodominios forman parte de dos tipos de complejos de gran tamaño: (1) los motores de remodelación de la cromatina y (2) los factores que se en-

encuentran asociados con la RNA polimerasa. Estos complejos exponen determinados lugares en la cromatina e inician la transcripción.

31.4 La expresión génica se puede controlar a niveles postranscripcionales

La expresión génica también se puede regular a nivel de la traducción. En procariontes, muchos operones importantes para la biosíntesis de aminoácidos se regulan por atenuación, un proceso que depende de la formación de estructuras alternativas en el mRNA, una de las cuales favorece la terminación de la transcripción. La atenuación está mediada por la traducción de una región líder del mRNA. Un ribosoma atascado por la ausencia de un aminoacil-tRNA necesario para traducir el mRNA líder altera la estructura del mRNA permitiendo que la RNA polimerasa pueda transcribir el operón más allá del centro de atenuación.

En eucariotas, los genes que codifican las proteínas que transportan y almacenan el hierro se regulan a nivel de la traducción. Los elementos de respuesta al hierro (IRE), estructuras que se encuentran en determinados mRNAs, se asocian a proteína a IRE cuando esta proteína no se encuentra unida al hierro. Que la expresión de un gen se vea estimulada o inhibida en respuesta a cambios en los niveles de hierro de una célula depende de la ubicación del IRE en el mRNA.

Términos clave

motivo hélice-giro hélice (p. 895)
homeodominio (p. 895)
proteína con una región básica y cremallera de leucina (proteína bZip) (p. 895)
dominio dedo de zinc Cys₂-His₂ (p. 895)
β-galactosidasa (p. 896)
modelo del operón (p. 897)
represor lac (p. 897)
operador lac (p. 898)
inductor (p. 898)
isopropiltiogalactósido (p. 898)
represor pur (p. 899)
correpresor (p. 900)
represión por catabolito (p. 900)
proteína activadora de catabolitos (CAP) (p. 900)
tipo celular (p. 901)

control combinatorio (p. 902)
intensificador (p. 902)
mediador (p. 903)
histona (p. 903)
cromatina (p. 903)
nucleosoma (p. 903)
partícula central del nucleosoma (p. 904)
centro hipersensible (p. 905)
inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (p. 906)
hipometilación (p. 907)
isla CpG (p. 907)
receptor nucleares de hormonas (p. 908)
elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (p. 908)
coactivador (p. 909)
agonista (p. 910)

esteroide anabólico (p. 910)
antagonista (p. 910)
modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM) (p. 910)
acetiltransferasa de histonas (HAT) (p. 911)
dominio de unión a la acetil-lisina (p. 911)
bromodomino (p. 911)
factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TAF) (p. 911)
motor de remodelación de la cromatina (p. 912)
desacetilasa de histonas (p. 912)
atenuación (p. 913)
transferrina (p. 914)
receptor de transferrina (p. 914)
ferritina (p. 914)
elemento de respuesta al hierro (IRE) (p. 915)
proteína de unión a IRE (IRP) (p. 915)

Lecturas seleccionadas

Bibliografía básica

- Pabo, C. O. y Sauer, R. T. 1984. Protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 293-321.
Struhl, K. 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14: 137-140.
Struhl, K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98: 1-4.
Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T. M., Glass, C. K. y Rosenfeld, M. G. 1998. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279: 703-707.
Aalfs, J. D. y Kingston, R. E. 2000. What does "chromatin remodeling" mean? *Trends Biochem. Sci.* 25: 548-555.

Libros

- Ptashne, M., 2004. *A Genetic Switch: Phage λ Revisited* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
McKnight, S. L. y Yamamoto, K. R. (Eds.), 1992. *Transcriptional Regulation* (vols. 1 and 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Latchman, D. S., 2004. *Eukaryotic Transcription Factors* (4th ed.). Academic Press.
Wolffe, A., 1992. *Chromatin Structure and Function*. Academic Press.
Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L. y Damell, J. 2004. *Molecular Cell Biology* (5th ed.). W. H. Freeman and Company.

Regulación génica en procariotas

- Balaeff, A., Mahadevan, L. y Schulten, K. 2004. Structural basis for cooperative DNA binding by CAP and lac repressor. *Structure* 12:123-132.

- Bell, C. E. y Lewis, M. 2001. The Lac repressor: A second generation of structural and functional studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 19-25.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. y Lu, P. 1996. Crystal structure of the lacrose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271: 1247-1254.
- Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T. y Ebright, R. H. 1996. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: Two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* 87: 1123-1134.
- Schultz, S. C., Shields, G. C. y Steitz, T. A. 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: The DNA is bent by 90 degrees. *Science* 253: 1001-1007.
- Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A., Ebright, Y. W., Ebright, R. E. y Berman, H. M. 1996. Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 angstroms resolution: A complete picture of the protein-DNA interface. *J. Mol. Biol.* 260: 395-408.
- Busby, S. y Ebright, R. H. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293: 199-213.
- Souers, W. S. y Phillips, S. E. 1992. Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by beta-strands. *Nature* 359: 387-393.
- Regulación génica en eucariotas**
- Green, M. R. 2005. Eukaryotic transcription activation: Right on target. *Mol. Cell* 18: 399-402.
- Kornberg, R. D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* 30: 235-239.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. y Richmond, T. J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
- Arents, G. y Moudrianakis, E. N. 1995. The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11170-11174.
- Basavanis, A. D., Arents, G., Moudrianakis, E. N. y Lansman, D. 1995. A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res.* 23: 2685-2691.
- Cleentens, A., Rojas, J. R., Trével, R. C., Wang, L., Berger, S. L. y Marmorstein, R. 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *EMBO J.* 18: 3521-3532.
- Deckert, J. y Struhl, K. 2001. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2726-2735.
- Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternholz, R. y Ramakrishnan, V. 1998. Structure of the histone acetyltransferase HAT1: A paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell* 94: 427-438.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. y Pavletich, N. P. 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401: 188-193.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R. y Pavletich, N. P. 2001. Structure of the histone deacetylase SIR2. *Nat. Struct. Biol.* 8: 621-625.
- Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. y Tjian, R. 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288: 1422-1425.
- Rojas, J. R., Trével, R. C., Zhou, J., Mo, Y., Li, X., Berger, S. L., Allis, C. D. y Marmorstein, R. 1999. Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* 401: 93-98.
- Receptores nucleares de hormonas**
- Downes, M., Verdecia, M. A., Roecker, A. J., Hughes, R., Hogetesch, J. B., Kast-Woelber, H. R., Bowman, M. E., Ferrer, J. L., Anisfeld, A. M., Edwards, P. A., Rosenfeld, J. M., Alvarez, J. G., Noel, J. P., Nicolau, K. C. y Evans, R. M. 2003. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell* 11: 1079-1092.
- Evans, R. M. 2005. The nuclear receptor superfamily: A Rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol.* 19: 1429-1438.
- Xu, W., Cho, H., Kadam, S., Banayan, E. M., Anderson, S., Yates, J. R. 3rd, Emerson, B. M. y Evans, R. M. 2004. A methylation-mediator complex in hormone signalling. *Genes Dev.* 18: 144-156.
- Evans, R. M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
- Yamamoto, K. R. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19: 209-252.
- Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. R. y Sigler, P. B. 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5998-6003.
- Schwarz, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. y Rhodes, D. 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75: 567-578.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. y Greene, G. L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95: 927-937.
- Collingwood, T. N., Urnov, F. D. y Wolffe, A. P. 1999. Nuclear receptors: Coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 23: 255-275.

Cromatina y remodelación de la cromatina

- Elgin, S. C. 1981. DNAase I-hypersensitive sites of chromatin. *Cell* 27: 413-415.
- Weintraub, H., Larsen, A. y Grodine, M. 1981. α -Globin-gene switching during the development of chicken embryos: Expression and chromosome structure. *Cell* 24: 333-344.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hammett, N., Kao, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P. y Young, R. A. 2000. Genome-wide location and function of DNA-binding proteins. *Science* 290: 2306-2309.
- Goodrich, J. A. y Tjian, R. 1994. TBP-TAF complexes: Selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 403-409.
- Bird, A. P. y Wolffe, A. P. 1999. Methylation-induced repression: Belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451-454.
- Cairns, B. R. 1998. Chromatin remodeling machines: Similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem. Sci.* 23: 20-25.
- Albright, S. R. y Tjian, R. 2000. TAFs revisited: More data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242: 1-13.
- Urnov, F. D. y Wolffe, A. P. 2001. Chromatin remodeling and transcriptional activation: The cast (in order of appearance). *Oncogene* 20: 2991-3006.

Regulación postranscripcional

- Koller, R. y Yanofsky, C. 1982. Attenuation in amino acid biosynthetic operons. *Annu. Rev. Genet.* 16: 113-134.
- Yanofsky, C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289: 751-758.
- Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B. y Klausner, R. D. 1991. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: Functional implications. *Cell* 64: 881-883.
- Klausner, R. D., Rouault, T. A. y Harford, J. B. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28.
- Guer, M. J., Artymiuk, P. J. y Guest, J. R. 1997. The aconitase family: Three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* 22: 3-6.
- Theil, E. C. 1994. Iron regulatory elements (IREs): A family of mRNA non-coding sequences. *Biochem. J.* 304: 1-11.

Aspectos históricos

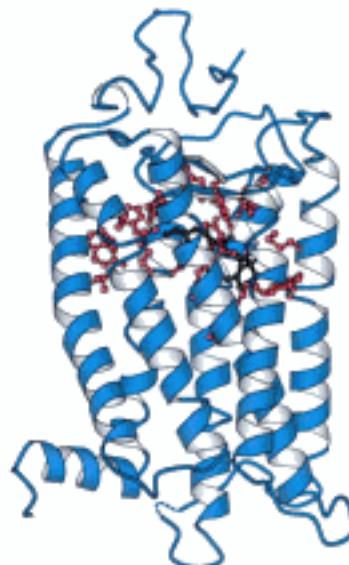
- Lewis, M. 2005. The lac repressor. *C. R. Biol.* 328: 521-548.
- Jacob, F. y Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.
- Prashne, M. y Gilbert, W. 1970. Genetic repressors. *Sci. Am.* 222: (6) 36-44.
- Lwoff, A. y Ullmann, A. (Eds.), 1979. *Origins of Molecular Biology: A Tribute to Jacques Monod*. Academic Press.
- Judson, H. 1996. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hidden page

Sistemas sensoriales



La percepción del color. El fotorreceptor, la rodopsina (derecha), que absorbe luz en el proceso de la visión, consiste en una molécula de la proteína opsina unida a un derivado de la vitamina A, el retinal. Los aminoácidos (de color rojo) que rodean al retinal son los responsables del color de luz que se absorbe más eficazmente. Aquellos individuos que carecen del fotorreceptor que absorbe luz para el color verde, verán un colorido puesto de frutas (izquierda) como diferentes tonos de amarillo (centro). [Fotografías de L. T. Sharpe, A Stockman, H. Jagle y J. Nathans. Opsin genes, cone photopigments, color vision and color blindness. In *Color Vision: from Genes to Perception*, K. Gegenfurtner y L. T. Sharpe, Eds. (Cambridge University Press, 1999), pp.3-51.]



Nuestros sentidos nos proporcionan los medios para detectar un variado conjunto de señales externas. Por ejemplo, cuando nos hemos habituado a la oscuridad de una sala, nuestros ojos nos permiten distinguir entre niveles de luz muy bajos, hasta un límite inferior *de menos de diez fotones*. Con más luz, somos capaces de distinguir millones de colores. A través de nuestros sentidos del gusto y olfato, somos capaces de detectar miles de compuestos en nuestro ambiente y clasificarlos en categorías como: agradable-desagradable, sano-tóxico, etc. Por último, podemos distinguir estímulos mecánicos en el aire y nuestro entorno a través de los sentidos del olfato y del tacto.

¿Cómo trabajan nuestros sistemas sensoriales? ¿Cómo se detecta el estímulo inicial? ¿Cómo se transforman estos acontecimientos bioquímicos iniciales en percepciones (sensaciones) y experiencias? Hemos descrito previamente sistemas que son sensibles y responden a señales químicas, por ejemplo, receptores que unen factores de crecimiento u hormonas. Nuestro conocimiento de estos receptores y sus vías transductoras de señales nos han suministrado conceptos y herramientas para desvelar algunas de las incógnitas sobre los sistemas sensoriales. Por ejemplo, los receptores 7TM (los receptores que atraviesan la membrana siete veces, Sección 14.1) tienen también un importante papel en el olfato, gusto y visión. Los conductos iónicos que son sensibles a los choques mecánicos son esenciales para el oído y el tacto.

Contenido

- 32.1 El olfato detecta una amplia variedad de compuestos orgánicos
- 32.2 El gusto se puede considerar una combinación de sentidos que funcionan a través de mecanismos diferentes
- 32.3 Las moléculas fotorreceptoras del ojo detectan la luz visible
- 32.4 El oído depende de la detección rápida de estímulos mecánicos
- 32.5 El tacto incluye la sensibilidad a la presión, a la temperatura y a otros factores

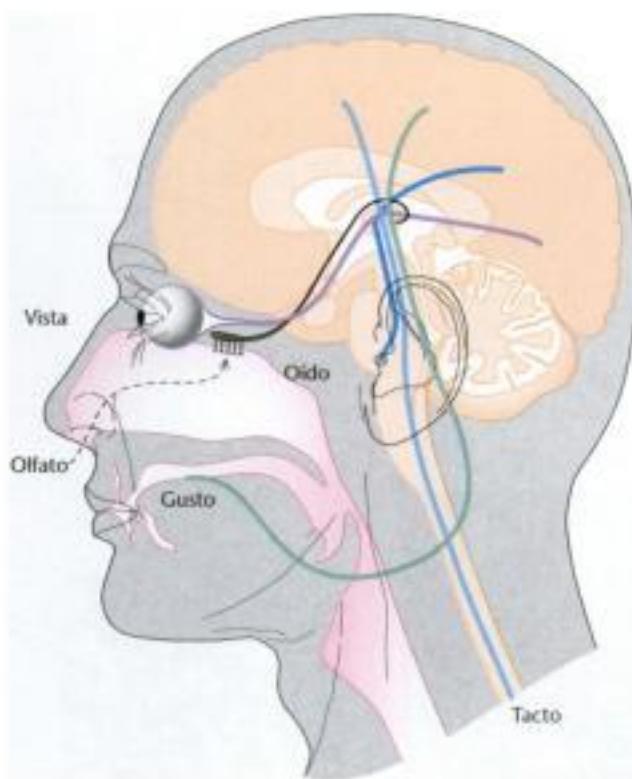
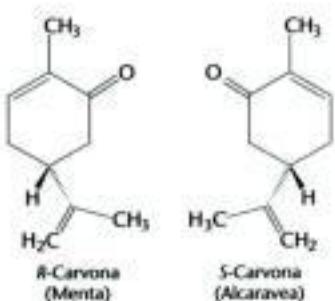
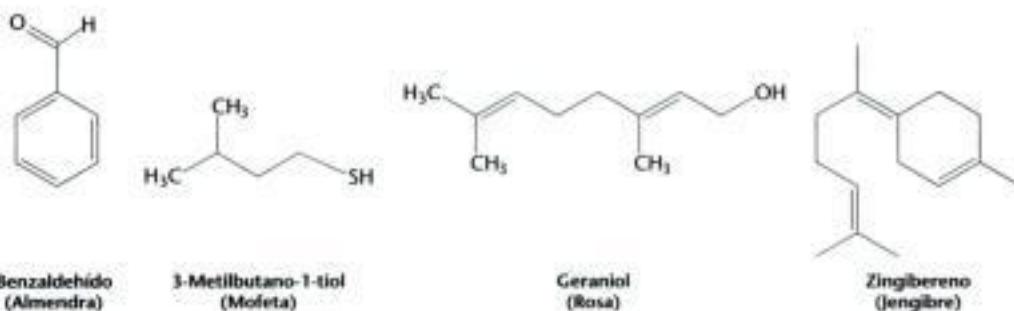


Figura 32.1 Conexiones sensoriales al cerebro. Los nervios sensitivos conectan los órganos de los sentidos al cerebro y la médula espinal.

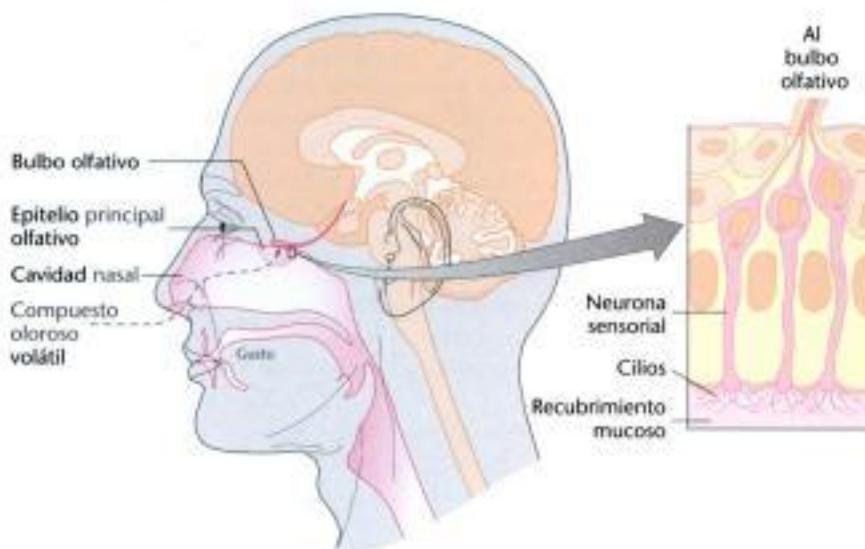
En este capítulo, nos vamos a centrar en los cinco principales sistemas sensoriales en los seres humanos y otros mamíferos: olfato (el sentido de oler; es decir, la detección de pequeñas moléculas en el aire), gusto (la detección de determinados compuestos orgánicos y iones por la lengua), visión (la detección de luz), oído (la detección del sonido u ondas de presión en el aire), y el tacto (la detección de cambios en la presión, temperatura y otros factores por la piel). Cada uno de estos sistemas sensoriales primarios contiene neuronas sensoriales especializadas que transmiten impulsos nerviosos al sistema nervioso central (Figura 32.1). En el sistema nervioso central estas señales son procesadas y combinadas con otras informaciones para producir una percepción que puede desencadenar un cambio de comportamiento. De esta manera, nuestros sentidos nos permiten detectar cambios en nuestro entorno y ajustar nuestro comportamiento de forma adecuada.

32.1 El olfato detecta una amplia variedad de compuestos orgánicos

Los seres humanos pueden detectar y distinguir miles de compuestos distintos a través del olfato, a menudo con considerable sensibilidad y especificidad. La mayor parte de las sustancias oloresas son compuestos orgánicos relativamente pequeños con suficiente volatilidad para poder ser transportados como vapores hasta la nariz. Por ejemplo, el compuesto responsable del olor de las almendras es un compuesto aromático muy sencillo, el benzaldehido, mientras que el compuesto sulfurado 3-metilbutano-1-tiol es el componente mayoritario del olor de las mofetas.



¿Qué propiedades de estas moléculas son las responsables de su olor? En primer lugar, de todas las propiedades físicas, la forma de la molécula es la crucial. Podemos comprobar la importancia de este factor si comparamos moléculas como las responsables del olor de la menta y la alicaravea. Estos compuestos son idénticos en prácticamente todas sus propiedades físicas como la hidrofobicidad, porque son isómeros especulares uno de otro. Por tanto, el olor producido por una sustancia depende no sólo de una propiedad física, sino de la interacción de ese compuesto con una unión específica en la superficie, principalmente un receptor proteico. En segundo lugar, algunos seres humanos (y otros animales) sufren de *anosmias específicas*, lo que quiere decir que son incapaces de oler determinados compuestos aunque su sistema olfativo sea en todo lo demás normal. Dichas anosmias son, a menudo, hereditarias. Estas observaciones sugieren que mutaciones en los genes de determinados receptores pueden provocar la imposibilidad de detectar un subgrupo de compuestos.



La capacidad olfativa está mediada por una familia extensa de receptores con siete hélices transmembrana

Los compuestos olorosos se detectan en una región específica de la nariz, llamada el *epitelio principal olfativo*, que se encuentra en la parte superior de la cavidad nasal (Figura 32.2): Alrededor de un millón de neuronas sensoriales se encuentran recubriendo la superficie de esta región. Los cilios que contienen los receptores proteicos que unen los compuestos olorosos se proyectan desde estas neuronas hacia la mucosa que recubre la cavidad nasal.

A finales de la década de los 80, se realizaron estudios bioquímicos en los que se examinaban cilios aislados de epitelio olfativo de ratas que habían sido expuestas a sustancias olorosas. Se comprobó que la exposición a dichas sustancias aumentaba los niveles celulares de cAMP, y que este aumento se observaba sólo en presencia de GTP. Por lo que se conocía acerca de los sistemas transductores de señales se postuló que la participación de cAMP y GTP sugerían la implicación de una proteína G y, por tanto, de receptores 7TM. A continuación Randall Reed purificó y clonó la subunidad α de una proteína G, denominada G_{olf} , que se expresa sólo en los cilios olfativos. La participación de receptores 7TM sugería una estrategia para identificar los receptores olfativos. Se buscaron cDNAs que (1) se expresaran principalmente en las neuronas sensoriales que envuelven el epitelio nasal, (2) codificaran miembros de la familia de receptores 7TM, y (3) estuvieran presentes como una familia grande y diversa para dar cuenta de la gran variedad de sustancias olorosas. A través del empleo de estos criterios, los cDNAs para los receptores de sustancias olorosas se identificaron en 1991 por parte de Richard Axel y Linda Buck.

 La familia de receptores olfativos (a partir de ahora OR) es incluso mayor de lo esperado: *en el ratón y la rata se han encontrado más de 1000 genes, mientras que el genoma humano codifica alrededor de 350 ORs*. Además el genoma humano incluye aproximadamente 500 pseudogenes que contienen mutaciones que evitan la generación de un receptor olfativo completo. La familia de los OR es así una de las familias más grandes de genes en los humanos. Análisis adicionales de los genes OR de primates muestran que la fracción de pseudogenes es mayor en aquellas especies relacionadas con más proximidad a los humanos (Figura 32.3). Si consideramos todo esto desde el punto de vista evolutivo, podemos considerar que la pérdida de agudeza en el sentido del olfato de los mamíferos superiores,

Figura 32.2 El epitelio nasal principal. Esta región de la nariz, que se encuentra en la zona superior de la cavidad nasal, contiene aproximadamente un millón de neuronas sensoriales. Los impulsos nerviosos generados por la unión de las moléculas olorosas a sus receptores en los cilios se transmiten desde las neuronas sensoriales al bulbo olfativo.

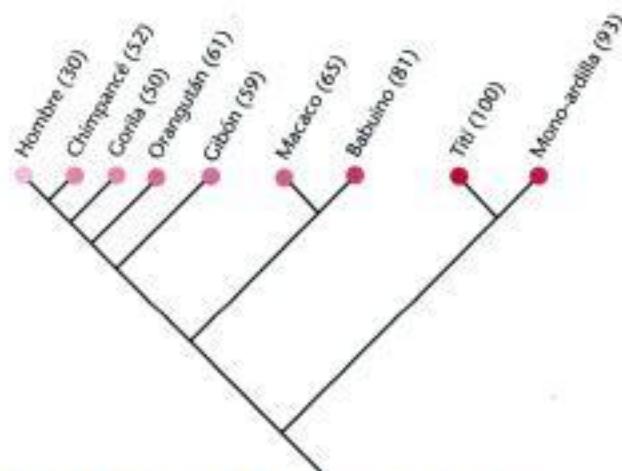


Figura 32.3 Evolución de los receptores olfativos. Los receptores olfativos parecen haber perdido funciones a través de la conversión en pseudogenes en el transcurso de la evolución de los primates. En paréntesis se muestra el porcentaje de genes OR que parecen ser funcionales para cada especie.

Hidden page

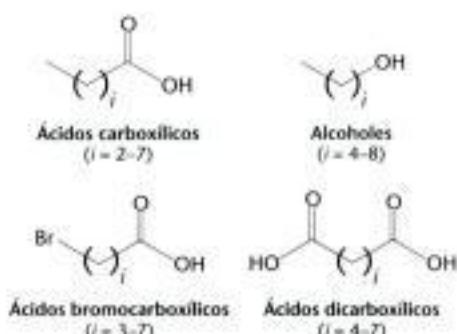


Figura 32.6 Cuatro series de sustancias olorosas analizadas como activadoras de los receptores olfativos.

Se cargó con la sonda sensible al calcio Fura-2 (p. 389) una sección de epitelio nasal de ratón. Este tejido se trató con distintas sustancias olorosas, una cada vez, a concentraciones específicas. Si se unía la sustancia olorosa y se activaba el OR, se podía detectar la neurona en el microscopio por un cambio en la fluorescencia provocado por la entrada de calcio que ocurre como parte del proceso transductor de la señal. Para establecer qué OR era responsable de la respuesta, se generó cDNA a partir de mRNA que se había aislado de las neuronas que habían sido identificadas individualmente. El cDNA se procesó por PCR mediante el uso de cebadores que eran capaces de amplificar la mayor parte, o todos, los OR conocidos. A continuación se analizó y determinó la secuencia de los productos PCR para cada neurona.

Empleando este protocolo, los investigadores analizaron las respuestas de las neuronas a una serie de compuestos en los que variaban su longitud de cadena y los grupos funcionales de los extremos (Figura 32.6). Los resultados de estos experimentos, a primera vista, parecen sorprendentes (Figura 32.7). Lo más importante es que no hay una correspondencia 1:1 entre sustancias olorosas y receptores. *Casi cada sustancia olorosa activa un número de receptores* (generalmente a diferente intensidad) y *casi cada receptor es activado por más de una sustancia olorosa*. Se debe hacer notar, sin embargo, que cada sustancia olorosa activa una única combinación de receptores. En principio, este mecanismo combinatorio permite a una distribución relativamente pequeña de receptores distinguir un amplio número de sustancias olorosas.

¿Cómo se transmite al cerebro la información acerca de qué receptores han sido activados? Recuérdese que cada neurona expresa sólo un OR y que el patrón de expresión parece ser muy aleatorio. Una clave sustancial en relación con la conexión entre los receptores y el cerebro es la que ha suministrado la creación de ratones que expresan conjuntamente con un gen OR el de un indicador de color fácilmente detectable. A continuación se realizó un trazado de las neuronas olfativas que expresaban la combinación proteína indicadora-OR en su destino en el cerebro, una estructura denominada el bulbo olfativo (Figura 32.8). Se encontró que los procesos de las neuronas que expresaban el mismo gen OR se conectaban en el mismo lugar en el bulbo olfativo. Además este patrón de conexión neuronal se encontró que era el mismo en todos los ratones examinados. Por tanto,

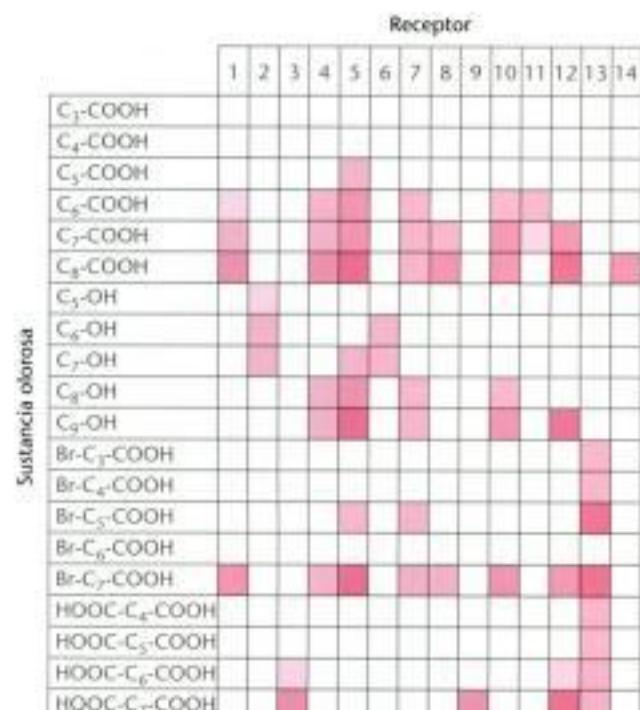


Figura 32.7 Patrones de activación de los receptores olfativos. Se analizaron catorce receptores distintos en su capacidad de respuesta a los compuestos mostrados en la Figura 32.6. Un recuadro coloreado indica que el receptor de la parte superior responde al compuesto indicado a la izquierda. Una coloración más oscura indica que el receptor es activado a concentraciones más bajas de sustancia olorosa.



Figura 32.8 Convergencia de neuronas olfativas. Esta sección de la cavidad nasal se tñó para revelar el proceso por el que las neuronas sensoriales expresan el mismo receptor olfativo. Los procesos convergen en el mismo punto del bulbo olfativo. [De P. Mombaerts, F. Wag, C. Dulac, S. K. Chao, A. Nemes, M. Mendelsohn, J. Edmondson y R. Axel. *Cell* 87 (1996): 675-689.]

Hidden page

Hidden page

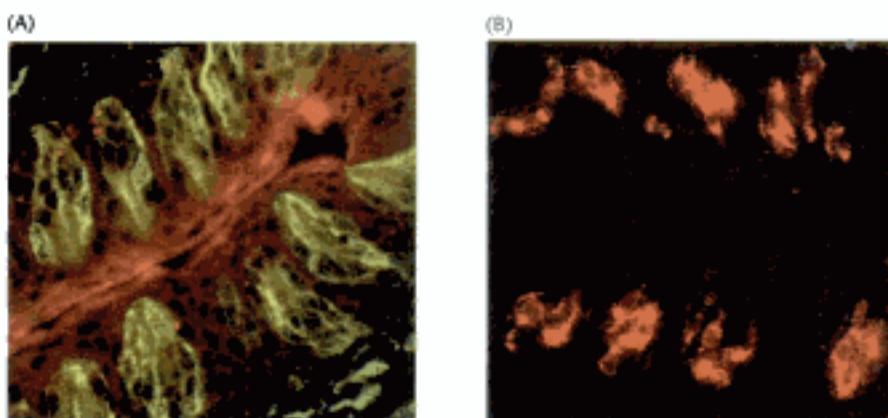
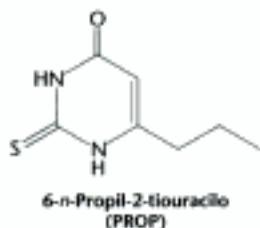


Figura 32.13 Expresión de gustducina en la lengua. (A) Se tifró una sección de la lengua con un anticuerpo fluorescente que revelaba la localización de los botones gustativos. (B) La misma región teñida con un anticuerpo dirigido contra la gustducina reveló que esta proteína G se expresa en los botones gustativos. [Cortesía del Dr. Charles S. Zuker.]



(Figura 32.13). ¿Cómo se podría identificar a los receptores 7TM? La capacidad de detectar algunos compuestos depende de *loci* genéticos específicos tanto en humanos como en ratones. Por ejemplo, la capacidad de detectar el compuesto amargo 6-n-propil-2-thiouracilo (PROP) se localizó en una región del cromosoma 5 de humanos comparando marcadores de DNA de personas que mostraban distinta sensibilidad al compuesto.

Esta observación sugería que esta región podría codificar un receptor 7TM que respondiera al PROP. En ese momento se habían secuenciado aproximadamente 450 kilobases en esa región. Esta secuencia se analizó mediante análisis informáticos en busca de potenciales genes de receptores 7TM, y, ciertamente, se detectó una a la que denominó T2R1. Búsquedas adicionales en bases de datos permitieron detectar 30 secuencias similares a la de T2R1 en el genoma humano. Las proteínas codificadas eran idénticas en un 30-70% a la T2R1 (Figura 32.14).

¿Son estas proteínas, de hecho, receptores del sabor amargo? Pruebas de distinto tipo sugieren que lo son. En primer lugar, sus genes se expresan en células sensivas del gusto, de hecho en muchas de las células que expresan gustducina. En segundo lugar, las células que expresan miembros individuales de esta familia responden a compuestos amargos específicos. Por ejemplo, las células que expresan un receptor específico en ratón (mT2R5) desarrollan una respuesta cuando se les expone específicamente a cicloheximida. En tercer lugar, los ratones que no muestran una respuesta a la cicloheximida presentan mutaciones puntuales en el gen que codifica

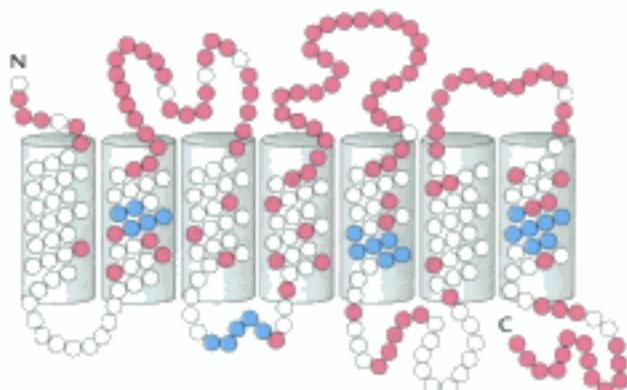
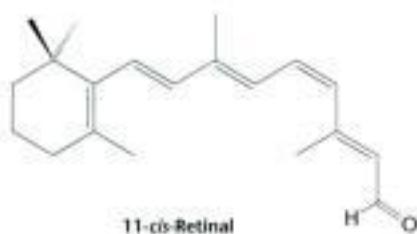


Figura 32.14 Regiones conservadas y variables de los receptores del sabor amargo. Los receptores para el sabor amargo son miembros de la familia de receptores 7TM. En la figura se muestran en azul los residuos fuertemente conservados, característicos de esta familia de proteínas, mientras que los residuos altamente variables se indican en rojo.

Hidden page

Hidden page

Hidden page



La rodopsina, un receptor 7TM especializado, absorbe la luz visible

Los bastones son estructuras delgadas y alargadas; el segmento externo está especializado en la fotorrecepción (Figura 32.20). Contiene un apilamiento de unos 1000 discos que son sacos densamente empaquetados con moléculas de fotorreceptores rodeados de una membrana. La molécula fotosensible se denomina a menudo *pigmento visual* porque es una molécula muy coloreada que le debe a esto su habilidad de captar la luz. La molécula fotorreceptora en los bastones es la *rodopsina* (Sección 14.1), que consta de la proteína *opsina* ligada al grupo prostético 11-cis-retinal.

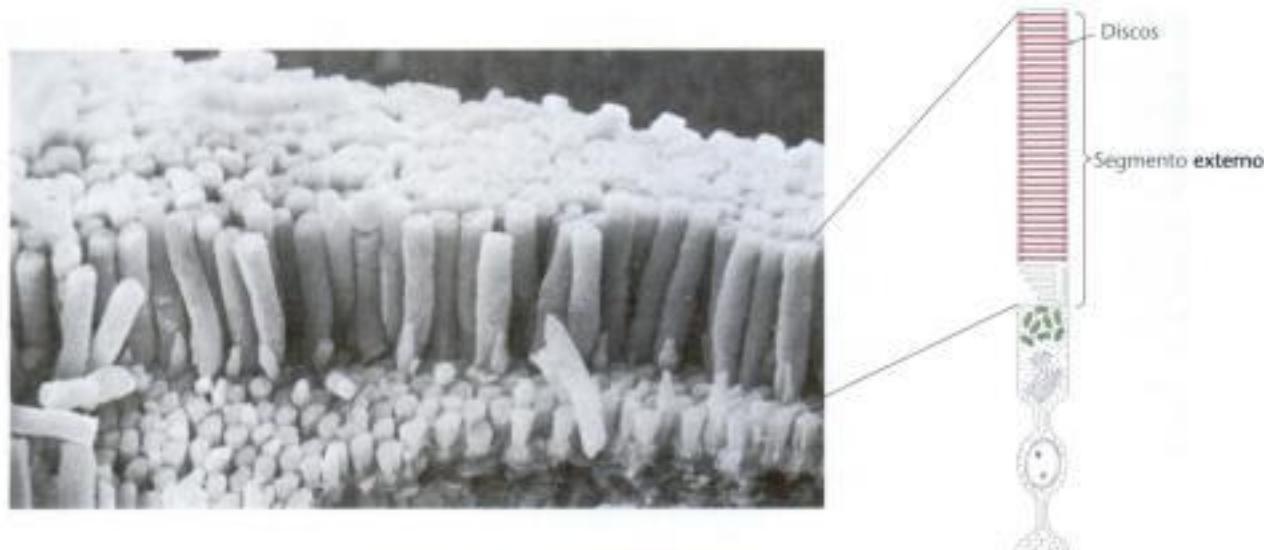


Figura 32.20 La célula en bastón. (Izquierda) Micrografía electrónica de barrido de las células en bastón de la retina. (Derecha) Representación esquemática de una célula en bastón. [Fotografía cortesía de Dr. Deric Bownds.]

La rodopsina absorbe la luz de forma muy eficiente en la zona intermedia del espectro visible, su absorción se centra alrededor de los 500 nm, que coincide de una forma muy adecuada con la radiación solar (Figura 32.21). Una molécula de rodopsina puede absorber un alto porcentaje de los fotones de la longitud de onda correcta que inciden sobre ella, como lo indica el valor del coeficiente de extinción a 500 nm: $40\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. El coeficiente de extinción para la rodopsina es más de un orden de magnitud superior que el del triptófano, el componente que absorbe mejor la luz en las proteínas sin grupo prostético.

La opsina, el componente proteico de la rodopsina, es un miembro de la familia de receptores 7TM. La rodopsina fue el primer miembro de esta familia que pudo ser purificado, su gen fue el primero en ser clonado y secuenciado, y su estructura tridimensional, la primera en determinarse. El color de la rodopsina y su respuesta a la luz depende de la presencia del grupo que absorbe la luz (*cromóforo*) 11-cis-retinal. Este compuesto absorbe la luz de una forma muy eficiente porque es un polieno en el que se alternan seis enlaces simples y seis dobles, lo que da lugar a una larga red de electrones deslocalizados. Se debe recordar que la alternancia de enlaces simples y dobles es la responsable de las propiedades cromosóforas de la clorofila (Sección 19.2). El grupo aldehído del 11-cis-retinal forma una base de Schiff (Figura 32.22) con el grupo ε-amino del residuo de lisina 296 que reside en el centro de la séptima hélice transmembrana. El retinal libre tiene su máximo de absorción a 370 nm, y su base de Schiff desprotonada absorbe a 380 nm, mientras que la base de Schiff protonada absorbe a 440 nm o a longitudes de onda superiores. Así, el má-

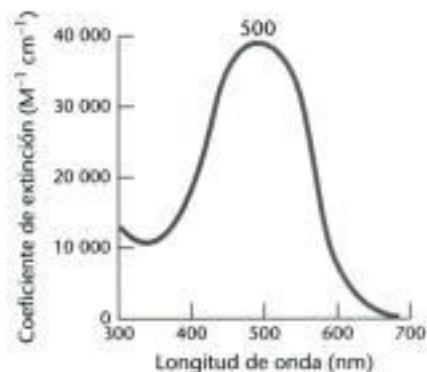


Figura 32.21 Espectro de absorción de la rodopsina. Prácticamente se absorben casi todos los fotones de longitud de onda cercana a 500 nm que alcanzan a una molécula de rodopsina.

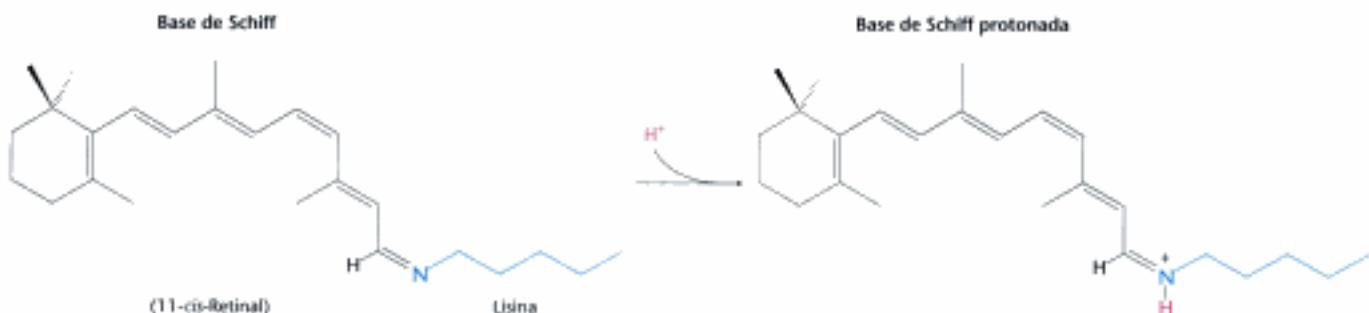


Figura 32.22 Unión lisina-retinal. El retinal está unido a la lisina 296 de la opsina a través de una base de Schiff. En el estado en reposo de la rodopsina, esta base de Schiff está protonada.

ximo de absorción de la rodopsina, 500 nm, sugiere fuertemente que la base de Schiff está en su forma protonada; otras interacciones con la opsina desplazan el máximo de absorción aún más hacia el rojo. La carga positiva de la base de Schiff protonada está compensada por la carga negativa del glutamato 113 localizado en la hélice 2; el residuo glutamato se encuentra muy cerca del enlace retinal-lisina en la estructura tridimensional de la rodopsina.

La absorción de la luz induce una isomerización específica del 11-cis-retinal unido

¿Cómo se genera una señal cuando la base de Schiff del retinal absorbe la luz? George Wald y sus colaboradores descubrieron que la absorción de la luz provoca la isomerización del grupo 11-cis-retinal de la rodopsina a su forma todo-trans (Figura 32.23). Esta isomerización provoca que el átomo de nitrógeno de la base de Schiff se mueva aproximadamente 5 Å, suponiendo que el anillo ciclohexano del grupo retinal se mantiene fijo. En esencia, la energía luminosa de un fotón se convierte en un movimiento atómico. El cambio de las posiciones atómicas, como la unión de un ligando a otros receptores 7TM, desencadena una serie de sucesos dirigidos al cierre de conductos iónicos y la generación de un impulso nervioso.

La isomerización de la base de Schiff del retinal tiene lugar en unos pocos picosegundos tras la absorción del fotón. El producto inicial, denominado *batorrodopsina*, contiene un tenso grupo retinal en todo-trans. Al cabo de aproximadamente 1 milisegundo, este intermediario se convierte, a través de muchos otros pasos, en la *metarrodopsina II*. En la metarrodopsina II, la base de Schiff está desprotonada y la proteína opsina ha sufrido una reorganización significativa.

La metarrodopsina II (también denominada como R*) es análoga al estado unido a ligando de los receptores 7TM como el receptor β_2 -adrenérgico (Sección 14.1) y

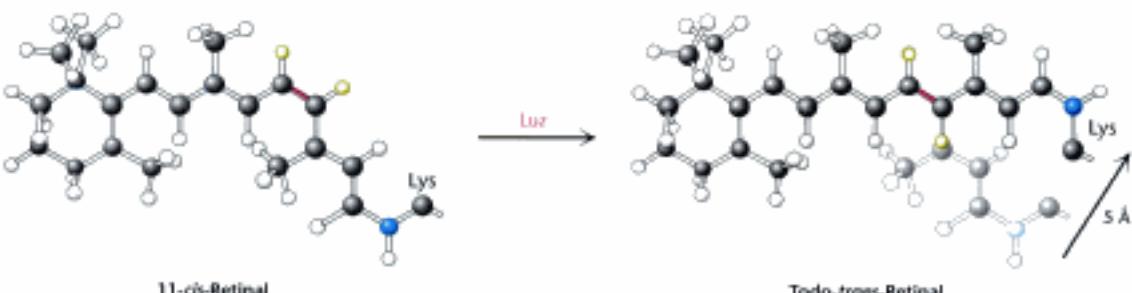


Figura 32.23 Movimiento atómico en el retinal. El átomo de nitrógeno de la base de Schiff se mueve 5 Å como consecuencia de la isomerización del 11-cis-retinal al todo-trans-retinal por rotación alrededor del enlace indicado en rojo.

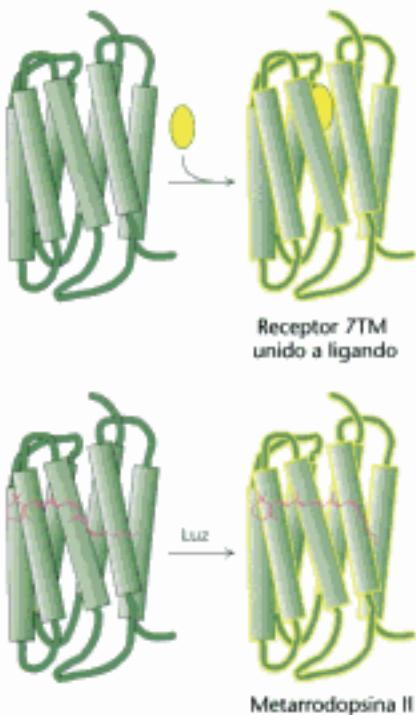


Figura 32.24 Receptores 7TM análogos. La conversión de rodopsina en metarodopsina II activa una vía de transducción de señales análoga a la activación inducida por otros receptores 7TM en sus ligandos adecuados.

a los receptores de las sustancias olorosas y gustativas antes comentados (Figura 32.24). Como estos receptores, esta forma de rodopsina activa una proteína G heterotrimérica que propaga la señal. La proteína G asociada con la rodopsina recibe el nombre de *transducina*. La metarodopsina II desencadena el intercambio del GDP por el GTP por la subunidad α de la transducina (Figura 32.25). Con la unión del GTP se liberan las subunidades $\beta\gamma$ de la transducina, y la subunidad α activa una cGMP fosfodiesterasa pues al unirse eliminan una subunidad inhibidora. La forma activa de la fosfodiesterasa es un enzima muy potente que hidroliza rápidamente el cGMP a GMP. La reducción en la concentración de cGMP provoca el cierre de conductos iónicos regulados por cGMP, provocando la hiperpolarización de la membrana y la señalización neuronal. A cada paso en este sentido, la señal inicial (la absorción de un único fotón) se amplifica de forma que provoca una hiperpolarización suficiente de la membrana para provocar una señal.

La disminución de los niveles de calcio inducida por la luz coordina la recuperación

Como hemos visto, el sistema visual responde a cambios en la luz y en el color en unos pocos milisegundos, lo suficientemente rápido para que seamos capaces de percibir el movimiento continuo a cerca de 1000 imágenes por segundo. Para conseguir una respuesta rápida, la señal debe terminarse rápidamente y el sistema debe volver a su estado inicial. Para ello, deben completarse los siguientes pasos: Primero, la rodopsina activada debe ser bloqueada para interrumpir la activación de la transducina. La *rodopsina quinasa* cataliza la fosforilación del extremo carboxilo de R* en múltiples residuos serina y treonina. La *arrestina*, una proteína inhibidora (p. 388) se une entonces a la R* fosforilada y evita posteriores interacciones con la transducina.

Segundo, la subunidad α de la transducina debe volver a su estado inactivo para prevenir posteriores señalizaciones. Como otras proteínas G, la subunidad α posee una actividad propia GTPasa que hidroliza el GTP unido, dando GDP. La hidrólisis tiene lugar en menos de un segundo, cuando la transducina se une a la fosfodiesterasa. Entonces la transducina en forma GDP abandona la fosfodiesterasa y se reasocia con las subunidades $\beta\gamma$, y la fosfodiesterasa vuelve a su estado inactivo. Tercero, el nivel de cGMP debe aumentar para provocar la reapertura de los conductos iónicos regulados por cGMP. La acción de la guanilato ciclase permite realizar este tercer paso sintetizando cGMP a partir del GTP.

El ion calcio juega un papel esencial en el control de la guanilato ciclase porque es un fuerte inhibidor de la actividad del enzima. En la oscuridad, tanto el Ca^{2+} como el Na^+ entran en el segmento externo de los bastones a través de los conductos regulados por cGMP. La entrada de iones calcio se contrarresta por su salida a través de un intercambiador, un sistema de transporte que usa el flujo termodinámicamente

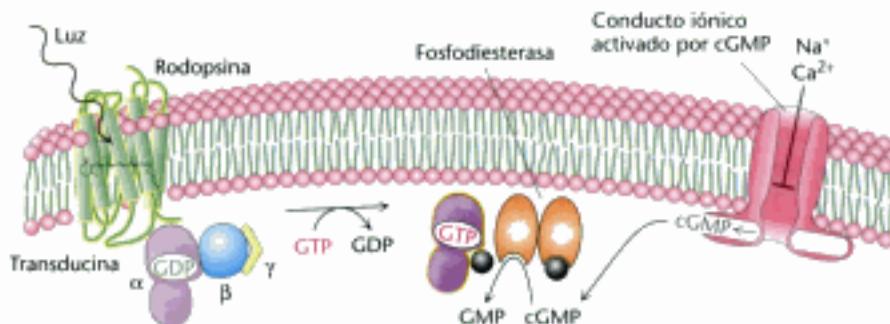
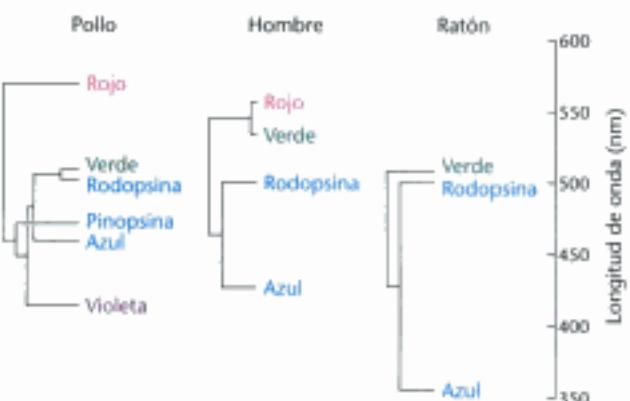


Figura 32.25 Transducción de señales en la visión. La activación inducida por la luz en la rodopsina provoca la hidrólisis del cGMP, que a su vez provoca el cierre de un conducto iónico y el inicio de un potencial de acción.

Hidden page

Figura 32.28 Relación evolutiva entre los pigmentos visuales. Los pigmentos visuales han evolucionado por duplicación de genes a través de diferentes ramas del árbol evolutivo animal. La longitud de las ramas de los "árboles" se corresponden con el porcentaje de divergencias en los aminoácidos. [Adaptado de J. Nathans, *Neuron* 24(1999): 299-321; con permiso de Cell Press.]



Estas observaciones son la fuente del conocimiento de la evolución de los fotorreceptores. Primero, los fotorreceptores verde y rojo son claramente productos de un suceso evolutivo reciente (Figura 32.28). Los pigmentos verde y rojo parecen haber divergido en el linaje de los primates hace aproximadamente 35 millones de años. Los mamíferos, como los perros y ratones, que divergieron de los primates en una etapa temprana, tienen sólo dos fotorreceptores en los conos, el azul y el verde. No son sensibles a la luz en zonas alejadas como la región del infrarrojo como lo somos nosotros, y ellos no discriminan tan bien los colores. Por el contrario, las aves como los pollos tienen un total de seis pigmentos: rodopsina, cuatro pigmentos en los conos y un pigmento visual pineal llamado *pinopsina*. Las aves tienen una gran percepción a los colores.

Segundo, los altos niveles de similitud entre los pigmentos verde y rojo ha hecho posible identificar los residuos aminoácido específicos que son responsables del ajuste espectral. Tres residuos (en posiciones 180, 227 y 285) son responsables de la mayoría de las diferencias entre los pigmentos verde y rojo. En el pigmento verde, estos residuos son alanina, fenilalanina y alanina respectivamente; en el pigmento rojo son serina, tirosina y treonina. En el pigmento rojo se ha añadido un grupo hidroxilo a cada aminoácido. El grupo hidroxilo puede interaccionar con el estado fotoexcitado del retinal y disminuye su energía, provocando un desplazamiento hacia la región del espectro de menor energía (rojo).

Redistribuciones en los genes de los pigmentos verde y rojo provocan la "ceguera a los colores"

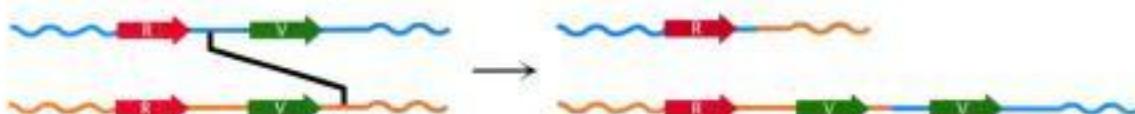
Los genes para los pigmentos verde y rojo están uno al lado del otro en el cromosoma X de los humanos. Estos genes son idénticos en su secuencia de nucleótidos en más de un 98%, incluyendo intrones y regiones que no se traducen, así como las regiones que codifican proteínas. Las regiones con similitudes tan altas son muy susceptibles a la recombinación homóloga desigual.

La recombinación puede tener lugar inter o intra regiones del gen transcritas (Figura 32.29). Si la recombinación ocurre entre regiones transcritas, los cromosomas producto diferirán en el número de genes de pigmentos que porten. Un cromosoma puede perder un gen y entonces no poseer, por ejemplo, el pigmento verde, otro cromosoma puede ganar un gen. Según esto, aproximadamente el 2% de los cromosomas humanos X portarán sólo un único gen del pigmento verde, 20% portarán dos, 50% tres, 20% cuatro y 5% portarán cinco o más. Una persona que no tiene el gen del pigmento verde tendrá problemas a la hora de distinguir el color rojo del verde, característica de la mayoría de las formas de ceguera a los colores. Aproximadamente el 5% de los varones presenta esta forma de ceguera a los colores. La recombinación puede tener lugar también dentro de las regiones de transcripción, dando lugar a genes que codifican híbridos de los fotorreceptores verde y rojo. El máximo de absorción de estos híbridos se sitúa entre los de los pig-

Recombinación homóloga

Intercambio de segmentos de DNA en posiciones equivalentes entre cromosomas con una similitud importante en la secuencia.

(A) Recombinación entre distintos genes



(B) Recombinación intragénica (dentro del mismo gen)

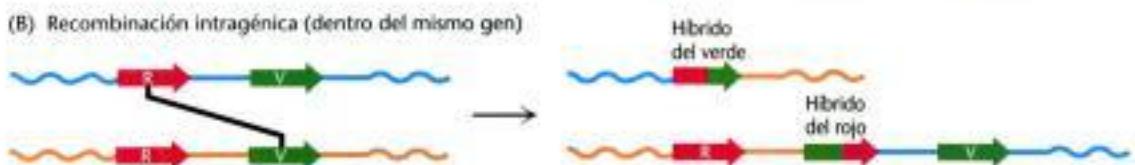


Figura 32.29 Formas de recombinación que provocan la ceguera a los colores. Redistribuciones durante la replicación del DNA pueden producir (A) la pérdida de los genes de los pigmentos visuales o (B) la formación de genes híbridos de los pigmentos que codifican fotorreceptores, con espectros de absorción anómalos. Debido a que los aminoácidos más importantes a la hora de determinar el espectro de absorción están localizados en la mitad correspondiente al extremo carboxilo de cada proteína fotorreceptora, la parte del gen que codifica esta región es la que afecta principalmente las características de los receptores híbridos. [Adaptado de J. Nathans. *Neuron* 24(1999): 299-312; con permiso de Cell Press.]

mentos verde y rojo. Una persona con esos genes híbridos, que también carece de genes funcionales de los pigmentos verde y rojo, tampoco discriminará bien los colores.

32.4 El oído depende de la detección rápida de estímulos mecánicos

El oído y el tacto están basados en la detección de los estímulos mecánicos. Aunque, a diferencia de los sentidos ya descritos, todavía no se han caracterizado las proteínas de estos dos sentidos, estudios anatómicos, fisiológicos y biofísicos han permitido dilucidar los procesos fundamentales. *Una clave fundamental en el mecanismo del oído, es su velocidad*. Oímos frecuencias entre 200 a 20 000 Hz (ciclos por segundo), correspondientes a tiempos de 5 a 0.05 ms. Además nuestra habilidad para localizar el punto donde se origina el sonido, una de las funciones más importantes del oído, depende de la habilidad para detectar el retraso temporal entre la llegada del sonido a una y otra oreja. Dadas la separación de nuestras orejas y la velocidad del sonido, debemos ser capaces de discriminar diferencias de 0,7 ms. De hecho, los humanos pueden localizar fuentes de sonido asociadas con retrasos temporales tan cortos como 0,02 ms. Esta resolución temporal tan alta implica que la audición debe emplear mecanismos directos de transducción que no dependen de segundos mensajeros. Se debe recordar que, en la visión, para la que la velocidad es también importante, el proceso de transducción de la señal tiene lugar en milisegundos.

Las células auditivas emplean un haz conectado de estereocilios para detectar movimientos muy pequeños.

Las ondas sonoras se detectan en la cóclea o caracol del oído interno. El **caracol** es un saco membranoso lleno de un fluido y está enrollado como la concha de un caracol. La detección inicial se realiza por unas neuronas especializadas en el interior del caracol, llamadas **células ciliadas** (Figura 32.30). El caracol contiene aproximadamente 16 000 células ciliadas y cada célula ciliada contiene un haz de forma hexagonal con 20 a 300 proyecciones ciliadas llamadas **estereocilios** (Figura 32.31). Estos estereocilios tienen un gradiente de longitud a través del haz. Cuando el so-

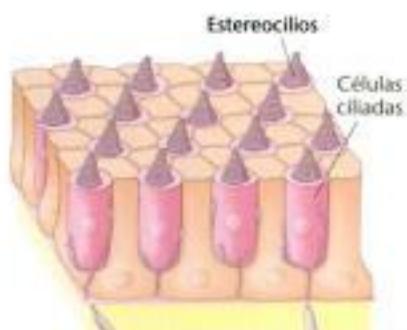


Figura 32.30 Las células ciliadas, las neuronas sensoriales cruciales para la audición. Estas neuronas especializadas están cubiertas con unas proyecciones peludas llamadas estereocilios que son responsables de detectar vibraciones muy sutiles. [Adaptada de A. J. Hudspeth. *Nature* 341(1989): 397-404.]



Figura 32.31 Micrografía electrónica de un haz ciliado. [Cortesía del Dr. A. Jacobs y del Dr. A. J. Hudspeth.]

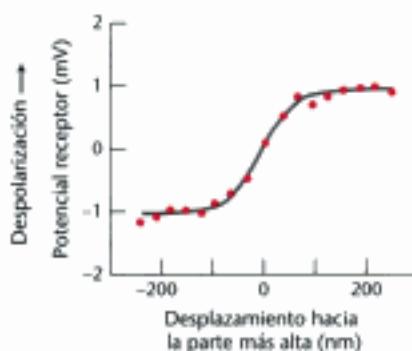
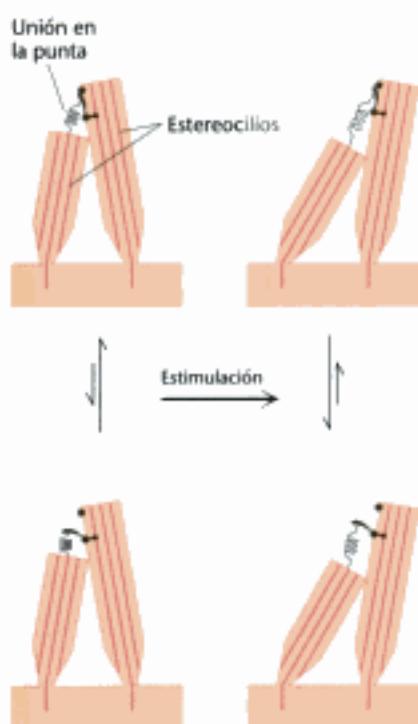


Figura 32.32 Micromanipulación de la célula ciliada. El movimiento hacia la parte más alta del haz despolariza la célula, como se mide con el microelectrodo. El movimiento hacia la parte más corta hiperpolariza la célula. El movimiento lateral no tiene efecto. [Adaptado de A. J. Hudspeth. *Nature* 341(1989): 397-404.]

nido llega al oído, se produce un desvío mecánico de este haz y se crea un cambio de potencial de membrana en la célula ciliada.

Experimentos de micromanipulación han demostrado directamente la relación que existe entre la estimulación mecánica y el potencial de membrana. Un desplazamiento hacia la dirección de la parte más alta del haz provoca la despolarización de la célula ciliada, mientras que un desplazamiento en la dirección opuesta, provoca la hiperpolarización (Figura 32.32). El movimiento perpendicular a la dirección en que se produce el gradiente de longitud, no provoca ningún cambio en el potencial de membrana. Es importante remarcar que *un desplazamiento del haz ciliado de sólo 3 Å (0.3 nm) provoca un cambio medible (y funcionalmente importante) del potencial de membrana*. Este movimiento de 0,003 grados correspondería a un movimiento de una pulgada (2,54 cm) de la cima del edificio Empire State.

Figura 32.33 Micrografía electrónica de las uniones en la punta. Las uniones en la punta entre dos células ciliadas se indican con una flecha. [Cortesía del Dr. A. Jacobs y del Dr. A. J. Hudspeth.]



¿Cómo crea el movimiento del haz ciliado un cambio en el potencial de membrana? La rápida respuesta, en el orden de microsegundos, sugiere que el movimiento del haz ciliado actúa directamente sobre un conducto iónico. Una observación importante es que los estereocilios adyacentes están unidos por filamentos individuales denominados *uniones en la punta* (Figura 32.33).

La presencia de estas uniones en la punta sugiere un modelo mecánico sencillo para la transducción en las células ciliadas (Figura 32.34). Las uniones en la punta están acopladas a conductos iónicos en los estereocilios, cuya apertura está regulada por choques mecánicos. En ausencia de estímulo, aproximadamente el 15% de estos conductos están abiertos. Cuando el haz se desplaza hacia su parte más alta, los estereocilios se deslizan uno sobre el otro y la tensión en la punta aumenta, provocando la apertura de conductos adicionales. El flujo de iones a través de los conductos ahora abiertos despolariza la membrana. Al contrario, si el desplazamiento se

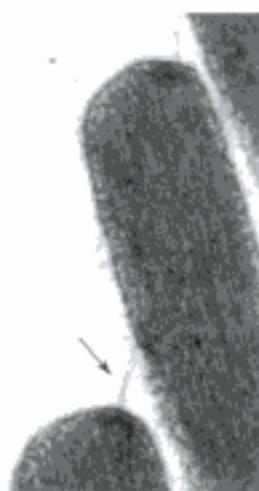


Figura 32.34 Modelo para la transducción en la célula ciliada. Cuando el haz ciliado se inclina hacia su parte más alta, la unión en la punta se estira y abre un conducto iónico. El movimiento en la dirección opuesta relaja la tensión en la unión en la punta, aumentando la probabilidad de que un conducto abierto se cierre. [Adaptado de A. J. Hudspeth. *Nature* 341(1989): 397-404.]

realiza en la dirección opuesta, la tensión en la unión en la punta disminuye, los conductos abiertos se cierran, y la membrana se hiperpolariza. Así, el movimiento mecánico del haz ciliado se convierte directamente en un flujo de corriente a través de la membrana de la célula ciliada.

Se han identificado conductos mecanosensibles en *Drosophila* y vertebrados

Se ha perseguido la búsqueda de conductos iónicos que responden a impulsos mecánicos en una gran variedad de organismos. *Drosophila* tiene unas cerdas sensoras que utiliza para detectar pequeñas corrientes de aire. Estas cerdas responden a los desplazamientos mecánicos de una forma muy similar a la que lo hacen las células ciliadas: el desplazamiento de una cerda en una dirección provoca una corriente transmembrana importante. Mutantes de la mosca que manifiestan movimiento descoordinado y torpeza se han examinado para observar sus respuestas electrofisiológicas al desplazamiento de sus cerdas sensoras. En un grupo de estas cepas mutantes, las corrientes transmembrana se habían reducido considerablemente. Se encontró que el gen mutado en estas cepas codificaba una proteína de 1619 aminoácidos, llamada NompC (del inglés “no mechanoreceptor potential”).

Los 469 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de NompC se parecen a una clase de proteínas que son conductos iónicos llamados conductos TRP (receptores de potenciales transitorios). Esta región incluye 6 presuntas hélices transmembrana con una región parecida a un poro entre las hélices quinta y sexta. El fragmento compuesto por los 1150 aminoácidos del extremo amino consiste casi exclusivamente de 29 *repeticiones de anquirina* (Figura 32.35). Las repeticiones de anquirina son motivos estructurales que consisten en un bucle en horquilla seguido de una hélice-giro-hélice. Es muy importante que, otras regiones proteicas con conjuntos de estos motivos repetidos uno a continuación del otro facilitan las interacciones proteína-proteína, lo que sugiere que estos conjuntos acoplan el movimiento de otras proteínas a la actividad del conducto NompC.

Recientemente, se ha identificado un fuerte candidato para, al menos, un componente del conducto mecanosensor relacionado con el oído. La proteína, TRPA1, es también, un miembro de la familia de conductos TRP. La secuencia de TRPA1 incluye también 17 repeticiones de anquirina. TRPA1 se expresa en células ciliadas, principalmente cerca de sus extremos. Basado en estos y otros estudios, parece muy probable que TRPA1 represente al menos un componente del conducto mecanosensor que es primordial para la audición. Están en marcha estudios adicionales que permitan confirmar y ampliar este importante descubrimiento.



Figura 32.35 Estructura de las repeticiones de anquirina. Se muestran cuatro repeticiones de anquirina, con una de ellas en rojo. Obsérvese el bucle en horquilla seguido por el motivo hélice-giro-hélice en la unidad de anquirina señalado en rojo. Los dominios de anquirina interactúan con otras proteínas principalmente a través de sus bucles. [Tomado de 1AWC.pdb.]

32.5 El tacto incluye la sensibilidad a la presión, a la temperatura y a otros factores

Como el gusto, el tacto es una combinación de sistemas sensoriales que se expresan en un órgano común, en este caso, la piel. La detección de la presión y de la temperatura son dos componentes claves. Parece que los conductos de Na^+ sensibles a la amilorida, homólogos a los del gusto, desempeñan un papel importante. Otros sistemas son los responsables de detectar estímulos dolorosos, como las altas temperaturas, los ácidos o ciertos reactivos químicos. Aunque nuestro conocimiento de este sistema sensorial no está tan avanzado como el de los otros sistemas ya descritos, trabajos recientes han demostrado una relación fascinante entre la sensación del dolor y del gusto, una relación bien conocida por cualquiera que haya ingerido comida picante.

Estudios sobre la capsaicina, el principio activo de las guindillas, revelan la existencia de un receptor sensible a las altas temperaturas y otros estímulos dolorosos

Nuestro sentido del tacto está íntimamente conectado con el de la sensación de dolor. Neuronas especializadas, denominadas *nociceptoras*, transmiten señales a los centros que procesan el dolor en la médula espinal y el cerebro en respuesta al estímulo de daño tisular. ¿Cuál es la base molecular para la sensación de dolor? Una pista sorprendente vino con la constatación de que la *capsaicina*, el compuesto químico responsable del sabor picante, activa los nociceptores.

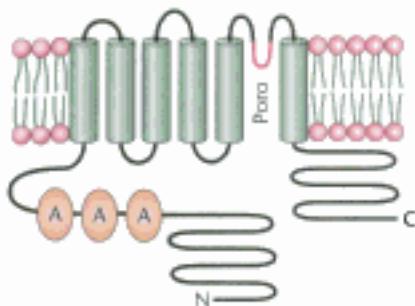
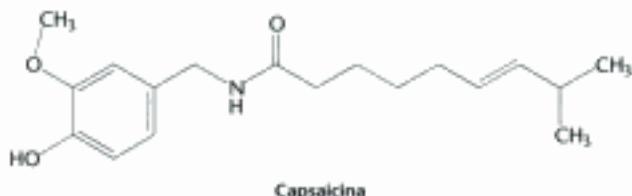


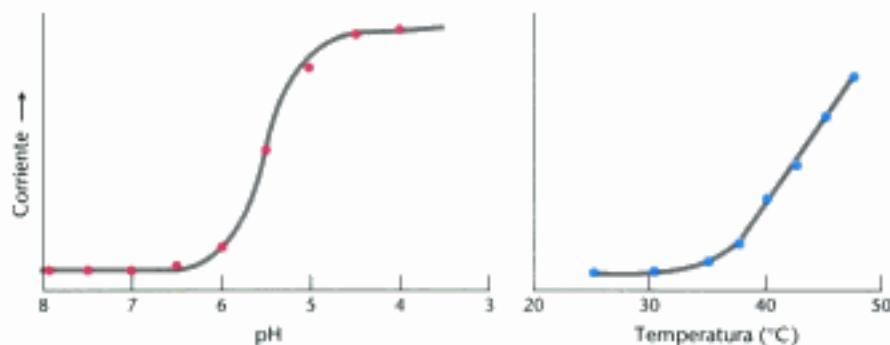
Figura 32.36 Topología en la membrana deducida para el receptor de la capsaicina (VR1). El lugar propuesto para el poro en la membrana se indica en rojo, y las tres repeticiones de anquirina (A) se indican en naranja. El receptor activo consta de cuatro de estas subunidades. [Adaptado de M. J. Caterina, M. A., Schumacher, M., Tominaga, T. A., Rosen, J. D., Levine, y D. Julius, *Nature* 389(1997): 816-824.]



Trabajos previos sugerían que la capsaicina puede actuar abriendo unos conductos que se expresan en los nociceptores. Así, una célula que exprese el receptor de la capsaicina captaría calcio al ser tratada con esa molécula. Este descubrimiento llevó al aislamiento del receptor de la capsaicina mediante el uso de cDNA de células que expresaban este receptor. Estas células se habían identificado por su fluorescencia cuando se cargaban con un compuesto fluorescente sensible al calcio, el FURA-2 y cuando se trataban con capsaicina u otras moléculas relacionadas. Las células que expresaban el receptor de capsaicina, que se denomina VR1 (de *vanilloid receptor 1*, en inglés), responden a concentraciones de capsaicina inferiores a 1 μ M. La secuencia deducida para los 838 residuos de VR1 reveló que se trataba de un miembro de la familia de conductos TRP (Figura 32.36). La región del extremo amino de VR1 incluye tres repeticiones de anquirina.

Las corrientes a través de VR1 también pueden inducirse por temperaturas superiores a 40 °C y por exposición a ácidos diluidos, con un punto medio de activación a pH 5.4 (Figura 32.37). Estas regiones de temperatura y acidez están asociadas con la infección y el daño celular. Las respuestas a la capsaicina, temperatura y acidez no son independientes. Por ejemplo, la respuesta al calor es mayor a pH más bajo. Así, VR1 *actúa integrando muchos estímulos nocivos*. Nosotros experimentamos estas respuestas en forma de dolor y actuamos para evitar las condiciones potencialmente destructivas que provocan la sensación desagradable. El ratón que no expresa VR1 confirma esta hipótesis. A estos ratones no les importa que la comida contenga altas concentraciones de capsaicina y muestran, por supuesto, una respuesta menor que la de los ratones control a niveles nocivos de calor. Las plantas como las de las guindillas han ganado, presumiblemente, la capacidad de sintetizar capsaicina y otros compuestos picantes para protegerse de ser consumidos por los mamíferos. Las aves, que desempeñan el papel beneficioso de esparcir las semillas de estas plantas a otros territorios, no parecen responder a la capsaicina.

Figura 32.37 Respuesta del receptor de la capsaicina al pH y a la temperatura. Situaciones potencialmente nocivas pueden ser detectadas gracias a la capacidad de este receptor para responder al ácido y al incremento de la temperatura. [Adaptado de M., Tominaga, M. J., Caterina, A. B., Malmberg, T. A., Rosen, H., Gilbert, K., Skinner, B. E., Raumann, A. L. Basbaum, y D. Julius, *Neuron* 21(1998): 531-543.]



Hidden page

Hidden page

- Benos, D. J. y Stanton, B. A., 1999. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol. (Lond.)* 520(part 3):631–644.
- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. y Margolskee, R. F., 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357:563–569.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrasekhar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. y Zuker, C. S., 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381–390.

Visión

- Stryer, L., 1988. Molecular basis of visual excitation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53:283–294.
- Wald, G., 1968. The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219:800–807.
- Ames, J. B., Dizhoor, A. M., Ikura, M., Palczewski, K. y Stryer, L., 1999. Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 274:19329–19337.
- Nathans, J., 1994. In the eye of the beholder: Visual pigments and inherited variation in human vision. *Cell* 78:357–360.
- Nathans, J., 1999. The evolution and physiology of human color vision: Insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24:299–312.
- Palczewski, K., Kimura, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., LeTrong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. y Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739–745.

Problemas

1. *De ratones y ratas.* Como se indicó en la página 924, uno de los primeros receptores de sustancias olorosas que se emparejó con su ligando fue un receptor en rata que presentaba la mejor respuesta al octanal. La secuencia del receptor correspondiente en ratones difiere del de rata en 15 posiciones. Sorprendentemente, se encontró que el receptor del ratón respondía mejor al heptanal que al octanal. Se demostró que la sustitución en la posición 206 de la isoleucina presente en el ratón por la valina presente en el receptor de rata, era importante a la hora de establecer la especificidad por el heptanal. Proponer una explicación.

2. *El olfato en los gusanos.* A diferencia de las neuronas olfativas de los mamíferos ya discutidas en este capítulo, las del nematodo *C. elegans* expresan múltiples receptores del olfato. En particular, una neurona (llamada AWA) expresa receptores para compuestos hacia los que el nematodo se siente atraído, mientras que una neurona distinta (llamada AWB) expresa receptores para compuestos que el nematodo evita. Suponer que se genera un nematodo transgénico de forma que uno de los receptores para la sustancia atrayente se expresa en AWB en lugar de en AWA. ¿Qué comportamiento podría esperarse en presencia de dicha sustancia atrayente?

3. *Emparejamiento de sustancias olorosas.* Una mezcla de dos de los compuestos ilustrados en la Figura 32.6 se aplica a una sección del epitelio olfativo. Sólo se activan los receptores 3, 5, 9, 12 y 13. Identificar los posibles compuestos que integran la mezcla.

4. *Respuesta temporal.* Comparar los aspectos del gusto (amargo, dulce, salado, agrio) en función de su potencial para una rápida resolución temporal.

5. *Dos orejas.* Nuestra capacidad para detectar la dirección de la que procede el sonido se basa parcialmente en la diferencia de tiempo a

- Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K. y Stenkamp, R., 2003. The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:375–397.

Oído

- Hudspeth, A. J., 1997. How hearing happens. *Neuron* 19:947–950.
- Pickles, J. O. y Corey, D. P., 1992. Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 15:254–259.
- Walker, R. G., Willingham, A. T. y Zuker, C. S., 2000. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287:2229–2234.
- Hudspeth, A. J., Choe, Y., Mehta, A. D. y Martin, P., 2000. Putting ion channels to work: Mechanoelectrical transduction, adaptation, and amplification by hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:11765–11772.

Tacto y percepción del dolor

- Franco-Obregón, A. y Clapham, D. E., 1998. Touch channels sense blood pressure. *Neuron* 21:1224–1226.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tomlinson, M., Rosen, T. A., Levine, J. B. y Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- Tomlinson, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. y Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.
- Caterina, M. J. y Julius, D., 1999. Sense and specificity: A molecular identity for nociceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:525–530.
- Clapham, D. E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.

la que llega el sonido a los dos oídos. Dada la velocidad de la luz (350 metros/segundo) y la separación entre nuestros pabellones auditivos (0,15 metros), ¿con cuánto tiempo de diferencia llegará el sonido a los dos oídos? ¿Cómo es este tiempo en relación a la resolución temporal del sistema auditivo en humanos? ¿Sería capaz de esa resolución temporal un sistema que utilizara receptores 7TM y proteínas G?

6. *Mutantes constitutivos.* ¿Qué efecto se puede esperar en relación con el sistema auditivo, para un mutante en el que la adenilato ciclase fuera siempre totalmente activa? ¿Qué efecto mostraría sobre el sistema visual un mutante en el que la guanilato ciclase fuera siempre activa?

7. *La selección de la botella.* Un método ampliamente empleado para investigar cuantitativamente el comportamiento de los roedores en relación con el gusto es el ensayo de la selección de la botella. Se coloca un animal en una jaula con dos botellas de agua, una de las cuales contiene una sustancia con cierto sabor. Tras un período de tiempo fijo (24–48 horas) se mide la cantidad de agua que queda en cada botella. Suponer que queda menos agua en aquella botella que contenía el saborizante. ¿Sospecharía que éste se trata de un compuesto dulce o salado?

8. *Es mejor ser amargo.* Algunas plantas no tóxicas tienen un sabor muy amargo. Sugerir una o más explicaciones.

9. *De hombres y ratones.* En los humanos, el sabor umami lo provocan sólo el glutamato y el aspartato. Por el contrario, los ratones responden a muchos más aminoácidos. Diseñar un experimento que permita comprobar cuál de las subunidades (T1R1 o T1R3) determina la especificidad de esta respuesta. Suponer que todas las líneas deseadas de ratones se pueden producir con facilidad.

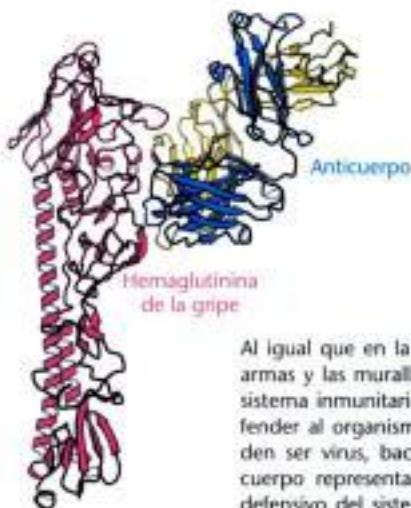
Problema de integración del capítulo

10. *Energía e información.* La transmisión de la información sensorial requiere gasto energético. Para cada sistema sensorial (olfato, gusto, visión, oído y tacto), identifica los mecanismos que aportan energía y que permiten la transmisión de la información sensorial.

Problema sobre el mecanismo

11. *Formación de la base de Schiff.* Proponer un mecanismo para la reacción entre la opsina y el 11-cis-retinal.

El sistema inmunitario



Al igual que en la Edad Media los defensores utilizaban sus armas y las murallas del castillo para defender su ciudad, el sistema inmunitario está luchando constantemente para defender al organismo frente a invasores foráneos como pueden ser virus, bacterias y parásitos. Las moléculas de anticuerpo representan un elemento clave dentro del arsenal defensivo del sistema inmunitario. Por ejemplo, anticuerpos específicos se pueden unir a moléculas de la superficie de los virus y evitar que infecten células. En la figura superior derecha, un anticuerpo se une a una subunidad de hemagglutinina procedente de la superficie del virus de la gripe. [[Izquierda] La colección Granger.]

Estamos constantemente expuestos a una increíble variedad de bacterias, virus y parásitos, muchos de los cuales aflorarían en nuestras células o en nuestros fluidos extracelulares si no fuese por nuestro sistema inmunitario. ¿Cómo nos protege el sistema inmunitario? El cuerpo humano cuenta con dos líneas de defensa: un *sistema inmunitario innato* que responde rápidamente ante características que están presentes en multitud de patógenos y un *sistema inmunitario adaptativo*, que responde ante las características específicas que están presentes únicamente en un patógeno concreto. Ambos sistemas inmunitarios, el innato y el adaptativo, identifican primero las características de los organismos que provocan enfermedades y, posteriormente, trabajan para eliminar o neutralizar esos organismos. Este capítulo se centra en los mecanismos de identificación de patógenos.

A la hora de identificar los patógenos, el sistema inmunitario se debe enfrentar a dos enormes desafíos: (1) producir un sistema de receptores lo suficientemente variado como para reconocer la diversidad de patógenos potenciales y (2) distinguir entre los invasores causantes de enfermedades y el propio cuerpo y sus productos (es decir, reconocer lo propio y lo foráneo). Para superar estos retos, el sistema inmunitario innato ha desarrollado a lo largo de la evolución la capacidad para reconocer elementos estructurales, como pueden ser glicolípidos específicos o variantes de los ácidos nucleicos, que se encuentran muy conservados en los patógenos pero de los que carece el organismo hospedador. Sin embargo, el repertorio de este tipo de elementos es limitado y, por tanto, algunos patógenos cuentan con estrategias para no ser detectados. El sistema inmunitario adaptativo posee la extraordinaria capacidad para producir más de 10^8 anticuerpos distintos y más de 10^{12} receptores de las células T (TCRs, "T-cell receptors"), cada uno de los cuales presenta una superficie diferente con facultad para unirse

Contenido

- 33.1 Los anticuerpos poseen dos unidades distintas: una que se une al antígeno y otra efectora
- 33.2 El plegamiento de inmunoglobulina está formado por un armazón con estructura de sándwich beta que contiene bucles hipervariables
- 33.3 Los anticuerpos se unen a moléculas específicas por medio de sus bucles hipervariables
- 33.4 La diversidad surge por los reordenamientos de los genes
- 33.5 Las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad exponen antígenos peptídicos en la superficie de las células para que los receptores de las células T los reconozcan
- 33.6 Las respuestas inmunitarias frente a antígenos propios se anulan

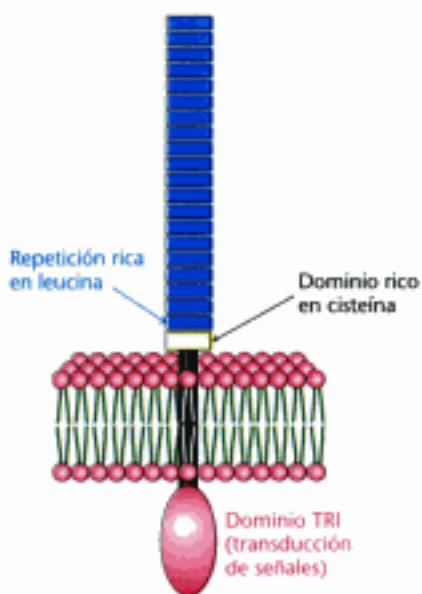


Figura 33.1 Receptor de tipo Toll. Cada receptor está formado por un conjunto de al menos 18 secuencias ricas en leucina repetidas, seguido de un dominio rico en cisteína, una única hélice transmembrana y un dominio TIR (Toll-interleucina 1 receptor) que interviene en la transducción de señales.

de forma específica a una estructura procedente de un organismo foráneo. Sin embargo, a la hora de producir esta amplia gama de moléculas defensivas existe la posibilidad de que el sistema inmunitario adaptativo origine anticuerpos y células T que reconozcan y ataquen a las células o moléculas que normalmente se encuentran en nuestros organismos, una situación que puede dar lugar a enfermedades autoinmunitarias.

Este capítulo abordará estos desafíos, haciendo hincapié primero en la estructura de las proteínas que reconocen organismos foráneos y, posteriormente, en los mecanismos que nos protegen de un patógeno específico, una vez que ha sido reconocido. El capítulo examinará de cerca la construcción modular de las proteínas del sistema inmunitario, identificando los motivos estructurales y reflexionando sobre la extraordinaria diversidad que puede surgir de la construcción modular.

Desde el punto de vista evolutivo, la inmunidad innata es un mecanismo de defensa ancestral

Desde el punto de vista evolutivo, la inmunidad innata es un mecanismo de defensa ancestral encontrado, al menos en alguna de sus formas, en todas las plantas y animales pluricelulares. Los genes que codifican sus moléculas fundamentales se expresan sin modificaciones sustanciales, a diferencia de los genes que codifican los componentes fundamentales del sistema inmunitario adaptativo, que experimentan reordenaciones significativas. A lo largo de muchos millones de años de evolución, las proteínas expresadas por estos genes han adquirido la capacidad para reconocer las características específicas presentes en la mayoría de los patógenos sin que por ello respondan ante los materiales que se encuentran normalmente en el hospedador.

Los receptores más importantes y más conocidos del sistema inmunitario innato son los *receptores de tipo Toll* (*TLR*, “*Toll-like receptors*”). En los seres humanos se han identificado al menos 10 TLR aunque *C. elegans*, por ejemplo, tan solo presenta un único receptor de este tipo. El nombre “de tipo Toll” hace referencia a un receptor denominado Toll que está codificado en el genoma de *Drosophila*; Toll fue identificado por primera vez durante un sondeo encaminado a descubrir los genes importantes para el desarrollo de *Drosophila* y después se descubrió que en etapas posteriores del desarrollo también desempeñaba un papel crucial en el sistema inmunitario innato. Los TLR poseen una estructura común (Figura 33.1). Cada receptor está formado por un gran dominio, compuesto fundamentalmente por secuencias de aminoácidos repetidas denominadas repeticiones ricas en leucina (LRR, “*leucine-rich repeats*”) porque cada repetición contiene seis residuos que, generalmente, son leucina. Los TLR humanos tienen entre 18 y 27 repeticiones. A estas repeticiones les sigue una secuencia que forma una única hélice transmembrana y, a continuación, un dominio de señalización que se encuentra con frecuencia tanto en los TLR como en un pequeño número de otros receptores. Este dominio de señalización no es una proteína quinasa pero sirve de punto de anclaje para otras proteínas. Una proteína que se acopla a TLR inicia una vía de transducción de señales que, en última instancia, provoca la activación de factores de transcripción específicos. La mayor parte de los TLR se expresan en la membrana celular para detectar patógenos extracelulares como bacterias y hongos. Otros TLR se localizan en las membranas de compartimentos internos para detectar patógenos intracelulares como virus y algunas bacterias.

Cada TLR va dirigido hacia una característica molecular específica, denominada frecuentemente *patrón molecular asociado a patógenos* (PAMP “*pathogen-associated molecular pattern*”) que se encuentra, principalmente, en los organismos invasores. Un PAMP particularmente importante es el lipopolisacárido (LPS), un tipo de glicolípido específico que se encuentra en las paredes celulares de las bacterias gramnegativas como *E. coli* (Figura 33.2). El LPS se construye en torno a un lípido especializado, denominado *Lípido A*, que contiene cuatro cadenas de ácido graso y a las que se unen dos residuos de *N*-acetilglucosamina. El lípido A se conecta a una cadena de polisacárido que está formada por una estructura nuclear y por una región más va-

Figura 33.2 Estructura del lipopolisacárido. El lipopolisacárido, un potente activador del sistema inmunitario innato, se encuentra sobre la superficie de las bacterias gramnegativas. La estructura se organiza en torno al lípido A, un lípido especializado que contiene cuatro cadenas acílicas unidas a dos residuos de *N*-acetilglucosamina. El lípido A se une a una cadena de polisacárido formada por un núcleo y por una región más variable denominada cadena específica de O.



Hidden page



Figura 33.4 Producción de inmunoglobulinas. Micrografía electrónica de una célula plasmática que muestra el elevado grado de desarrollo que necesita el retículo endoplásmico rugoso para la secreción de anticuerpos. [Cortesía de Lynne Mercer.]

cuerpos (*inmunoglobulinas*) funcionan como elementos de reconocimiento que se unen a moléculas foráneas y sirven como indicadores de que se ha producido una invasión externa (Figura 33.4). Los anticuerpos son secretados por *células plasmáticas* derivadas de los *linfocitos B* (*las células B*). Una macromolécula foránea que se une de forma selectiva a un anticuerpo se denomina *antígeno*. En un contexto fisiológico, si la unión de la molécula foránea desencadena una respuesta inmunitaria, esa molécula se llama *inmunógeno*. La afinidad específica de un anticuerpo no está dirigida hacia la totalidad del antígeno macromolecular sino hacia una zona concreta del antígeno que se llama *epítopo* o *determinante antigenético*.

En la *respuesta inmunitaria celular*, las células denominadas *linfocitos T citotóxicos* (también conocidas como *células T asesinas*) matan a las células que han sido invadidas por un patógeno. Como los patógenos intracelulares no dejan marcas sobre el exterior de las células infectadas, los vertebrados han desarrollado un mecanismo para marcar el exterior de las células con una muestra de lo que contienen en su interior, tanto propio como ajeno. Algunas de las proteínas internas se fragmentan en péptidos que, posteriormente, se unen a un complejo de proteínas integrales de la membrana que recibe el nombre de *complejo principal de histocompatibilidad* (*MHC* "major histocompatibility complex"). Las células T escanean continuamente los péptidos unidos (*pMHCs*) para encontrar y matar a las células que exhiban motivos foráneos sobre sus superficies. Otro tipo de células T denominadas *linfocitos T ayudantes* intervienen tanto en la respuesta inmunitaria humoral como en la respuesta inmunitaria celular ya que estimulan la diferenciación y proliferación de las células B y T citotóxicas apropiadas. La respuesta inmunitaria celular está mediada por receptores específicos que se expresan sobre la superficie de las células T.

La sorprendente capacidad del sistema inmunitario para adaptarse a un número prácticamente ilimitado de patógenos potenciales requiere de un poderoso sistema capaz de transformar las células inmunitarias y las moléculas presentes en nuestros sistemas en respuesta a la presencia de patógenos. *Este sistema de adaptación funciona según los principios de la evolución, ya que incluye una reproducción con variaciones seguida de una selección de los miembros mejor adaptados de una población.*

Si el genoma humano contiene, según las últimas estimaciones, tan solo unos 25 000 genes, ¿cómo puede el sistema inmunitario generar más de 10^8 anticuerpos proteicos distintos y 10^{12} receptores de las células T? La respuesta radica en un novedoso mecanismo que genera una gama de genes muy variada a partir de un conjunto limitado de piezas de construcción genéticas. Empalmando de forma combinatoria fragmentos de distintas regiones del DNA se producen multitud de genes que codifican proteínas diferentes y que no están presentes en el genoma. Posteriormente, un riguroso proceso de selección sólo deja que proliferen aquellas células que sintetizan proteínas que serán de utilidad durante la respuesta inmunitaria. La posterior reproducción de estas células sin recombinaciones adicionales permite enriquecer la población celular con miembros que expresan un determinado tipo de proteína.

El proceso de selección resulta crucial para el desarrollo de la respuesta inmunitaria, porque determina qué tipos de células se van a reproducir. El proceso consta de varias etapas. Durante las etapas iniciales del desarrollo de una respuesta inmunitaria, las células que expresan moléculas que se unen fuertemente a moléculas propias se destruyen o se silencian, mientras que las células que expresan moléculas que no se unen fuertemente a moléculas propias y que tienen la capacidad para unirse fuertemente a moléculas extrañas se preservan. Más adelante, la aparición de un invasor inmunogénico estimulará la reproducción de aquellas células que expresan anticuerpos o receptores de las células T que se unen específicamente a los elementos de ese patógeno; en términos evolutivos, se seleccionan esas células. Por tanto, la respuesta inmunitaria se basa en la selección de aquellas células que expresan moléculas que son efectivas de manera específica contra un determinado invasor; la respuesta evoluciona desde una población con una amplia gama de especificidades hasta una colección de células y moléculas más especializadas, preparadas convenientemente para defender al hospedador cuando se encuentre ante ese desafío concreto.

Los anticuerpos y los receptores de las células T no son sólo el resultado de la diversidad genética y de la recombinación, ya que los anticuerpos también presentan gran diversidad de estructuras. Los anticuerpos necesitan muchas soluciones estructurales

diferentes para unirse a un gran número de antígenos distintos, cada uno con una forma diferente. Por el contrario, los receptores de las células T no son muy variados desde el punto de vista estructural porque han coevolucionado con el MHC. La forma en que los receptores de las células T se acoplan a los péptidos unidos a MHC es similar para todas las estructuras. Como consecuencia de esta coevolución, cada receptor de las células T presenta una reactividad inherente para cada MHC. La coevolución asegura que todos los receptores de las células T pueden escanear todos los complejos péptido-MHC de todos los tejidos. La diversidad genética de los 10^{12} receptores de las células T distintos se concentra en un conjunto de residuos muy diverso, localizado en el centro de la cavidad que presentan los MHC. Esta diversidad localizada permite que los receptores de las células T reconozcan la multitud de péptidos foráneos distintos que se encuentran unidos al MHC. Los receptores de las células T deben inspeccionar muchos complejos MHC-péptido distintos y pasar de uno a otro de forma rápida. Por tanto, la afinidad de la unión entre los receptores de las células T y el MHC es menor que la afinidad de la unión entre el anticuerpo y el antígeno.

33.1 Los anticuerpos poseen dos unidades distintas: una que se une al antígeno y otra efectora

Los anticuerpos son los principales protagonistas moleculares de la respuesta inmunitaria, y por tanto, los estudiaremos en primer lugar. Una buena forma de abordar el estudio de proteínas de gran tamaño, como los anticuerpos, es dividir la proteína en fragmentos que conserven la actividad. En 1959, Rodney Porter demostró que la *inmunoglobulina G* (*IgG*), el principal anticuerpo del suero, se puede romper en tres fragmentos de 50 kd mediante proteólisis parcial con papaina. Dos de estos fragmentos se unen al antígeno. Son los llamados F_{ab} (F hace referencia a fragmento y ab a que se unen al antígeno). El otro fragmento, denominado F_c porque cristaliza fácilmente, no se une al antígeno pero tiene otras funciones biológicas importantes, entre las que se incluyen la intermediación en el tipo de respuestas que reciben el nombre de *funciones efectoras*. Estas funciones incluyen el inicio de la *cascada del complemento*, un proceso que provoca la lisis de las células diana. Aunque estas funciones efectoras son cruciales para el funcionamiento del sistema inmunitario, no se tratarán en este libro con más detalle.

¿Qué relación existe entre estos fragmentos y la estructura tridimensional completa de las moléculas de IgG? La inmunoglobulina G está compuesta por dos tipos de cadenas polipeptídicas, una *cadena ligera* (L) de 25 kd y una *cadena pesada* (H) de 50 kd (Figura 33.5). La organización de las subunidades es L_2H_2 . Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un puente disulfuro, y las cadenas H se unen entre sí mediante, al menos, un puente disulfuro. El estudio de las secuencias de aminoácidos y de las estructuras tridimensionales de las moléculas de IgG pone de manifiesto que cada cadena L consta de dos dominios homólogos que reciben el nombre de *dominios de inmunoglobulina* y que se describirán con detalle en la Sección 33.2.

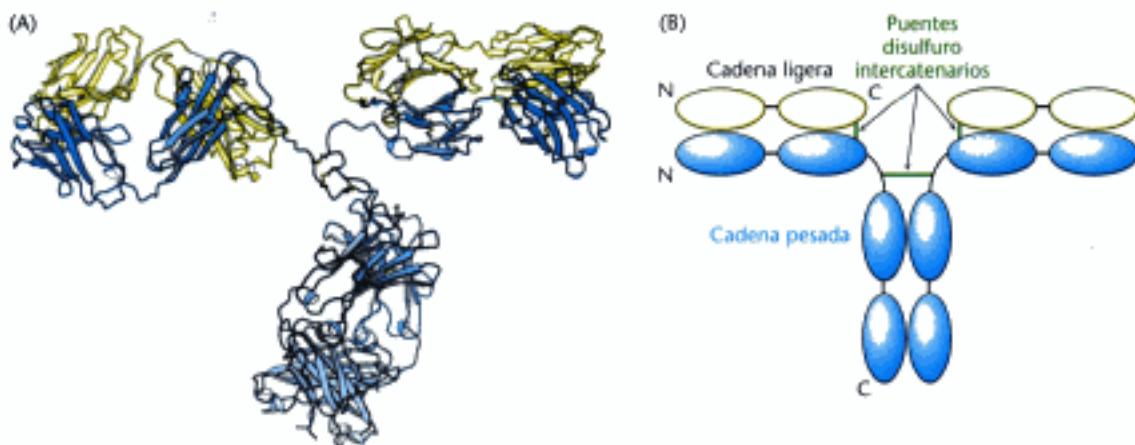


Figura 33.5 Estructura de la inmunoglobulina G. (A) Estructura tridimensional de una molécula de IgG donde se muestran las cadenas ligeras en amarillo y las cadenas pesadas en azul. (B) Representación esquemática de una molécula de IgG en la que se indican las posiciones de los puentes disulfuro intercatenarios. Abreviaturas: N, extremo amino; C, extremo carboxilo. [Tomado de 1IGT.pdb.]

TABLA 33.1 Propiedades de los tipos de inmunoglobulina

Tipo	Concentración en suero (mg ml ⁻¹)	Masa (kd)	Coeficiente(s) de sedimentación	Cadenas ligeras	Cadenas pesadas	Organización de las cadenas
IgG	12	150	7	κ o λ	γ	$\kappa_2\gamma_2$ o $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180–500	7, 10, 13	κ o λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ o $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	18–20	κ o λ	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ o $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	7	κ o λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ o $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,001	200	8	κ o λ	ϵ	$\kappa_2\epsilon_2$ o $\lambda_2\epsilon_2$

Nota: $n = 1, 2$ ó 3 . Los oligómeros de IgM e IgA también contienen cadenas J que conectan moléculas de inmunoglobulina. Cuando se secreta, la IgA presenta un componente adicional.

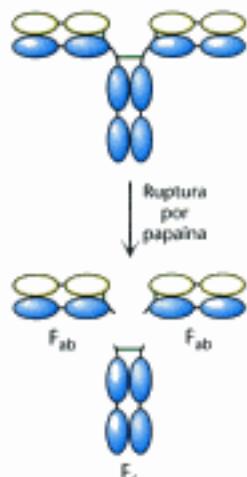


Figura 33.6 Proteólisis de la inmunoglobulina G. Al tratar moléculas intactas de IgG con la proteasa papaina se obtienen tres fragmentos de gran tamaño: dos fragmentos F_{ab} que conservan la capacidad para unirse al antígeno y un fragmento F_c que no.

Cada cadena H contiene cuatro dominios de inmunoglobulina. En conjunto, la molécula adopta una conformación que se parece a la letra Y, en la cual, el tallo, que se corresponde con el fragmento F_c obtenido por el tratamiento con papaina, está formado por los dos dominios de inmunoglobulina situados en los extremos carboxilo de cada una de las cadenas H y los dos brazos de la Y, que se corresponden con los dos fragmentos F_{ab} , están formados por los dos dominios amino terminales de cada cadena H y los dos dominios amino terminales de cada cadena L. Las conexiones entre el tallo y los dos brazos están formadas por regiones polipeptídicas extendidas pertenecientes a las cadenas H y son bastante flexibles.

La papaina rompe las cadenas H por el lado carboxilo terminal del puente disulfuro que conecta cada cadena L con la cadena H (Figura 33.6). Por tanto, cada F_{ab} está formado por una cadena L entera y la mitad amino terminal de una cadena H, mientras que F_c está formado por las mitades carboxilo terminales de ambas cadenas H. Cada F_{ab} contiene un único lugar de unión a antígenos. Como una molécula de IgG intacta presenta dos componentes F_{ab} y por tanto, posee dos centros de unión, puede entrecruzar múltiples antígenos (Figura 33.7). Y no sólo eso, F_c y las dos unidades F_{ab} de la IgG intacta están conectadas mediante regiones polipeptídicas flexibles que permiten que el ángulo que forman las dos unidades F_{ab} entre sí pueda oscilar fácilmente y adoptar valores comprendidos en un amplio margen (Figura 33.8). Este tipo de movilidad, denominada *flexibilidad de los segmentos*, puede aumentar las posibilidades de formación de un complejo antígeno-anticuerpo, ya que permite que ambos centros de unión de un anticuerpo se unan a un único antígeno que posea múltiples lugares de unión, como puede ser una cubierta vírica formada por monómeros idénticos repetidos o la superficie de una célula bacteriana. Los centros de unión localizados en los extremos de las unidades F_{ab} no tienen más que moverse hasta acomodarse a la distancia que separa dos determinantes específicos de un antígeno.

La inmunoglobulina G es el anticuerpo que se encuentra en mayor concentración en el suero, pero también existen otros tipos de inmunoglobulina (Tabla 33.1). Cada tipo presenta una cadena L (κ o λ) y una cadena H distinta (Figura 33.9). Las cadenas pesadas de la IgG se llaman cadenas γ , mientras que las de las inmunoglobuli-

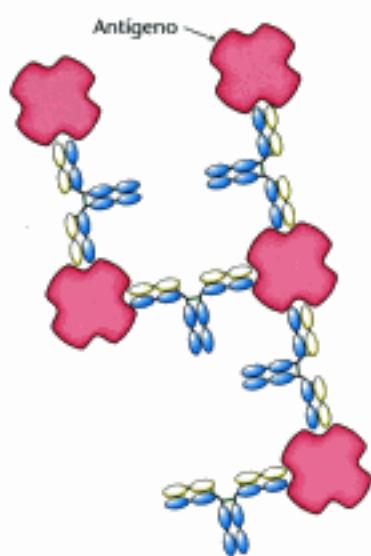


Figura 33.7 Entrecruzamiento de antígenos. Como las moléculas de IgG contienen dos lugares de unión al antígeno, los anticuerpos pueden entrecruzar antígenos polivalentes como las superficies víricas.

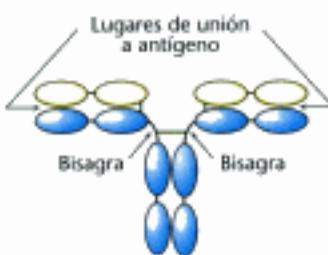
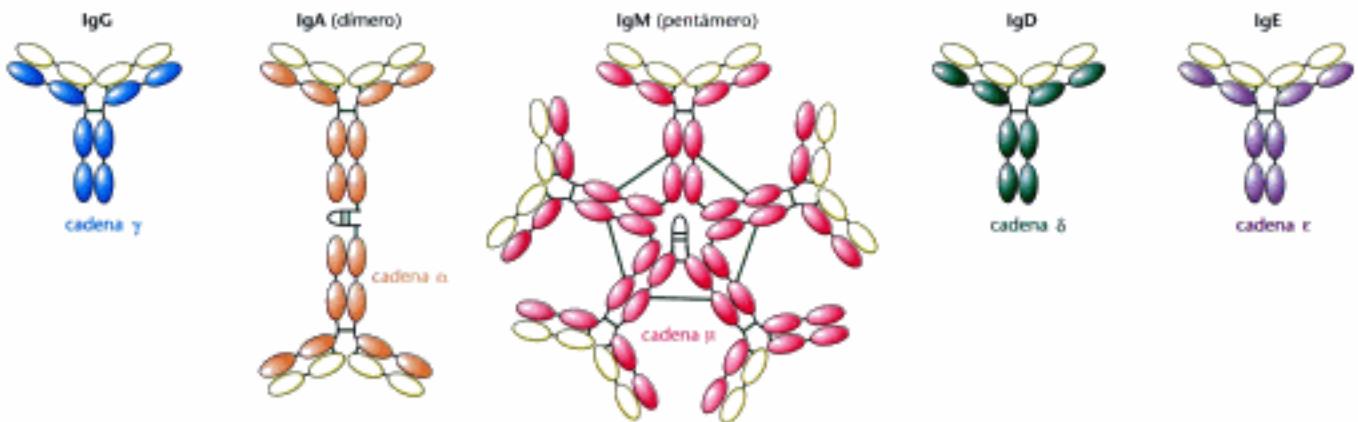


Figura 33.8 Flexibilidad de los segmentos. Las conexiones entre las regiones F_{ab} y F_c de una molécula de IgG son flexibles, permitiendo que los dos lugares de unión a los antígenos adopten toda una gama de orientaciones entre sí. Esta flexibilidad permite que se establezcan interacciones efectivas con un antígeno polivalente sin necesidad de que los epitopos del antígeno mantengan un espaciamiento preciso.



nas A, M, D y E se llaman α , μ , δ , y ϵ , respectivamente. La *inmunoglobulina M* (IgM) es el primer tipo de anticuerpo que aparece en el suero tras la exposición a un antígeno. La presencia de 10 centros de unión permite que IgM se una con especial intensidad a antígenos que contengan múltiples epitopos idénticos. La fuerza de una interacción en la que intervienen multitud de interacciones de unión independientes entre sus componentes se denomina *avidez* en vez de afinidad, término que hace referencia a la fuerza de unión correspondiente a un único centro de unión.

La *inmunoglobulina A* (IgA) es el principal tipo de anticuerpo en las secreciones externas, como pueden ser la saliva, lágrimas, mucosa de los bronquios o mucosa del intestino. Por tanto, IgA actúa como una primera línea de defensa frente a antígenos bacterianos y víricos. Todavía no se conoce la función de la *inmunoglobulina D* (IgD). La *inmunoglobulina E* (IgE) es importante a la hora de conferir protección frente a parásitos, pero la IgE también interviene en las reacciones alérgicas. Los complejos IgE-antígeno forman entrecruzamientos con los receptores localizados en la superficie de los mastocitos y desencadenan una cascada que provoca la liberación de gránulos que contienen moléculas farmacológicamente activas. La histamina, uno de los agentes liberados, provoca la contracción del músculo liso y estimula la secreción de moco.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de diversos anticuerpos IgG humanos o de ratón indica que la mitad carboxilo terminal de las cadenas L y las tres cuartas partes del extremo carboxilo de las cadenas H son muy parecidas en todos los anticuerpos. Y lo que es más importante, el dominio amino terminal de cada cadena es más variable e incluye, en cada una de las cadenas, tres segmentos de entre 7 y 12 aminoácidos que son hipervariables, tal y como se muestra en la Figura 33.10 para la cadena H. Por tanto, nos referiremos al dominio de inmunoglobulina

Figura 33.9 Tipos de inmunoglobulina. Cada uno de los cinco tipos de inmunoglobulina tiene la misma cadena ligera (mostrada en amarillo) asociada a una cadena pesada distinta (γ , α , μ , δ o ϵ). Los puentes disulfuro se indican mediante líneas de color verde. El dímero de IgA y el pentámero de IgM tienen, además de las cadenas ligeras y pesadas, una pequeña cadena polipeptídica.

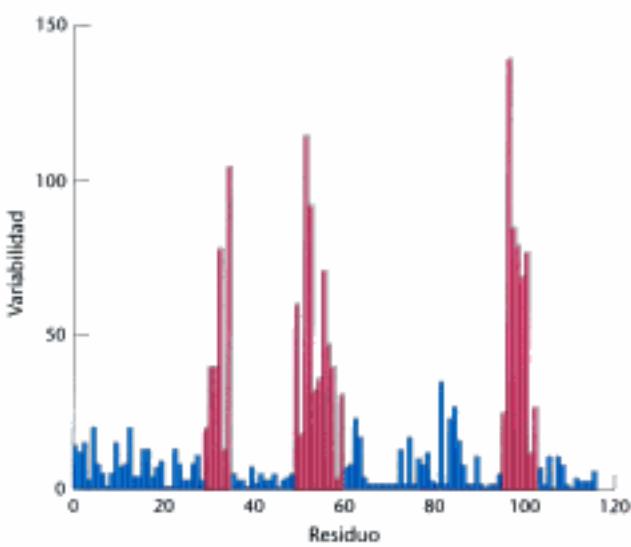


Figura 33.10 Diversidad en la secuencia de la inmunoglobulina. Representación de la variabilidad de la secuencia en función de la posición del residuo en la secuencia del dominio de inmunoglobulina del extremo amino de la cadena H de moléculas de IgG humana. Tres regiones (en rojo) muestran niveles de variabilidad extraordinariamente elevados. Estas regiones hipervariables corresponden a tres bucles en la estructura de los dominios de inmunoglobulina. [Según R. A. Goldsby, T. J. Kindt y B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4^a Edición. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 91.]

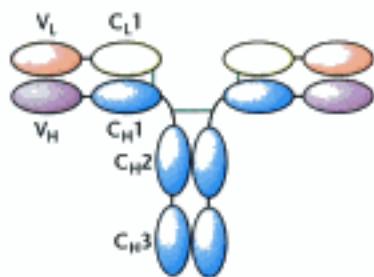


Figura 33.11 Regiones constantes y variables. Cada cadena L y H contiene un dominio de inmunoglobulina en su extremo amino que es muy variable de un anticuerpo a otro. Estos dominios se denominan V_L y V_H . Los demás dominios están más conservados entre los diversos anticuerpos y se denominan dominios constantes (C_{L1} , C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}).

amino terminal de cada cadena como *región variable*, mientras que el resto de los dominios de inmunoglobulina guardan entre sí un parecido mucho mayor en todos los anticuerpos y reciben el nombre de *regiones constantes* (Figura 33.11).

33.2 El plegamiento de inmunoglobulina está formado por un armazón con estructura de sándwich beta que contiene bucles hipervariables

Una molécula de IgG consta de un total de 12 dominios de inmunoglobulina. Las secuencias de estos dominios tienen muchas características en común y adoptan una misma estructura, el *plegamiento de inmunoglobulina* (Figura 33.12). Sorprendentemente, este mismo dominio estructural aparece en muchas otras proteínas que desempeñan papeles cruciales en el sistema inmunitario y en funciones que no están relacionadas con la inmunidad.

El plegamiento de inmunoglobulina consta de un par de hojas β , cada una formada por hebras β antiparalelas que rodean un núcleo central hidrofóbico. Un único puente disulfuro conecta las dos hojas. Dos aspectos de esta estructura resultan particularmente importantes para su función. En primer lugar, tres bucles localizados en uno de los extremos de la estructura forman una posible superficie de unión. Estos bucles albergan las secuencias hipervariables que se encuentran en los anticuerpos y en los receptores de las células T (Sección 33.3 y p. 963). La variación de las secuencias de aminoácidos de estos bucles constituye el principal mecanismo para la generación de la inmensa diversidad de anticuerpos y receptores de células T que se expresan en el sistema inmunitario. Estos bucles se denominan *bucle hipervariante* o *regiones determinantes de la complementariedad (CDRs)*. En segundo lugar, los extremos amino y carboxilo de esta estructura están en lados opuestos, lo que permite que los dominios estructurales se junten para formar cadenas, como en las cadenas L y H de los anticuerpos. Estas cadenas se encuentran en varias moléculas clave del sistema inmunitario.

De entre los dominios que están codificados por el genoma humano, el plegamiento de inmunoglobulina es uno de los que aparece con más frecuencia: más de 750 genes codifican proteínas con al menos un plegamiento de inmunoglobulina reconocible a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estos dominios también son habituales en otros animales pluricelulares como las moscas y los nemátodos. Sin embargo, partiendo únicamente del análisis de las secuencias de aminoácidos, los dominios con plegamiento de inmunoglobulina no parecen estar presentes en levaduras o plantas,

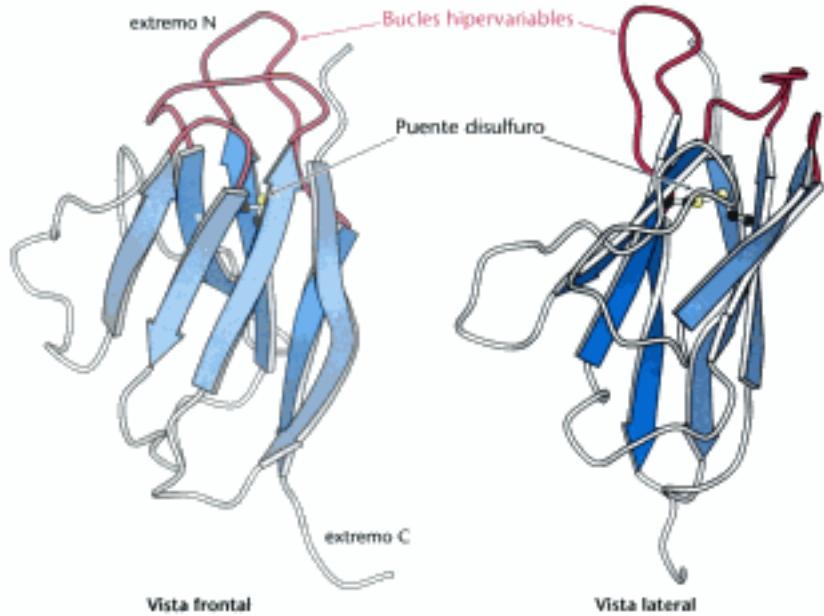
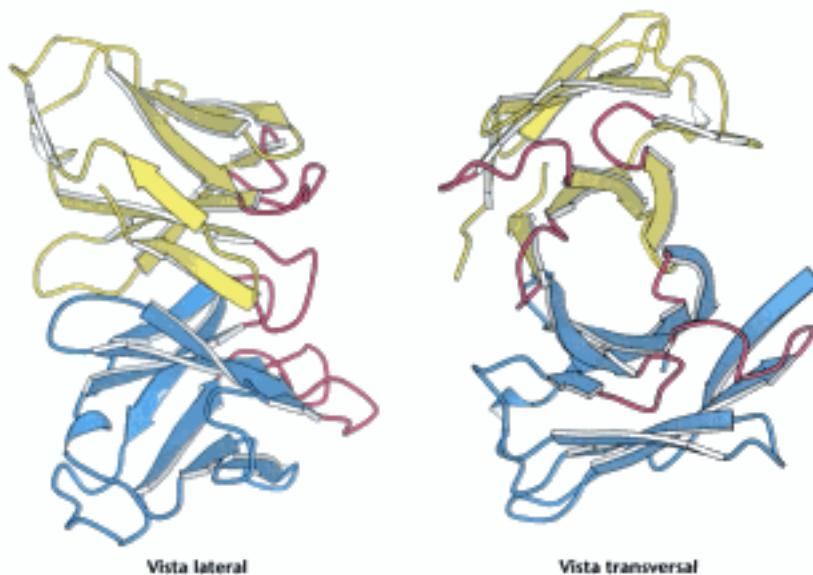


Figura 33.12 Plegamiento de inmunoglobulina. Un dominio de inmunoglobulina consta de una par de hojas β conectadas mediante un puente disulfuro e interacciones hidrofóbicas. Obsérvese que los tres bucles hipervariables se encuentran en uno de los extremos de la estructura. [Tomado de 1DQJ.pdb.]

aunque estos organismos cuentan con otros dominios de estructura similar, entre los que se incluye la plastocianina, una proteína transportadora de electrones muy importante en la fotosíntesis en las plantas (p. 551). Por tanto, la familia del plegamiento de inmunoglobulina parece haberse propagado enormemente a lo largo de las ramas evolutivas que han conducido hacia los animales y, particularmente, hasta los vertebrados.

33.3 Los anticuerpos se unen a moléculas específicas por medio de sus bucles hipervariables

Para cada tipo de anticuerpo, los dominios de inmunoglobulina amino terminales de las cadenas L y H (los dominios variables, representados como V_L y V_H) se juntan en los extremos de los brazos que se extienden a partir de la estructura. Las posiciones de las regiones determinantes de la complementariedad son sorprendentes. Estas secuencias hipervariables, localizadas en tres bucles de cada dominio, se juntan de manera que los seis bucles originan una única superficie en el extremo de cada brazo (Figura 33.13). Dado que prácticamente cualquier V_L se puede emparejar con cualquier V_H , *asociándolos de forma combinatoria se puede construir un gran número de centros de unión distintos*.



 **Figura 33.13 Dominios variables.** Dos perspectivas de los dominios variables de la cadena L (en amarillo) y de la cadena H (en azul); las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) se muestran en rojo. Obsérvese que en la figura de la izquierda, los seis CDRs se agrupan para formar una superficie de unión. La especificidad de la superficie está determinada por las secuencias y las estructuras de los CDRs. [Tomado de 1DQJ.pdb.]

Los estudios de rayos X han puesto de manifiesto cómo se unen los anticuerpos a los antígenos

Los resultados de estudios cristalográficos de rayos X de varios cientos de antígenos, grandes y pequeños, unidos a moléculas de F_{ab} han proporcionado una gran cantidad de información sobre las bases estructurales de la especificidad de los anticuerpos. La unión de antígenos a anticuerpos se rige por los mismos principios que dirigen la unión de sustratos a enzimas. La yuxtaposición de formas complementarias genera numerosos contactos entre los aminoácidos de las superficies de unión de ambas moléculas. Un gran número de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas se combinan para dar lugar a una unión específica y fuerte.

Ciertos aspectos de la unión de anticuerpos merecen especial atención, puesto que están directamente relacionados con la estructura de las inmunoglobulinas. Se ha descubierto que el lugar de unión del anticuerpo alberga algunos, si no todos, los CDRs de los dominios variables del anticuerpo. Es probable que las moléculas pequeñas establezcan contacto con un menor número de CDRs, de modo que quizás sean 15 los residuos del anticuerpo implicados en las interacciones de unión. Las macromo-

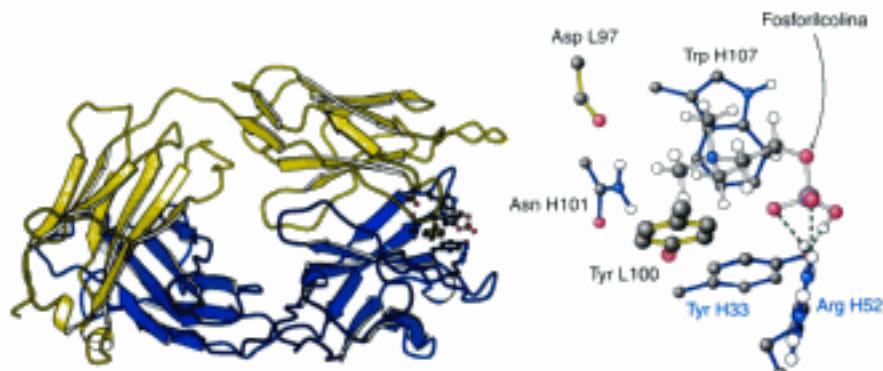
léculas, a menudo, establecen un contacto más extenso, interaccionando en algunas ocasiones con los seis CDRs y con al menos 20 de los residuos del anticuerpo. Con frecuencia, las moléculas pequeñas se unen a una hendidura de la región de unión al antígeno. Las macromoléculas, como por ejemplo las proteínas globulares, tienden a interaccionar mediante superficies más grandes, relativamente planas y yuxtapuestas, que presentan protrusiones y depresiones complementarias.

Recientemente, la búsqueda de una vacuna contra el HIV ha ampliado nuestros conocimientos sobre los anticuerpos y sobre la forma en que se unen a moléculas pequeñas. El eterno problema en el diseño de la vacuna contra el HIV ha sido la incapacidad de los anticuerpos para neutralizar el virus. En otras palabras, la mayor parte de los anticuerpos humanos no reconocen el HIV. En contadas ocasiones se han aislado unos pocos anticuerpos procedentes de individuos infectados por el HIV asintomáticos que exhiben una respuesta neutralizadora. Uno de estos anticuerpos, el b12, constituye un ejemplo de superficie de unión al antígeno que no es plana. En vez de ello, b12 tiene un bucle CDR3 muy largo que forma una proyección "en forma de dedo" que puede sondear los valles y cañones que presenta el virus sobre su superficie. Otro de estos anticuerpos poco comunes que reaccionan con el HIV, denominado 2G12, también tiene una forma inusual; en vez de tener la forma normal de "Y" de las moléculas de IgG, los dos brazos de 2G12 se yuxtaponen en posición vertical. Los dos "brazos" F_{ab} forman un dímero fuertemente empaquetado porque sus dominios V_H están entrelazados.

Un caso muy bien estudiado de unión de moléculas pequeñas es el de la unión de fosforilcolina a F_{ab} . El análisis cristalográfico puso de manifiesto que la fosforilcolina se unía a una cavidad delimitada por residuos pertenecientes a cinco CDRs: dos de la cadena L y tres de la cadena H (Figura 33.14). El grupo trimetilamonio de la fosforilcolina, cargado positivamente, se adentra en el interior de una cavidad en forma de cuña, donde interacciona de forma electrostática con dos residuos de glutamato cargados negativamente. El grupo fosforilo de la fosforilcolina, cargado negativamente, se une al grupo guanidinio, cargado positivamente, de un residuo de arginina localizado en la entrada de la hendidura y a un residuo de lisina cercano. El grupo fosforilo también forma puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo de un residuo de tirosina y con el grupo guanidinio de una cadena lateral de arginina. Este complejo también se encuentra estabilizado por medio de numerosas interacciones de van der Waals, como las establecidas por una cadena lateral de triptófano.



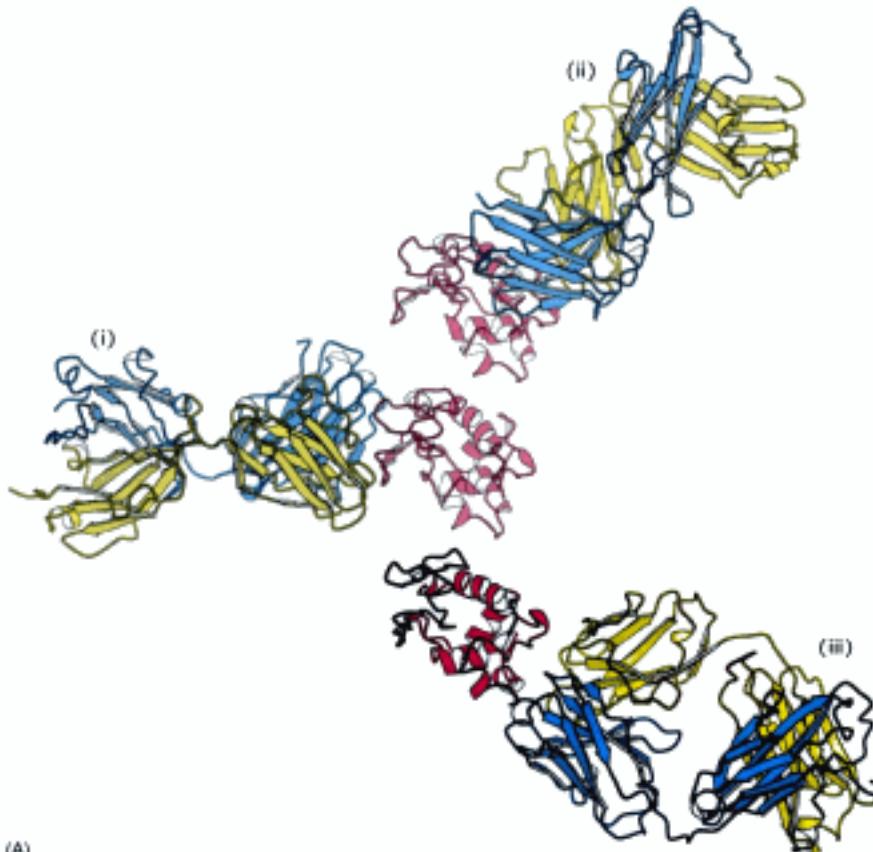
Figura 33.14 Unión de un antígeno pequeño. Estructura del complejo formado por el fragmento F_{ab} de un anticuerpo y su diana, en este caso, la fosforilcolina. Los residuos del anticuerpo interaccionan con la fosforilcolina mediante puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de van der Waals. [Tomado de 2MCP.pdb.]



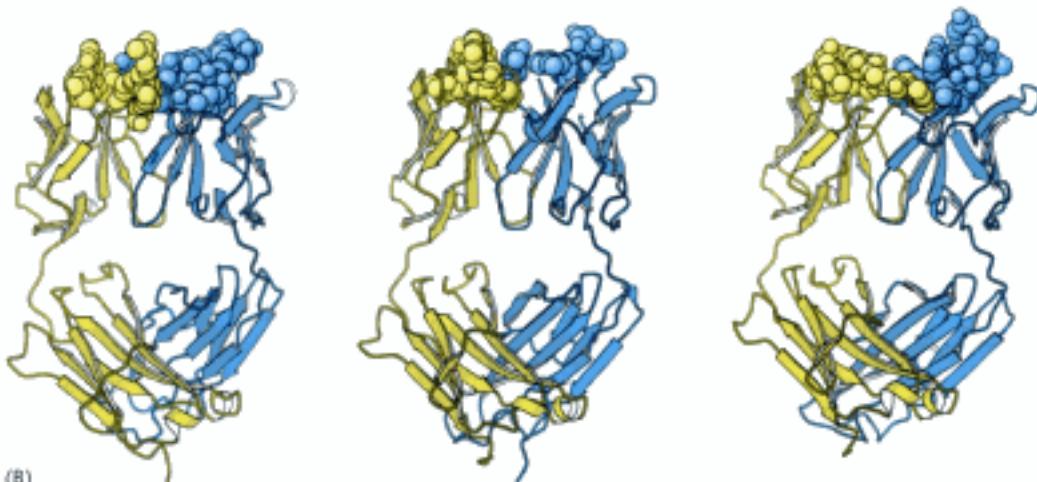
En la unión de la fosforilcolina a F_{ab} humanos intervienen residuos pertenecientes a cinco CDRs. Esta unión no cambia de forma significativa la estructura del anticuerpo, a pesar de que el ajuste inducido juega un papel en la formación de numerosos complejos anticuerpo-antígeno. Un centro de unión maleable puede acomodar a muchos más tipos de ligandos que uno rígido. Por tanto, el ajuste inducido amplía el repertorio de especificidades de los anticuerpos.

Los antígenos grandes se unen a los anticuerpos por medio de numerosas interacciones

¿Cómo interaccionan los antígenos grandes con los anticuerpos? Se ha caracterizado estructuralmente con gran detalle una vasta colección de anticuerpos dirigidos con-



(A)



(B)

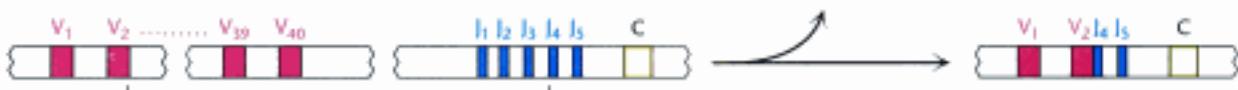
Figura 33.15 Anticuerpos contra la lisozima. (A) Estructuras de tres complejos (i, ii y iii) formados por los fragmentos F_{ab} (en azul y amarillo) y la lisozima de la clara de huevo de gallina (en rojo); en cada caso, la lisozima adopta la misma orientación. Los tres anticuerpos reconocen epitopos totalmente distintos de la molécula de lisozima. (B) Fragmentos F_{ab} de la parte A de la figura (que corresponden, de izquierda a derecha, a los complejos i, ii y iii, respectivamente) en los que los puntos de contacto se destacan representándolos en forma de modelos espaciales compactos. Obsérvese las distintas formas que adoptan los lugares de unión al antígeno. [Tomado de 3HFL, 1DQJ, y 1FDL.pdb.]

tra la lisozima de la clara de huevo de gallina (Figura 33.15). Cada anticuerpo se une a una superficie distinta de la lisozima. Examinemos con detalle las interacciones existentes en uno de esos complejos (el complejo ii de la Figura 33.15A). Este anticuerpo se une a dos segmentos polipeptídicos que están bastante separados en la estructura primaria, los segmentos comprendidos entre los residuos 18 y 27 y entre los residuos 116 y 129 (Figura 33.16).

Los seis CDRs del anticuerpo establecen contacto con este epitopo. La región de contacto es bastante extensa (aproximadamente $30 \times 20 \text{ \AA}$). Las superficies yuxtapuestas son más bien planas. La única excepción es la cadena lateral de la glutamina 121 de la lisozima, que penetra profundamente en el lugar de unión del antígeno, donde forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno de un grupo carbonilo de la cadena principal y está rodeado por tres cadenas laterales aromáticas. La formación de 12 puentes de hidrógeno y numerosas interacciones de van der Waals contribuye a la elevada afinidad ($K_d = 20 \text{ nM}$) de esta interacción anticuerpo-antígeno. El estudio de

Hidden page

Figura 33.18 Recombinación VJ. Un único gen V (en este caso V_2) se une a un gen J (en este caso J_4) para formar una región VJ unida. El DNA comprendido entre estos dos genes se libera en forma circular. Como las regiones V y J se seleccionan al azar y como el punto de empalme entre ellas no siempre está localizado exactamente en el mismo lugar, este proceso puede generar multitud de combinaciones VJ.



localizado en un lugar insospechado: cerca del gen *C*. Recibe el nombre de *gen J* porque junta los genes V y C en una célula diferenciada. De hecho, en las proximidades del gen *C* de células embrionarias se encuentra una hilera de cinco genes *J*. Durante la diferenciación de una célula productora de anticuerpos, un gen V se empalma con un gen J para dar lugar al gen completo de la región variable (Figura 33.18). La maduración del RNA origina una molécula de mRNA para la totalidad de la cadena L empalmando la región que codifica la unidad VJ reorganizada con la región que codifica la unidad C (Figura 33.19).

Los genes J contribuyen de forma importante a la diversidad de anticuerpos porque codifican una parte del segmento hipervariante final (CDR3). A la hora de formar un gen continuo para la región variable, cualquiera de los 40 genes V se puede empalmar con cualquiera de los cinco genes J. De esta forma, la recombinación somática de estos segmentos génicos amplifica la diversidad que ya existe en la línea germinal. La conexión entre V y J no está controlada de una forma muy precisa. La recombinación entre estos genes puede tener lugar en alguna de las bases próximas al codón para el residuo 95, generando aún más diversidad. En el cromosoma 22 humano existe una disposición similar de los genes V y J que codifican la cadena ligera λ . Esta región incluye 30 segmentos génicos V_λ y cuatro segmentos J_λ . Además, esta región incluye cuatro genes *C* distintos, a diferencia del único gen *C* del locus κ .

En el ser humano, los genes que codifican la cadena pesada se encuentran en el cromosoma 14. Sorprendentemente, el dominio variable de las cadenas pesadas se construye a partir de la unión de tres segmentos en lugar de dos. Además de los genes V_H que codifican los residuos 1 a 94 y los segmentos J_H que codifican los residuos 98 a 113, esta región del cromosoma incluye otro conjunto de segmentos que codifican los residuos 95 a 97 (Figura 33.20). Estos segmentos génicos se llaman D, de diversidad. Entre los 51 segmentos V_H y los 6 segmentos J_H hay unos 27 segmentos D. El proceso de recombinación empalma primero un segmento D con un segmento J_H ; posteriormente, un segmento V_H se empalma con DJ $_H$. Como la cadena H está codificada por tres segmentos génicos en vez de dos, se puede generar una mayor variedad de zonas de unión a antígeno y de oquedades en la cadena H que en la cadena L. Aún más, el CDR3 de la cadena H se puede diversificar gracias a la actividad de la transferasa de desoxirribonucleótidos terminales, un tipo especial de DNA polime-

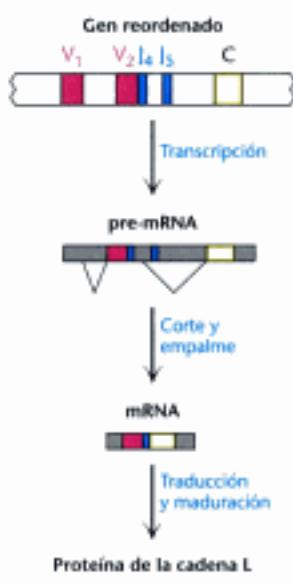


Figura 33.19 Expresión de la cadena ligera. La proteína correspondiente a la cadena ligera se expresa mediante la transcripción del gen reordenado, que origina una molécula de pre-mRNA en la que las regiones V, J y C están separadas. El procesamiento del RNA elimina las secuencias intermedias para producir una molécula de mRNA con las regiones V, J y C empalmadas. La traducción del mRNA y la maduración del producto proteico inicial dan lugar a la cadena ligera.

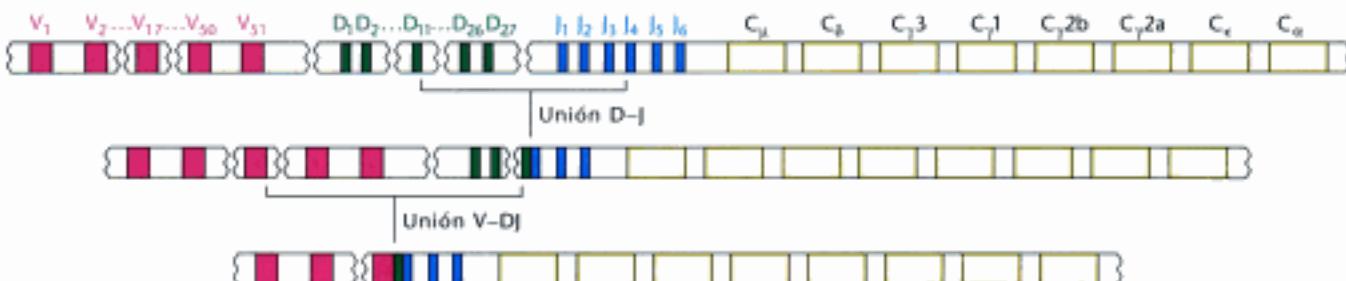


Figura 33.20 Recombinación V(D)J. El locus de la cadena pesada incluye una hilera de 51 segmentos V, 27 segmentos D y 6 segmentos J. El reordenamiento de los genes comienza con un empalme D-J seguido de un reordenamiento posterior que empalma el segmento V con el segmento DJ.

rasa que no necesita molde. Este enzima inserta nucleótidos extra entre V_H y D. Tanto en las cadenas L como en las cadenas H, la *recombinación V(D)J* se lleva a cabo mediante enzimas específicos presentes en las células inmunitarias. Estas proteínas, que reciben el nombre de *RAG-1* y *RAG-2*, reconocen secuencias específicas del DNA denominadas *secuencias señal para la recombinación (RSSs)*, adyacentes a los segmentos V, D y J y facilitan el corte y empalme de los segmentos de DNA.

Mediante la asociación combinatoria y la mutación somática se pueden generar más de 10^8 anticuerpos distintos

Recapitulemos sobre las fuentes que generan diversidad en los anticuerpos. La línea germinal contiene un repertorio más bien grande de genes para las regiones variables. Para las cadenas ligeras κ hay unos 40 segmentos V y cinco segmentos J. Por tanto, mediante combinaciones de V y J se puede formar un total de $40 \times 5 = 200$ genes V_{κ} completos distintos. Un análisis similar sugiere que se pueden generar al menos 120 cadenas ligeras λ distintas. Se puede generar un número aún mayor de genes para la cadena pesada gracias al papel desempeñado por los segmentos D. Con 51 segmentos V, 27 D y 6 J el número de genes V_{H1} completos que se puede formar es de 8262. La asociación de 320 tipos de cadena L con 8262 tipos de cadenas H originaría 2.6×10^6 anticuerpos distintos. La variabilidad en los puntos exactos por donde se empalan los segmentos y otros mecanismos aumentan este valor en al menos dos órdenes de magnitud.

Todavía se introduce más diversidad en las cadenas de anticuerpo mediante la *mutación somática*, es decir, la introducción de mutaciones en los genes recombinados. De hecho, durante el transcurso de una respuesta inmunitaria humoral típica se puede observar que la constante de afinidad se multiplica por 1000 a causa de la mutación somática, un proceso denominado *maduración de la afinidad*. La generación de un repertorio tan amplio hace necesaria la selección de aquellos anticuerpos que se ajustan con más precisión al antígeno. De esta forma, la naturaleza recurre a tres fuentes de diversidad (el repertorio de la línea germinal, la recombinación somática y la mutación somática) para generar una rica variedad de anticuerpos que protejan al organismo de incursiones foráneas.

La oligomerización de anticuerpos expresados en la superficie de células B inmaduras desencadena la secreción de anticuerpos

El proceso descrito hasta ahora genera un conjunto muy diverso de moléculas de anticuerpo, un primer paso fundamental en la generación de la respuesta inmunitaria. La etapa siguiente consiste en la selección de un conjunto concreto de anticuerpos dirigidos contra un invasor específico. ¿Cómo se lleva a cabo esta selección? Cada célula B inmadura, producidas en la médula ósea, expresa una forma monomérica específica de IgM anclada en su superficie (Figura 33.21). Cada célula expresa aproximadamente 10^5 moléculas de IgM, pero *todas estas moléculas tienen una secuencia de aminoácidos idéntica y, por tanto, la misma especificidad para unirse a antígenos*. Por consiguiente, una selección que haga proliferar un tipo concreto de célula B inmadura provocará la amplificación de un anticuerpo con una especificidad única. El proceso de selección comienza con la unión de un antígeno al anticuerpo unido a la membrana.

Asociadas a cada molécula de IgM unida a la membrana se encuentran dos moléculas de una proteína de membrana heterodimérica denominada Ig- α -Ig- β (Ver la Figura 33.21). El estudio de las secuencias de aminoácidos de Ig- α y de Ig- β resulta muy revelador. El extremo amino de cada proteína está localizado en el exterior de la célula y corresponde a una única inmunoglobulina y el extremo carboxilo, que está localizado en el interior de la célula, contiene una secuencia de 18 aminoácidos denominada *motivo de activación del inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM)*; ver Figura 33.21). Como su nombre indica, cada ITAM contiene residuos de tirosina fundamentales susceptibles de ser fosforilados por medio de determinadas proteína quinasas localizadas en las células del sistema inmunitario.

Una observación fundamental en relación con el mecanismo mediante el cual la unión del antígeno al anticuerpo unido a la membrana desencadena las etapas siguientes de la respuesta inmunitaria es que *se requiere la oligomerización o el agrupamiento*

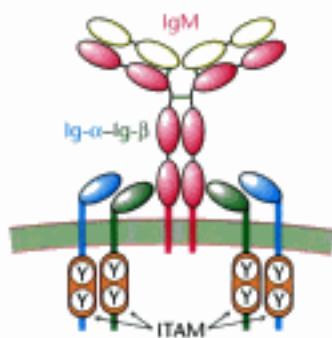


Figura 33.21 Receptor presente en las células B. Este complejo está formado por una molécula de IgM unida a la membrana, asociada de forma no covalente con dos heterodímeros Ig- α -Ig- β . Los dominios intracelulares de cada una de las cadenas Ig- α e Ig- β contienen un motivo de activación del inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM).

Hidden page

La inhibición resultante es tan potente que nos da una idea de la importancia de la actividad de este factor de transcripción para el desarrollo de una respuesta inmunitaria. Sin fármacos como la ciclosporina, el transplante de órganos sería extremadamente difícil porque los tejidos transplantados expresan una amplia gama de antígenos foráneos que provocan el rechazo del sistema inmunitario hacia el nuevo tejido.

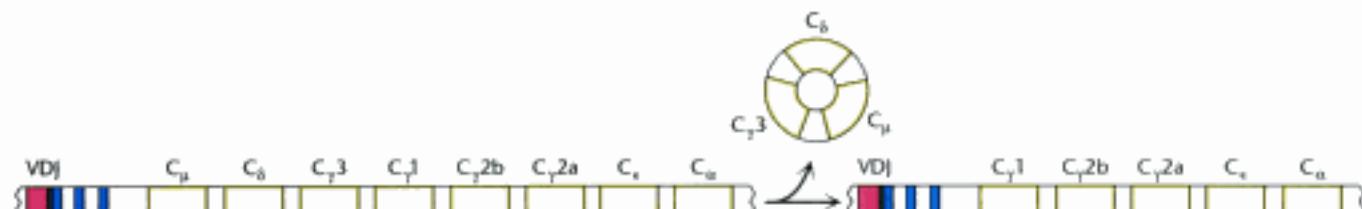
El papel de la oligomerización en la vía de señalización de las células B queda claro al considerar la naturaleza de muchos de los antígenos presentados por los patógenos. Las superficies de muchos virus, bacterias y parásitos se caracterizan por tener agrupaciones ordenadas de proteínas de membrana idénticas o de carbohidratos unidos a membrana. Por tanto, la mayoría de los patógenos presentan multitud de superficies de unión que provocarán de forma natural la oligomerización de los anticuerpos unidos a la membrana a medida que se van uniendo a epítopos colindantes. Además, este mecanismo proporciona una explicación para el hecho de que la mayoría de las moléculas pequeñas no provocan una respuesta inmunitaria; sin embargo, la asociación de múltiples copias de una molécula pequeña a una proteína oligomérica grande, como la hemocianina de la lapa de Barbados (*Fissurella barbadensis*) (KLH), que tiene una masa molecular de 1 millón de daltons o más, provoca la oligomerización de los anticuerpos y, por tanto, la producción de anticuerpos contra epítopos de moléculas pequeñas. La proteína de gran tamaño se denomina *transportador* del grupo químico que lleva unido, que recibe el nombre de *determinante hapténico*. La pequeña molécula foránea se denomina *hapteno*. Los anticuerpos dirigidos contra los haptenos unidos al transportador también se unirán a los haptenos no unidos.

Gracias a la translocación de los genes V_H se forman distintos tipos de anticuerpos

El desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva basada en los anticuerpos depende de que se segreguen en la sangre anticuerpos que tengan las funciones efectoras apropiadas. Al principio de esta respuesta, se activa una vía alternativa de la maduración del mRNA, de modo que la producción de IgM unida a membrana es reemplazada por la síntesis de IgM secretada. Como se indicó en la Sección 33.1, la IgM secretada es pentamérica y posee una elevada avidez hacia antígenos que contienen múltiples epítopos idénticos. Posteriormente, la célula productora de anticuerpos produce IgG, IgA, IgD o IgE con la misma especificidad que la IgM secretada inicialmente. En el curso de esta transición, tanto la cadena ligera como la región variable de la cadena pesada permanecen inalteradas. Solamente cambia la región constante de la cadena pesada. Esta etapa de la diferenciación de una célula productora de anticuerpos recibe el nombre de *cambio de tipo* (Figura 33.23). En células no diferenciadas, los genes para la región constante de cada tipo de cadena pesada, denominados C_{μ} , C_{δ} , C_{γ} , C_{ϵ} y C_{α} , están uno al lado del otro. Hay ocho en total, entre los que se incluyen cuatro genes para las regiones constantes de las cadenas γ . Mediante la translocación de un segmento génico V_H a un segmento génico DJ_H se forma un gen completo para las cadenas pesadas del anticuerpo IgM.

¿Cómo se forman las otras cadenas pesadas? En el cambio de tipo interviene un proceso de reordenamiento de genes que desplaza un gen VDJ desde un lugar próximo a un gen C hasta otro lugar cercano a otro gen C. Lo más importante es que durante el *cambio de tipo* se conserva la especificidad de la unión al antígeno porque la totalidad del gen $V_H DJ_H$ se traslada de forma intacta. Por ejemplo, la especificidad para unirse a un antígeno de la IgA producida por una determinada célula es la misma que la de la IgM sintetizada durante una etapa previa de su desarrollo.

Figura 33.23 Cambio de tipo. Reordenamientos adicionales del locus para las cadenas pesadas dan lugar a la formación de genes que codifican otros tipos de anticuerpos distintos de la IgM. En el ejemplo mostrado, el reordenamiento coloca la región VDJ cerca de la región $C_{\gamma}1$, lo que da lugar a la producción de la IgG1. Hay que señalar que como no se ha producido ningún reordenamiento adicional en la región VDJ, la especificidad del anticuerpo permanece intacta.



Hidden page

transportados desde el citoplasma hacia la luz del retículo endoplásmico por medio de una bomba impulsada por ATP. En el retículo endoplásmico, los péptidos se combinan con las proteínas MHC de clase I nacientes y, posteriormente, estos complejos son dirigidos hacia la membrana plasmática.

Las proteínas MHC incrustadas en la membrana plasmática retienen con firmeza sus péptidos unidos de modo que pueden ser palpados y escudriñados por los receptores de las células T localizados sobre la superficie de una célula asesina. Los péptidos foráneos unidos a las proteínas MHC de clase I indican que una célula está infectada y la identifican para que sea destruida por las células T citotóxicas. Una agrupación formada por el complejo péptido foráneo-MHC, el receptor de las células T y numerosas proteínas accesorias desencadena una cascada que provoca la apoptosis de la célula infectada. Estrictamente hablando, las células infectadas no son eliminadas, sino que se las comunica a suicidarse por el bien del organismo.

Los péptidos expuestos por las proteínas MHC ocupan un profundo surco flanqueado por hélices alfa

En 1987, Don Wiley y Pamela Bjorkman resolvieron la estructura tridimensional de un fragmento de gran tamaño de una proteína MHC de clase I humana, el *antígeno A2 de leucocitos humanos* (HLA-A2). Las proteínas MHC de tipo I están formadas por una cadena α de 44 kd unida de forma no covalente a un polipéptido de 12 kd denominado *microglobulina β_2* . La cadena α tiene tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), un segmento transmembrana y una cola que se extiende hacia el citoplasma (Figura 33.26). La proteólisis con papaina de la cadena α de HLA, algunos residuos por delante del segmento transmembrana, generó un fragmento heterodimérico soluble. La microglobulina β_2 y los dominios α_3 presentan el plegamiento de inmunoglobulina, aunque el emparejamiento de los dos dominios difiere del que tiene lugar en los anticuerpos. Los dominios α_1 y α_2 presentan una arquitectura sorprendente y novedosa. Se asocian de forma muy intensa para originar un profundo surco que sirve de lugar de unión para los péptidos (Figura 33.27). El fondo del surco, que tiene unos 25 Å de largo y 10 Å de ancho, está formado por 8 estructuras β , cuatro por cada dominio. Uno de los lados está formado por una larga hélice perteneciente al dominio α_1 y el otro lado está formado por una hélice perteneciente al dominio α_2 . *Este surco es el lugar de unión para la presentación de los péptidos*.

El surco se puede llenar con un péptido de entre 8 y 10 residuos de longitud en conformación extendida. Como veremos más adelante (p. 968), las proteínas MHC son extraordinariamente variadas en la población humana; cada persona expresa hasta seis tipos distintos de proteínas MHC de clase I, y en diferentes personas encontramos multitud de formas distintas. La primera estructura descrita, HLA-A2, se une a péptidos que casi siempre presentan leucina en segunda posición y valina en la última posición (Figura 33.28). Las cadenas laterales de la molécula de MHC interactúan con los extremos amino y carboxilo y con las cadenas laterales de estas dos

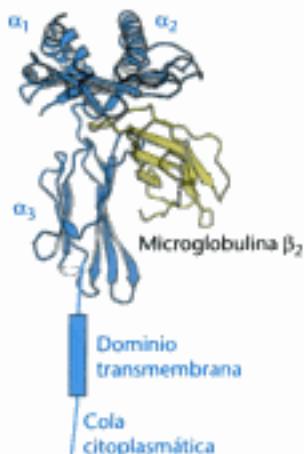


Figura 33.26 Proteína MHC de clase I. Una proteína de este tipo está formada por dos cadenas. Nótese que la cadena α comienza con dos dominios (α_1 , α_2) que incluyen α -hélices, y continúa con un dominio de inmunoglobulina (α_3), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. La segunda cadena, la microglobulina β_2 , adopta el plegamiento de inmunoglobulina. [Tomado de 1HHK.pdb.]

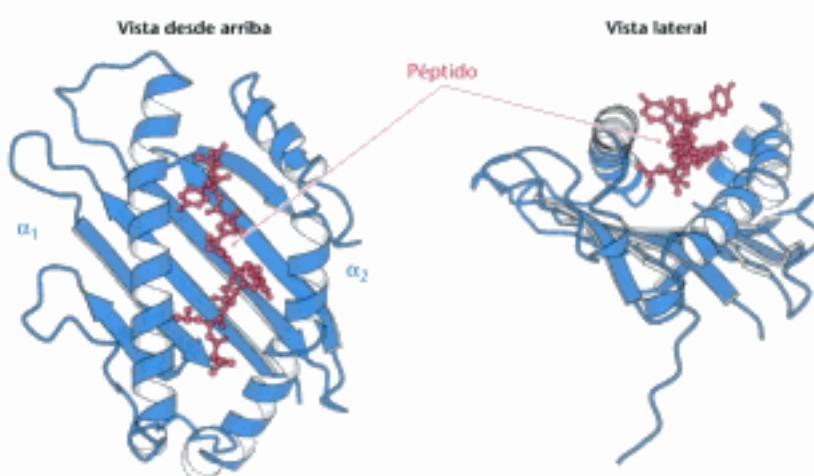


Figura 33.27 Lugar de unión a péptidos en la proteína MHC de clase I. Los dominios α_1 y α_2 se aproximan para formar un surco en el cual se exponen los péptidos. Nótese que el péptido se encuentra rodeado por tres de sus lados por una hoja β y dos hélices α , pero se encuentra accesible desde la parte superior de la estructura. [Tomado de 1HHK.pdb.]

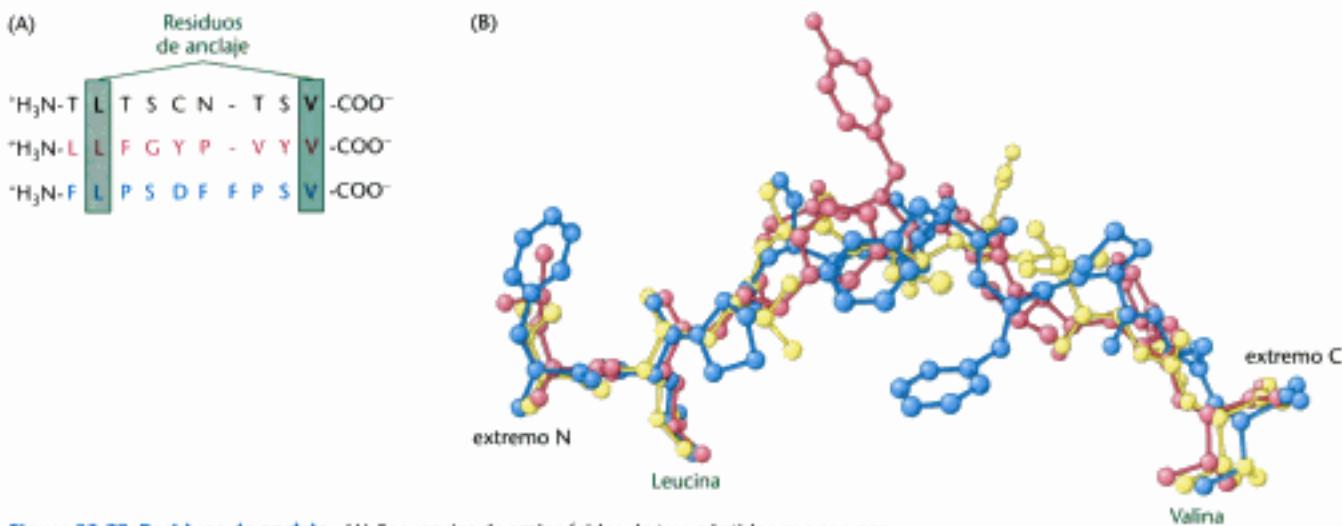


Figura 33.28 Residuos de anclaje. (A) Secuencias de aminoácidos de tres péptidos que se unen a la proteína MHC de clase I denominada HLA-A2. Cada uno de estos péptidos tiene una leucina en la segunda posición y una valina en el extremo carboxilo. (B) La comparación de las estructuras de estos péptidos pone de manifiesto que, en todos ellos, tanto los extremos amino y carboxilo como las cadenas laterales de leucina y valina se encuentran prácticamente en la misma posición, mientras que el resto de las estructuras difieren bastante.

posiciones cruciales. A menudo nos referimos a estos residuos como *residuos de anclaje*. Los demás residuos varían mucho. Por tanto, esta proteína MHC de clase I concreta puede exponer muchos millones de péptidos distintos: para la unión solamente importa la identidad de dos de los nueve residuos. Cada tipo de molécula MHC precisa de un particular conjunto de residuos de anclaje. Por tanto, estas moléculas pueden exponer una gama de péptidos tremadamente amplia. Hay que destacar el hecho de que *una de las caras del péptido unido está expuesta a la disolución, de forma que puede ser examinado por otras moléculas, concretamente, por los receptores de las células T*. Otra característica notable de los complejos MHC-péptido es su estabilidad cinética; una vez unido, el péptido no se libera ni siquiera al cabo de unos días.

Los receptores de las células T son proteínas parecidas a los anticuerpos que presentan regiones variables y constantes

Estamos ahora en condiciones de fijarnos en el receptor que reconoce a los péptidos expuestos por las proteínas MHC de las células diana. El *receptor de las células T* está formado por una cadena α de 43 kd unida mediante un puente disulfuro a una cadena β de 43 kd (Figura 33.29). Cada cadena atraviesa la membrana plasmática y por el lado citoplasmático presenta una corta región que corresponde al extremo carboxilo. Una pequeña proporción de las células T expresa un receptor que está formado por cadenas γ y δ en vez de α y β . Las cadenas α y β del receptor de las células T, al igual que las cadenas L y H de las inmunoglobulinas, constan de regiones *variables* y regiones *constantes*. De hecho, *estos dominios del receptor de las células T son homólogos a los dominios V y C de las inmunoglobulinas*. Aún más, las secuencias hipervariables presentes en las regiones V de las cadenas α y β del receptor de las células T forman el lugar de unión para el epítopo.

La arquitectura genética de estas proteínas es similar a la de las inmunoglobulinas, aunque la diversidad genética de los anticuerpos se distribuye entre todos los bucles CDR mientras que la diversidad genética de los receptores de las células T se concentra en el bucle CDR3 que interacciona con el péptido que se encuentra unido al MHC. La región variable de la cadena α del receptor de las células T está codificada por unos 50 segmentos V y 70 segmentos J. La cadena β del receptor de las células T está codificada por dos genes para el segmento D además de 57 segmentos V y 13 segmentos J. De nuevo, la diversidad de los genes que lo componen y el uso

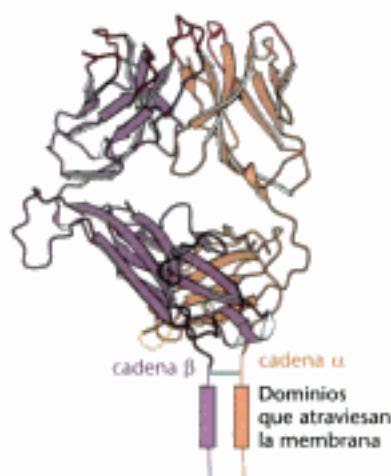


Figura 33.29 Receptor presente en las células T. Esta proteína está formada por una cadena α y una cadena β , cada una de las cuales consta de dos dominios de inmunoglobulina y de un dominio que atraviesa la membrana. Las dos cadenas están conectadas por un puente disulfuro. [Tomado de 1BD2.pdb.]

Receptor de células T

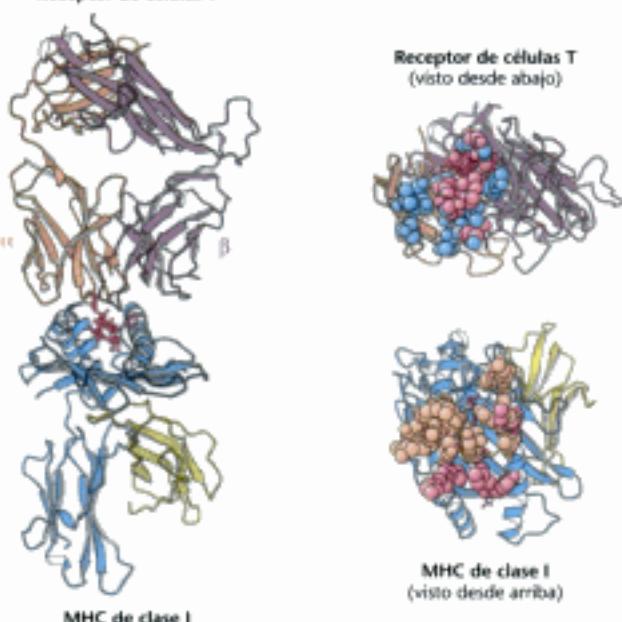


Figura 33.30 Complejo MHC de clase I-receptor de las células T. El receptor de las células T se une a la proteína MHC de clase I unida a un péptido. Nótese que el receptor de las células T establece contactos tanto con la proteína MHC como con el péptido, tal y como se refleja a partir de las superficies que quedan expuestas cuando el complejo se separa (a la derecha). Estas superficies están coloreadas en función de la cadena con la que establecen contactos. [Tomado de 1BD2.pdb.]

de métodos algo imprecisos a la hora de empalmarlos incrementan el número de proteínas distintas que se pueden formar. *A partir de las combinaciones de este repertorio de genes se pueden originar al menos 10^{12} especificidades diferentes.* Por tanto, los receptores de las células T, al igual que las inmunoglobulinas, pueden reconocer un gran número de epítopos distintos. Todos los receptores de una célula T concreta tienen la misma especificidad.

¿Cómo reconocen las células T sus objetivos? Las regiones variables de las cadenas α y β de los receptores de las células T forman un lugar de unión que reconoce la combinación formada por un epítopo-péptido foráneo asociado a una proteína MHC (Figura 33.30). Por separado, ni el péptido foráneo ni la proteína MHC pueden formar un complejo con el receptor de las células T. Por tanto, los fragmentos de un patógeno intracelular están expuestos en un contexto que permite su detección y el inicio de una respuesta apropiada.

El CD8 de las células T citotóxicas actúa de forma coordinada con los receptores de las células T

El receptor de células T no actúa sólo a la hora de reconocer e intervenir en el destino de sus células diana. Las células T citotóxicas también expresan en su superficie una proteína llamada CD8 que es fundamental para el reconocimiento del complejo MHC de clase I-péptido. La abreviatura CD significa *complejo de diferenciación*, y hace referencia a un marcador de la superficie celular que es utilizado para identificar un linaje o una etapa de la diferenciación. Los anticuerpos específicos para determinadas proteínas CD han resultado de un valor incalculable a la hora de seguir el desarrollo de los leucocitos y a la hora de descubrir nuevas interacciones entre tipos celulares concretos.

Cada cadena del dímero CD8 contiene un dominio que recuerda al dominio variable de la inmunoglobulina (Figura 33.31). CD8 interacciona principalmente con el dominio constante α_3 de las proteínas MHC de clase I. Esta interacción estabiliza aún más las interacciones entre la célula T y su objetivo. La cola citoplasmática de CD8 presenta un lugar de anclaje para Lck, una tirosina quinasa citoplasmática, parecida a Src. El propio receptor de las células T se encuentra asociado a seis polipeptidos que forman el complejo CD3 (Figura 33.32). Las cadenas γ , δ y ϵ de CD3 son homólogas a las cadenas Ig- α e Ig- β asociadas al receptor de células B (p. 958); cada cadena está formada por un dominio de inmunoglobulina extracelular y una región ITAM intracelular. Estas cadenas se asocian dando lugar a los heterodímeros

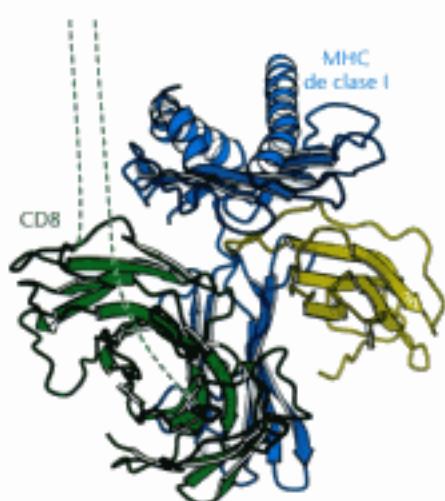


Figura 33.31 El correceptor CD8. Esta proteína dímerica se proyecta a partir de la superficie de una célula T citotóxica y se une a las moléculas MHC de clase I expresadas sobre la superficie de la célula a la cual está unida la célula T. Las líneas punteadas representan cadenas polipeptídicas extendidas que conectan los dominios de inmunoglobulina de CD8 con la membrana. [Tomado de 1AKJ.pdb.]

CD3- γ y CD3- δ . Un componente adicional, la cadena CD3- ζ , tiene tan solo un pequeño dominio extracelular y un dominio intracelular más grande que contiene tres secuencias ITAM.

En base a estos componentes, se puede vislumbrar un modelo para la activación de las células T que presenta numerosos paralelismos con la vía de activación de células B (Sección 33.3; Figura 33.33). La unión del receptor de las células T al complejo MHC de clase I-peptido junto con la unión del CD8 de la célula T a la molécula de MHC da lugar a la asociación de la quinasa Lck con los sustratos ITAM pertenecientes a los componentes del complejo CD3. La fosforilación de los residuos de tirosina de las secuencias ITAM genera puntos de anclaje para una proteína quinasa denominada ZAP-70 (abreviatura de proteína de 70 kd asociada a zeta) que es homóloga a la Syk de las células B. Anclada gracias a sus dos dominios SH2, ZAP-70 fosforila sustratos que aparecen posteriormente en la cascada de señalización. Moléculas adicionales, entre las que se incluye una fosfatasa unida a membrana denominada CD45 y una proteína de la superficie celular llamada CD28, desempeñan funciones supplementarias en este proceso.

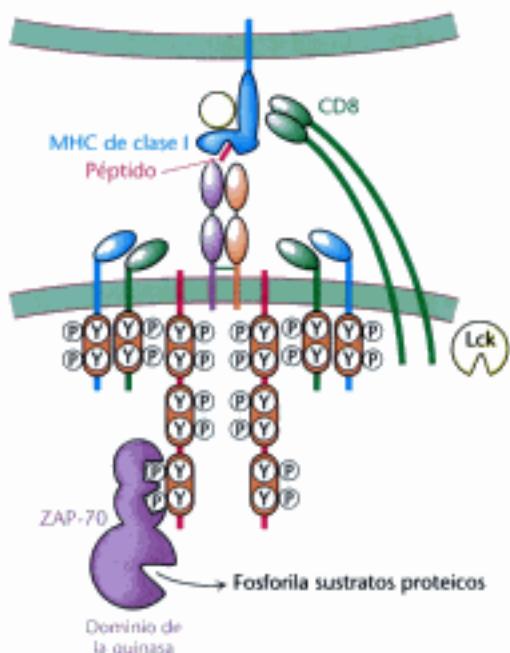


Figura 33.33 Activación de las células T. La interacción entre el receptor de las células T y un complejo MHC de clase I-peptido provoca la unión de CD8 a la proteína MHC, la incorporación de la tirosina quinasa Lck y la fosforilación de los residuos de tirosina de las secuencias ITAM de las cadenas CD3. Después de la fosforilación, las secuencias ITAM sirven como puntos de anclaje para la proteína quinasa ZAP-70, que fosforila sustratos proteicos para transmitir la señal.

La activación de células T tiene dos consecuencias importantes. En primer lugar, la activación de las células T citotóxicas provoca la secreción de *perforina*. Esta proteína de 70 kd permeabiliza la membrana de la célula diana mediante una polimerización que da lugar a poros transmembrana de 10 nm de anchura (Figura 33.34). Posteriormente, la célula T citotóxica secreta unas proteasas llamadas *granzimas* en el interior de la célula diana. Estos enzimas inicián el proceso de apoptosis que conduce a la muerte de la célula diana y a la fragmentación de su DNA, incluyendo cualquier DNA vírico que pueda estar presente. En segundo lugar, tras haber inducido el suicidio de la célula diana, la célula T activada se disocia y se estimula su reproducción. De esta forma se generan nuevas células T que expresan los mismos receptores para que continúen la lucha contra el invasor, una vez que estas células T han demostrado ser un arma apropiada.

Las células T ayudantes estimulan a las células que exhiben péptidos foráneos unidos a proteínas MHC de clase II

No todas las células son citotóxicas. *Las células T ayudantes o auxiliares un tipo diferente, estimulan la proliferación de determinados linfocitos B y células T citotóxicas*.

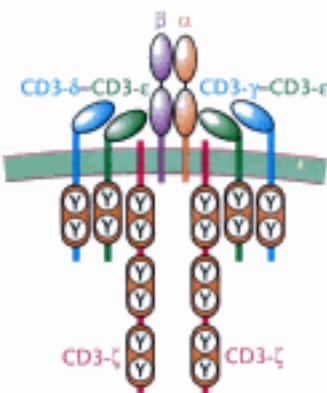


Figura 33.32 Complejo del receptor de las células T. El receptor de las células T se asocia con seis moléculas CD3: un heterodímero CD3- γ -CD3- ϵ , un heterodímero CD3- δ -CD3- ϵ y dos cadenas de CD3- ζ . En los dominios citoplasmáticos de CD3- γ , CD3- δ y CD3- ϵ hay una única secuencia ITAM, mientras que en cada cadena CD3- ζ hay tres secuencias de este tipo.

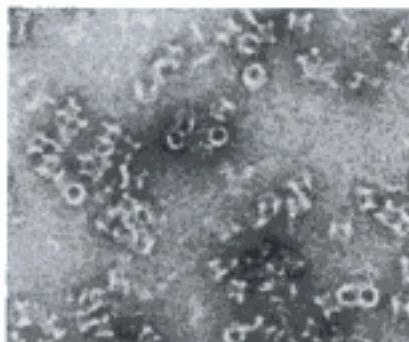


Figura 33.34 Consecuencias de la actividad de las células T citotóxicas. Micrografía electrónica que muestra los poros en la membrana de una célula que ha sido atacada por una célula T citotóxica. Los poros se forman por la polimerización de la perforina, una proteína secretada por la célula T citotóxica. [Cortesía del Dr. Eckhard Podack.]

Hidden page

generar cadenas polipeptídicas. El lugar de unión a péptidos de las moléculas de la clase II está abierto por los dos extremos, de modo que este surco puede acomodar a péptidos más largos que los que se pueden unir a las moléculas de la clase I; por regla general se unen a péptidos de entre 13 y 18 residuos de longitud. La especificidad de la unión a péptidos de cada molécula de la clase II se basa en la existencia de cavidades que reconocen determinados aminoácidos, los llamados residuos de anclaje, situados en posiciones específicas a lo largo de la secuencia.

Las células T ayudantes expresan receptores de las células T que se producen a partir de los mismos genes que están presentes en las células T citotóxicas. Estos receptores de las células T interaccionan con las moléculas MHC de la clase II de una forma que es análoga a la interacción entre las moléculas MHC de clase I y los receptores de células T. Sin embargo, las células T ayudantes y las células T citotóxicas se diferencian por otras proteínas que se expresan sobre su superficie. En concreto, las células T ayudantes expresan una proteína denominada CD4 en vez de expresar CD8. CD4 está formada por cuatro dominios de inmunoglobulina que se proyectan a partir de la superficie de la célula T y por una pequeña región citoplasmática (Figura 33.37). Los dominios de inmunoglobulina amino terminales de CD4 interactúan con la base de la molécula MHC de clase II. Así, las células T ayudantes se unen específicamente a las células que expresan MHC de clase II gracias a las interacciones que éstas establecen con CD4 (Figura 33.38).

Cuando una célula T ayudante se une a una célula presentadora de抗原s que expresa un complejo MHC de clase II-péptido apropiado, se inicia una serie de vías de señalización análogas a las de las células T citotóxicas por medio de la actividad de la quinasa Lck sobre las ITAMs de las moléculas de CD3 asociadas al receptor de las células T. Sin embargo, en vez de desencadenar una serie de eventos que conducen a la muerte de la célula a la que se encuentra adherida, *estas vías de señalización dan lugar a la secreción de citoquinas por parte de la célula ayudante*. Las citoquinas son una familia de moléculas que incluye, entre otras, la interleuquina-2 y el interferón-γ. Las citoquinas se unen a receptores específicos de las células que presentan抗原s y estimulan el crecimiento, la diferenciación y, en lo que respecta a las células del plasma derivadas de las células B, la secreción de anticuerpos (Figura 33.39). De este modo, la entrada de un patógeno foráneo en la célula y la exposición de sus fragmentos ayudan a generar un entorno local en el que las células que forman parte de la defensa contra este patógeno pueden proliferar gracias a la actividad de las células T ayudantes.



Figura 33.37 Correceptor CD4. Esta proteína consta de cuatro dominios de inmunoglobulina dispuestos en tandem que se proyectan a partir de la superficie de una célula T ayudante. [Tomado de 1WIO.pdb.]

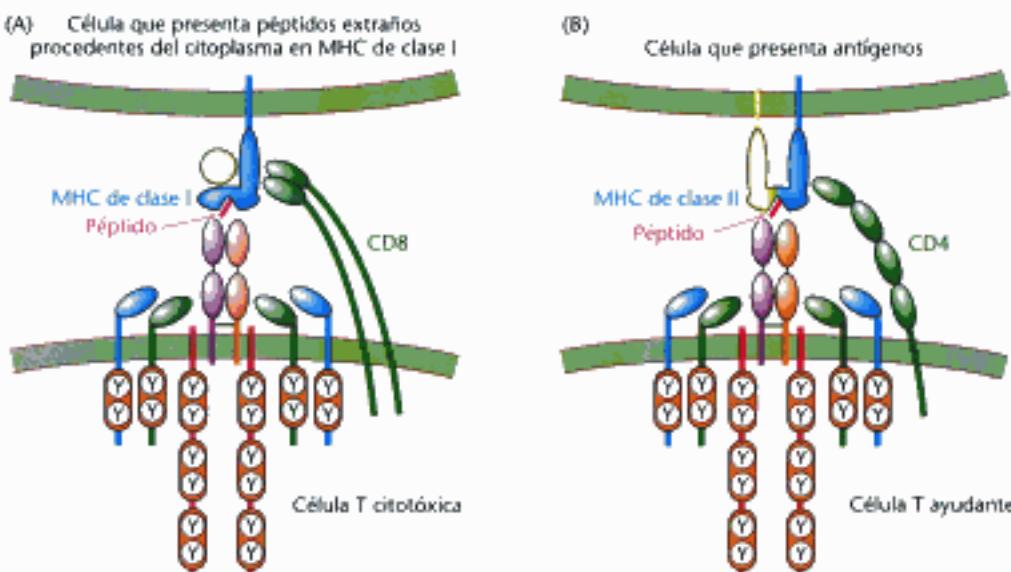


Figura 33.38 Variaciones sobre un tema. (A) Las células T citotóxicas reconocen péptidos foráneos expuestos por las proteínas MHC de clase I con la ayuda del correceptor CD8. (B) Con la ayuda del correceptor CD4, las células T ayudantes reconocen péptidos expuestos por las proteínas MHC de clase II de las células especializadas que presentan抗原s.

Hidden page

positora. Si todos los miembros de una especie tuviesen moléculas de clase I y de clase II idénticas, la población sería mucho más vulnerable a la destrucción por parte de un patógeno que haya mutado y que, por tanto, pueda evadir su presentación. La evolución del amplio repertorio de MHC humano ha venido determinada por la selección de aquellos miembros de la especie que resisten infecciones a las que otros miembros de la población son vulnerables.

Los virus de la inmunodeficiencia humana inutilizan el sistema inmunitario al destruir las células T ayudantes

 En 1981, se identificaron los primeros casos de una nueva enfermedad que ahora se conoce como *síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)*. Las víctimas morían de infecciones atípicas porque sus sistemas inmunitarios estaban inutilizados. Dos años después, Luc Montagnier y sus colaboradores identificaron la causa. El SIDA es provocado por el *virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)*, del que se conocen dos tipos principales: HIV-1 y el mucho menos frecuente HIV-2. Como otros *retrovirus*, el genoma de HIV consiste en un RNA de hebra sencilla que se replica por medio de un DNA intermedio de doble hebra. Este DNA vírico se integra en el genoma de la célula hospedadora. De hecho, los genes víricos sólo se transcriben una vez que se han integrado en el DNA del hospedador.

El virión de HIV está rodeado por una membrana que consta de una bicapa lipídica que alberga dos glicoproteínas: gp41, que atraviesa la membrana y que está asociada a gp120, localizada en la cara externa (Figura 33.41). El interior del virus contiene dos copias del RNA genómico junto con RNAs de transferencia así como varias moléculas de la transcriptasa inversa. Se encuentran rodeados de múltiples copias de dos proteínas denominadas p18 y p24. *La célula hospedadora de HIV es la célula T ayudante*. Las moléculas de gp120 de la membrana de HIV se unen a las moléculas CD4 de la superficie de la célula T ayudante (Figura 33.42). Esta interacción permite que la gp41 vírica asociada inserte su cabeza amino terminal en la membrana de la célula hospedadora. La membrana vírica y la membrana de la célula T ayudante se fusionan y el contenido del virus se vierte directamente en el citoplasma. La infección por HIV provoca la destrucción de las células T ayudantes porque la inserción de las glicoproteínas víricas y la gemación de las partículas del virus incrementan de manera notable la permeabilidad de la membrana plasmática del hospedador. La entrada de iones y de agua destruye el equilibrio iónico, provocando la lisis osmótica.

El desarrollo de una vacuna efectiva contra el SIDA es difícil debido a la diversidad antigenética de las cepas de HIV. Como su mecanismo de replicación es bastante propenso a cometer errores, una población de HIV presenta en su cubierta un conjunto de proteínas que cambia constantemente. De hecho, la tasa de mutación de HIV es por lo menos 65 veces mayor que la del virus de la gripe. A partir de personas asintomáticas infectadas por HIV se han aislado unos pocos anticuerpos capaces de neutralizar el virus. Algunos de estos anticuerpos presentan una forma atípica, descrita en la Sección 33.3, que les permite unirse a muchos tipos de HIV.

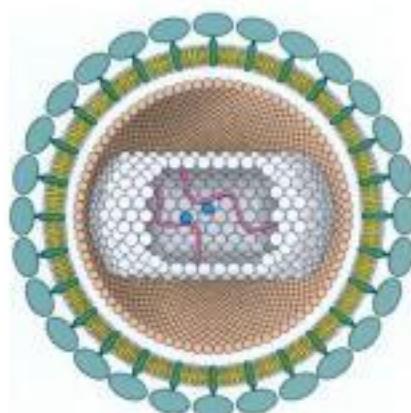


Figura 33.41 Virus de la inmunodeficiencia humana. Representación esquemática del HIV en la que se muestran las proteínas y los ácidos nucleicos que lo componen. Las glicoproteínas de la membrana que envuelve al virus, gp41 y gp120, se representan en color verde oscuro y verde claro. El RNA vírico se muestra en color rojo y las moléculas de la transcriptasa inversa en azul. [Según R. C. Gallo. The AIDS virus. Copyright © 1987 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

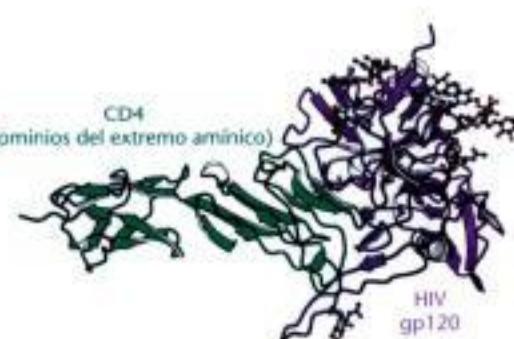


 Figura 33.42 Receptor del HIV. El complejo formado por una versión modificada de la glicoproteína gp120 de la envoltura de HIV y un péptido que corresponde a los dos dominios del extremo aminólico de la proteína CD4 de una célula T ayudante nos muestra cómo se inicia la infección vírica de las células T ayudantes. [Tomado de 1GC1.pdb.]

33.6 Las respuestas inmunitarias frente a antígenos propios se anulan

La función primordial del sistema inmunitario consiste en proteger al individuo de la invasión de organismos foráneos. Pero, ¿cómo consigue el sistema inmunitario evitar que se organicen ataques contra el organismo hospedador? En otras palabras, ¿Cómo distingue el sistema inmunitario lo propio de lo ajeno? Obviamente, las proteínas del propio organismo no llevan una etiqueta especial que las identifique como tales. En vez de ello, en las etapas tempranas del desarrollo de las células del sistema inmunitario existen procesos de selección que matan o anulan a aquellas células del sistema inmunitario que reaccionan intensamente con antígenos propios. El paradigma evolutivo sigue vigente; se generan células del sistema inmunitario que reconocen antígenos propios, pero los mecanismos de selección las eliminan durante el proceso de desarrollo.

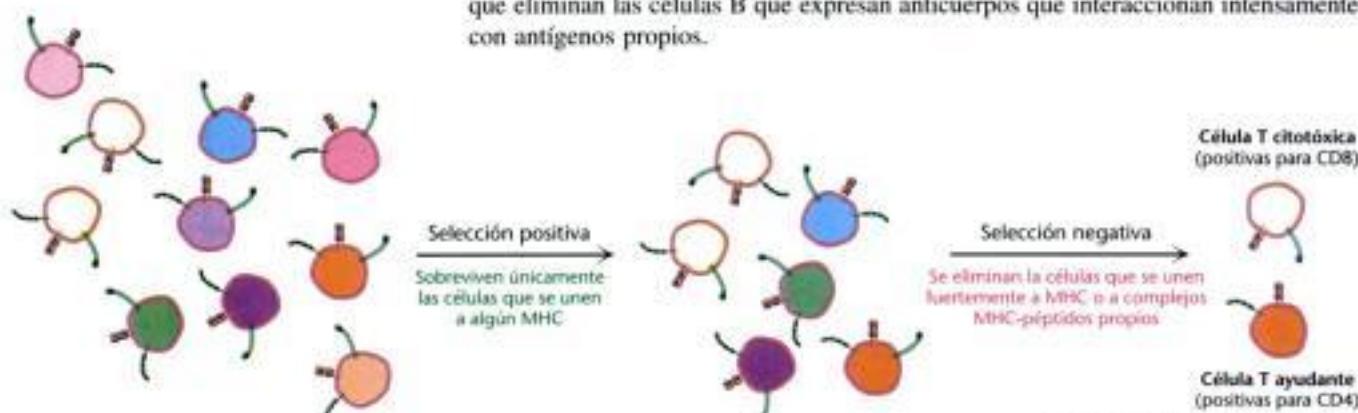
En el timo, las células T se someten a una selección positiva y a una selección negativa

El nombre de células T deriva del lugar en el que se producen: el timo, un pequeño órgano situado justo encima del corazón. El análisis de los procesos del desarrollo que conducen a la producción de células T citotóxicas y T ayudantes maduras pone de manifiesto los mecanismos de selección que resultan fundamentales a la hora de distinguir lo propio de lo ajeno. Estos criterios de selección son bastante rigurosos; aproximadamente el 98% de los timocitos, los precursores de las células T, mueren antes de completar el proceso de maduración.

Los timocitos producidos en la médula ósea no expresan el complejo receptor de las células T ni CD4 ni CD8. Una vez trasladados al timo y tras el reordenamiento de los genes de los receptores de las células T, los timocitos inmaduros expresan todas estas moléculas. En primer lugar, estas células se someten a una *selección positiva* (Figura 33.43). Las células cuyo receptor de las células T se puede unir con una afinidad razonable a las moléculas MHC de clase I o de clase II superan esta selección; aquéllas cuyo receptor de las células T no establece este tipo de interacción sufren un proceso de apoptosis y mueren. La función de la etapa de selección positiva consiste en evitar la producción de células T que no se unan a ninguno de los complejos MHC presentes, independientemente del péptido al que estén unidos.

La población de células que supera esta selección positiva es sometida a un segundo proceso, la *selección negativa*. En este caso, las células T que se unen con gran afinidad a complejos MHC-peptídos propios expresados sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos del timo sufren un proceso de apoptosis o se eliminan de alguna otra forma. Aquéllas que no se unen con demasiada avidez a ninguno de estos complejos MHC completan su desarrollo hasta convertirse en células T citotóxicas maduras (que sólo expresan CD8) o células T ayudantes maduras (que sólo expresan CD4). La etapa de selección negativa da lugar a la *autotolerancia*; las células que se unen a un complejo MHC-peptido propio desaparecen de la población de células T. Durante el desarrollo de las células B se aplican mecanismos similares que eliminan las células B que expresan anticuerpos que interactúan intensamente con antígenos propios.

Figura 33.43 Selección de células T. En primer lugar, se somete a una población de timocitos a una selección positiva que elimina las células que expresan receptores de las células T que no se unen a las proteínas MHC expresadas por el individuo. Posteriormente, las células que sobreviven se someten a una selección negativa que elimina las células que se unen fuertemente a los complejos formados por proteínas MHC unidas a péptidos propios.



Las enfermedades autoinmunitarias surgen a partir de la generación de respuestas inmunitarias frente a antígenos propios

Aunque la selección que tiene lugar en el timo es extraordinariamente eficiente a la hora de suprimir la respuesta inmunitaria frente a antígenos propios, se producen fallos. Estos errores dan lugar a las *enfermedades autoinmunitarias*. Entre estas enfermedades se encuentran algunas relativamente frecuentes como la diabetes mellitus insulinodependiente, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide. En estas enfermedades, las respuestas inmunitarias contra antígenos propios provocan daños en aquellos tejidos que expresan el antígeno (Figura 33.44).

En muchos casos, la razón por la que se generan anticuerpos o células T que reaccionan contra el propio organismo no está clara. Sin embargo, en otros casos, organismos infecciosos como bacterias o virus pueden desempeñar un papel. La infección provoca la generación de anticuerpos y células T que reaccionan con muchos epitopos distintos del organismo infeccioso. Si uno de estos antígenos resulta muy parecido a un antígeno propio se puede provocar una respuesta autoinmunitaria. Por ejemplo, algunas veces las infecciones de *Streptococcus* dan lugar a fiebres reumáticas debido a la producción de anticuerpos contra antígenos del estreptococo que dan lugar a reacciones cruzadas con epitopos expuestos en el músculo cardíaco.

El sistema inmunitario desempeña un papel en la prevención del cáncer

En determinadas circunstancias, el desarrollo de respuestas inmunitarias contra proteínas codificadas por nuestros propios genomas puede resultar beneficioso. Las células cancerosas han experimentado cambios significativos que, a menudo, dan lugar a la expresión de proteínas que normalmente no se expresan. Por ejemplo, la mutación de genes puede originar proteínas cuya secuencia de aminoácidos no corresponde a la de ninguna proteína normal. Estas proteínas pueden ser identificadas como foráneas y se generará una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra la célula cancerosa. Por otra parte, las células cancerosas a menudo producen proteínas que se expresan durante el desarrollo embrionario pero que después del parto no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos. Por ejemplo, una glicoproteína de membrana denominada *antígeno carcinoembriónico* (CEA) aparece en las células gastrointestinales de los fetos en desarrollo pero, después del parto, lo normal es que su expresión no alcance niveles significativos. Más del 50% de los pacientes con cáncer colorrectal presentan niveles elevados de CEA en sangre. Las células inmunitarias que reconocen los epitopos de esta proteína no se someterán a la selección negativa y, por tanto, en el estado adulto formarán parte del repertorio inmunitario. Estas células podrían desempeñar un papel de vigilantes contra el cáncer, eliminando de las células que sobreexpresan antígenos como el CEA y evitando el desarrollo de las células genéticamente defectuosas que puedan dar lugar a tumores.

Resumen

Existen dos líneas de defensa frente a los patógenos: el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo. El sistema inmunitario innato va dirigido contra características presentes en multitud de patógenos distintos pero pasa por alto a aquellos patógenos que carecen de tales características. El sistema inmunitario adaptativo es más específico y su espectro de actividad es más amplio. Para responder de forma efectiva ante un amplio conjunto de patógenos, este tipo de sistema inmunitario debe ser tremadamente versátil. En el sistema inmunitario adaptativo, la adaptación se rige por los principios de la evolución: se genera un conjunto enormemente variado de proteínas potencialmente útiles; posteriormente estas proteínas se someten a una selección intensa de modo que sólo proliferan y continúan con su desarrollo

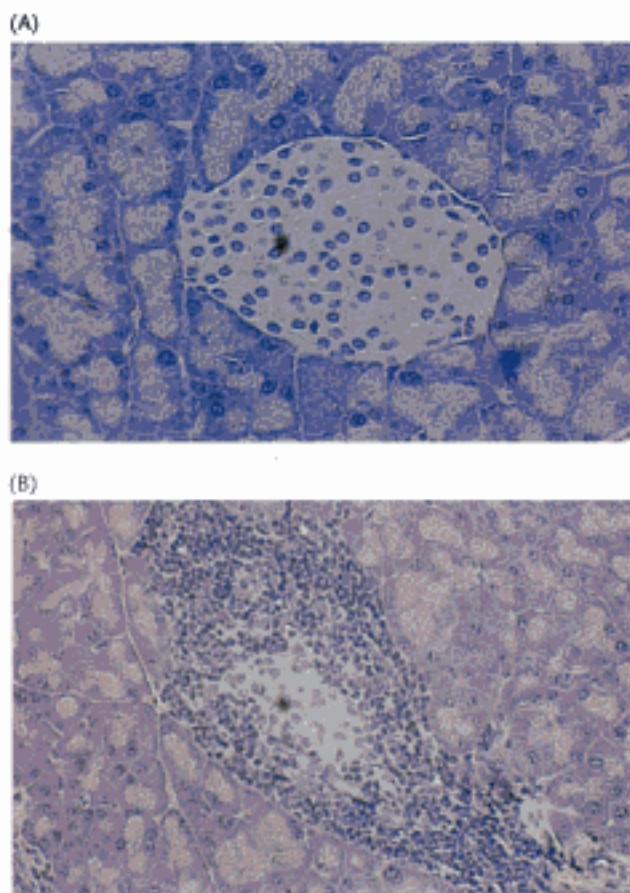


Figura 33.44 Consecuencias de la autoinmunidad. Micrografías de un islote de Langerhans (A) en el páncreas de un ratón normal y (B) en el páncreas de un ratón con una respuesta inmunitaria contra células β pancreáticas, lo que provoca una enfermedad que recuerda a la diabetes mellitus insulinodependiente en humanos. [Tomado de M. A. Atkinson y N. K. Macclaren. What causes diabetes? Copyright © 1990 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.]

las células que expresan proteínas útiles, hasta que se genera una respuesta inmunitaria eficaz frente a un invasor específico.

33.1 Los anticuerpos poseen dos unidades distintas: una que se une al antígeno y otra efectora

La principal immunoglobulina del suero es la immunoglobulina G. Una proteína IgG es un heterotetrámero con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El tratamiento de las moléculas de IgG con proteasas como la papaina origina tres fragmentos: dos fragmentos F_{ab} que mantienen su capacidad para unirse a antígenos y un fragmento F_c que conserva su capacidad para activar funciones efectoras como el inicio de la cascada del complemento. Los fragmentos F_{ab} contienen una cadena L y la mitad amino terminal de la cadena H; el dominio F_c es un dímero formado por las mitades carboxilo terminales de dos cadenas H. Los cinco tipos distintos de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) se distinguen por sus cadenas pesadas, y por tanto, por sus funciones efectoras.

33.2 El plegamiento de inmunoglobulina está formado por un armazón con estructura de sándwich beta que contiene bucles hipervariables

En muchas de las proteínas fundamentales del sistema inmunitario encontramos un determinado tipo de plegamiento proteico. El plegamiento de inmunoglobulina consta de un par de hojas β enfrentadas entre sí, conectadas mediante un único puente disulfuro. Los bucles que se proyectan a partir de uno de los extremos de la estructura forman una superficie de unión que puede variar al cambiar las secuencias de los aminoácidos presentes en los bucles. Los dominios con plegamiento de inmunoglobulina se combinan para originar anticuerpos y otros tipos de proteínas del sistema inmunitario entre las que se incluyen los receptores de las células T.

33.3 Los anticuerpos se unen a moléculas específicas por medio de sus bucles hipervariables

Dos cadenas se juntan para formar la superficie de unión de un anticuerpo. Tres bucles de cada dominio, las regiones determinantes de la complementariedad, forman una superficie prácticamente continua que puede variar enormemente de forma, de carga y de otras características para permitir que determinados anticuerpos se unan tanto a moléculas pequeñas como a amplias superficies proteicas.

33.4 La diversidad surge por los reordenamientos de los genes

La tremenda diversidad de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos se genera mediante el reordenamiento de segmentos génicos. En el caso de las cadenas ligeras κ de los anticuerpos, una de las 40 regiones variables se junta con una de las cinco regiones de empalme. Posteriormente, la unidad VJ resultante se empalma con la región constante. De esta manera se pueden generar miles de genes distintos. Series similares de fragmentos se reordenan para formar los genes de las cadenas pesadas pero, en este caso, entre las regiones V y J se ubica una región adicional, la llamada región de diversidad. La combinación de cadenas L y H, cada una generada a partir de este tipo de genes reorganizados, puede originar más de 10^8 anticuerpos distintos. También se pueden generar diversos tipos de anticuerpos mediante el reordenamiento de los genes que provocan un cambio de tipo. La oligomerización de moléculas de anticuerpo unidas a la membrana inicia una cascada de transducción de señales en el interior de las células B. Entre las etapas fundamentales de este proceso de señalización se incluye la fosforilación de residuos específicos de tirosina, localizados en unas secuencias denominadas motivos de activación del inmunorreceptor basados en la tirosina, presentes en las proteínas asociadas a los anticuerpos unidos a la membrana.

33.5 Las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad exponen antígenos peptídicos en la superficie de las células para que los receptores de las células T los reconozcan

Los patógenos intracelulares como micobacterias o virus no pueden detectarse fácilmente. En los proteasomas, las proteínas intracelulares se están cortando

constantemente en péptidos más pequeños que son expuestos sobre la superficie de las células por medio de las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Estos péptidos se localizan en un surco que en las proteínas MHC de clase I está delimitado por dos hélices. El complejo formado por una proteína MHC y un péptido se puede unir a un receptor de las células T apropiado. La estructura de los receptores de las células T recuerda a la de los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos, y la diversidad de las secuencias de los receptores de las células T se genera mediante reordenamientos génicos V(D)J. El receptor de las células T reconoce características tanto del péptido como de la molécula MHC que lo presenta. Las células T citotóxicas inician la apoptosis de aquellas células a las que se han unido por medio de interacciones entre el receptor de las células T y los complejos MHC de clase I-peptido, interacciones en las que también participan moléculas del coreceptor CD8. Las células T ayudantes reconocen péptidos presentados por las proteínas MHC de clase II, un tipo distinto de proteínas MHC que se expresa únicamente en las células que presentan抗igenos, como las células B y los macrófagos. Las células T ayudantes expresan el coreceptor CD4 en vez de CD8. CD4 interacciona con las proteínas MHC de clase II presentes en las células que presentan抗igenos. Las vías de señalización, análogas a las de las células B, se iniciaron por medio de las interacciones que establecen los complejos MHC-peptido con los receptores de las células T y con los coreceptores CD8 y CD4. El virus de la inmunodeficiencia humana provoca daños en el sistema inmunitario al infectar células que expresan CD4, como las células T ayudantes.

33.6 Las respuestas inmunitarias frente a抗igenos propios se anulan

En principio, el sistema inmunitario es capaz de generar anticuerpos y receptores de las células T que se unen a moléculas propias, es decir, moléculas que se encuentran normalmente en un individuo sano no infectado. Los mecanismos de selección impiden que el nivel de expresión de estas moléculas dirigidas contra el propio organismo sea elevado. El proceso de selección incluye una selección positiva, que enriquece la población de células que expresan moléculas capaces de unirse a抗igenos foráneos en un contexto apropiado, y una selección negativa, que elimina las células que expresan moléculas con una afinidad demasiado elevada para los抗igenos propios. Las enfermedades autoinmunitarias como la diabetes mellitus insulinodependiente pueden ser el resultado de la amplificación de una respuesta frente a un抗igeno propio.

Términos clave

sistema inmunitario innato (p. 945)	flexibilidad de los segmentos (p. 950)	complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (p. 961)
sistema inmunitario adaptativo (p. 945)	imunoglobulina M (IgM) (p. 951)	proteína MHC de clase I (p. 961)
receptor de tipo Toll (p. 946)	imunoglobulina A (IgA) (p. 951)	antígeno de leucocitos humanos (HLA) (p. 962)
patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) (p. 946)	imunoglobulina D (IgD) (p. 951)	microglobulina β_2 (p. 962)
lípido A (p. 946)	imunoglobulina E (IgE) (p. 951)	receptor de las células T (p. 963)
respuesta inmunitaria humoral (p. 947)	región constante (p. 952)	CD8 (p. 964)
linfocito B (célula B) (p. 948)	región variable (p. 952)	perforina (p. 965)
antígeno (p. 948)	plegamiento de imunoglobulina (p. 952)	granzima (p. 965)
determinante antigenético (epítopo) (p. 948)	bucle hipervariante (p. 952)	célula T ayudante o auxiliar (p. 965)
respuesta inmunitaria celular (p. 948)	región determinante de la complementariedad (CDR) (p. 952)	proteína MHC de clase II (p. 966)
linfocito T citotóxico (célula T asesina) (p. 948)	recombinación V(D)J (p. 957)	CD4 (p. 966)
linfocito T ayudante (p. 948)	motivo de activación del inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM) (p. 958)	virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (p. 969)
cadena pesada (H) (p. 949)	ciclosporina (p. 959)	selección positiva (p. 970)
imunoglobulina G (IgG) (p. 949)	hapteno (p. 960)	selección negativa (p. 970)
F _{ab} (p. 949)	cambio de tipo (p. 960)	enfermedad autoinmunitaria (p. 971)
F _c (p. 949)	célula T (p. 961)	antígeno carcinoembriónico (CEA) (p. 971)
cadena ligera (L) (p. 949)		

Hidden page

Hidden page

cionar con epitopos del virus y que el gasto de energía libre necesario para adoptar un ángulo favorable de la bisagra es de $12,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (3 kcal mol^{-1}).

6. *Minianticuerpo*. El fragmento F_{ab} de una molécula de anticuerpo tiene prácticamente la misma afinidad hacia un haptene monovalente que la IgG intacta.

- (a) ¿Cuál es la parte más pequeña de un anticuerpo que puede conservar la especificidad y la afinidad de unión de la proteína completa?
- (b) Diseñar una proteína compacta y con una única cadena que pueda unirse de manera específica y con gran afinidad a un antígeno.

7. *Activación de las células B*. La unión de antígenos polivalentes a receptores de su superficie desencadena la proliferación de los linfocitos B, los precursores de las células del plasma. Los receptores de la superficie celular son immunoglobulinas que atraviesan la membrana. Por el contrario, los antígenos monovalentes no activan a las células B.

- (a) ¿Qué indican estos hallazgos acerca del mecanismo de activación de las células B?
- (b) ¿Cómo se podrían utilizar anticuerpos para que activen a las células B?

8. *Una ingeniosa estrategia de clonaje*. Al clonar el gen de la cadena α de un receptor de las células T, se hibridaron los cDNAs de células T con mRNAs de células B. ¿Cuál era el objetivo de esta etapa de hibridación? ¿Podría utilizarse este principio con carácter general?

9. *Instrucción*. Antes de establecerse el mecanismo para la generación de diversidad en los anticuerpos, Linus Pauling propuso, por vez primera, un mecanismo basado en el plegamiento de la proteína en torno a un antígeno. En este modelo, anticuerpos con especificidades distintas tenían la misma secuencia de aminoácidos, pero estaban plegados de distinta forma. Proponer un experimento que ponga a prueba este modelo.

10. *Sinsentidos*. Las células, incluyendo las del sistema inmunitario, degradan las moléculas de mRNA que carecen de un marco de lectura abierto largo. Este proceso se denomina degradación mediada por RNA carente de significado. Sugerir un papel para este proceso en las células del sistema inmunitario.

11. *Cristalización*. La digestión proteolítica de una población de moléculas de IgG purificada a partir de suero humano origina fragmentos F_{ab} y F_c . ¿Por qué cristalizan más fácilmente los fragmentos F_c que los fragmentos F_{ab} procedentes de esa población?

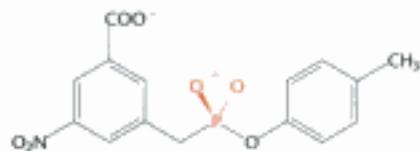
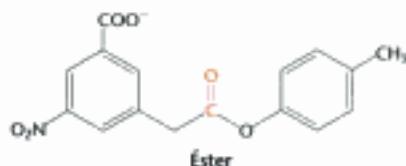
12. *Presentación*. La secuencia de aminoácidos de una proteína pequeña es:

MSRLASKNLIRSDHAGGLLQATYSVSS-
IKNTMSPGAWSNAALNDSRDA

Predecir el péptido que tiene más probabilidad de ser presentado por la molécula MHC de clase I HLA-A2.

Problema de Mecanismos

13. *Anticuerpo catalítico*. Se genera un anticuerpo contra uno de los estados de transición de la hidrólisis del siguiente éster.



Análogo del estado de transición

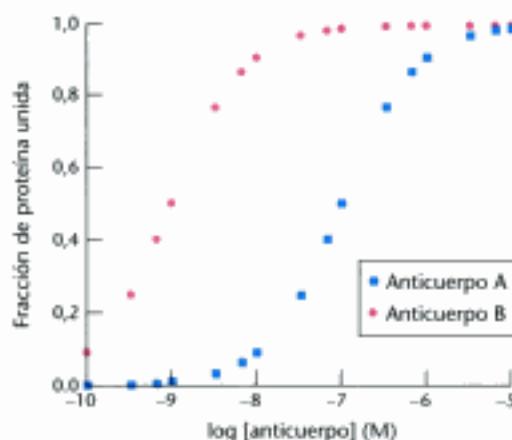
Algunos de estos anticuerpos catalizan la hidrólisis del éster. ¿Qué residuo de aminoácido se podría encontrar en el lugar de unión del anticuerpo?

Problema de Integración del Capítulo

14. *Señalización*. Las fosfatases de tirosina, como la molécula CD45 expresada tanto en células B como en células T, desempeñan una función importante en la activación de tirosina quinasas como Fyn y Lck, que son bastante parecidas a Src. Sugerir un mecanismo para la activación de estas proteínaquininas mediante la eliminación de un grupo fosforilo procedente de un residuo de fosftotirosina.

Problema de Interpretación de datos

15. *Maduración de la afinidad*. Se inmuniza un ratón con una proteína humana oligomérica. Poco después de la inmunización, surge una línea celular que expresa un único tipo de moléculas de anticuerpo (anticuerpos A). Se ensaya la capacidad de los anticuerpos A para unirse a la proteína humana y los resultados se muestran en el siguiente gráfico.



Tras repetidas inmunizaciones con la misma proteína, surge otra línea celular que expresa un anticuerpo distinto (el anticuerpo B). Los resultados del análisis de la unión del anticuerpo B a la proteína también se muestran en el gráfico. Estimar, a partir de estos datos,

- (a) La constante de disociación (K_d) para el complejo formado por la proteína y el anticuerpo A.
- (b) La constante de disociación para el complejo formado por la proteína y el anticuerpo B.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos A y B pone de manifiesto que son idénticas salvo por un único aminoácido. ¿Qué sugiere este hallazgo acerca del mecanismo mediante el cual se origina el gen que codifica el anticuerpo B?

Hidden page

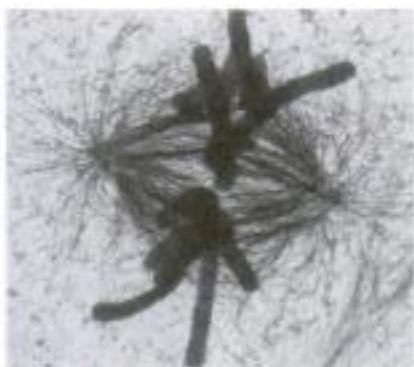


Figura 34.1 Movimiento en el interior celular. Esta micrografía electrónica de alto voltaje muestra el aparato mitótico en la metafase de una célula de mamífero. Los objetos cilíndricos grandes son los cromosomas, y las estructuras en hebra que se esparcen desde el centro son los microtúbulos: guías para los motores moleculares que desplazan los cromosomas. Muchos procesos, incluida la segregación de los cromosomas durante la mitosis, dependen de la acción de los motores moleculares proteicos. [Cortesía de J. R. McIntosh.]

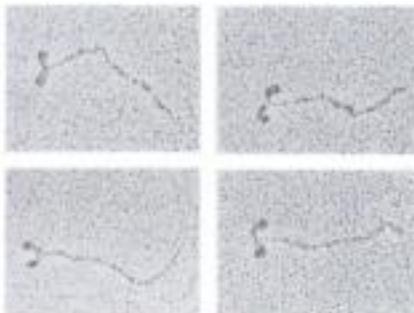


Figura 34.2 Estructura de la miosina a baja resolución. Las micrografías electrónicas de la miosina muestran una estructura con dos cabezas con una larga y fina cola. [Cortesía de la Dra. Paula Flicker, Dr. Theo Walliman y Dr. Peter Vibert.]

Las proteínas motrices oscilan entre formas con gran afinidad o de baja afinidad por la secuencia del filamento como respuesta a la unión e hidrólisis de ATP, facilitando un enlace, tracción y mecanismos de liberación que generan el movimiento.

Estudiaremos, también, otra estrategia para generar movimiento completamente diferente, la utilizada por una bacteria, tal como *E. coli*. Como propulsores actúan un conjunto de flagelos, que giran accionados por un motor situado en la membrana celular. Este motor obtiene su energía a partir de un gradiente de protones a través de membrana, en vez de hidrolizar ATP. El mecanismo para acoplar el gradiente de protones al movimiento rotativo es análogo al que utiliza la subunidad F_0 de la ATP sintasa (p. 522). Así pues, los dos modos principales de almacenar energía bioquímica—ATP y gradiente de iones—han sido utilizados en la evolución para generar un movimiento molecular organizado.

34.1 La mayoría de las proteínas de los motores moleculares son miembros de la superfamilia de las NTPasas con lazo P

Las células eucarióticas contienen tres familias principales de proteínas motrices: miosinas, quinesinas y dineínas. A primera vista, estas familias de proteínas parecen ser bastante diferentes unas de otras. La *miosina*, caracterizada inicialmente por su papel en el músculo, se desplaza a lo largo de los filamentos proteicos de actina. La miosina muscular está formada por dos copias de una *cadena pesada*, cada una de ellas con una masa molecular de 87 kd, una *cadena ligera esencial*, y una *cadena ligera reguladora*. El genoma humano parece codificar más de 40 tipos distintos de miosina; algunos con funciones en la contracción muscular y otros que participan en una serie de procesos diversos. Las *quinesinas*, con funciones de transporte de proteínas, mRNAs, vesículas y orgánulos, incluida la construcción del huso mitótico, la segregación de los cromosomas, a menudo están formadas por dos polipéptidos. El genoma humano codifica más de 40 quinesinas. Las *dineínas* son los motores en el movimiento de cilios y flagelos y una dineína citoplasmática universal contribuye a una serie de movimientos en todas las células, que incluyen el transporte de vesículas y varios procesos de transporte en la mitosis. Las dineínas son enormemente grandes, con cadenas pesadas de más de 500 kd. El genoma humano parece que codifica unas 10 dineínas.

La comparación de las secuencias aminoacídicas de las miosinas, quinesinas y dineínas no muestra relaciones significativas entre estas familias de proteínas, pero tras el análisis de las estructuras tridimensionales, se encontró que los miembros de las familias de miosinas y quinesinas presentan importantes similitudes. En concreto, tanto las miosinas como las quinesinas presentan núcleos de NTPasa con lazo P homólogos a los encontrados en las proteínas G. El análisis de la secuencia de la cadena pesada de la dineína revela que es miembro de la subfamilia AAA de las NTPasas con lazo P que ya estudiamos anteriormente con el proteasoma 19S (p. 653). La dineína presenta seis secuencias que codifican tales dominios NTPasa con lazo P distribuidas a lo largo de la hebra aminoacídica. Así pues, para analizar los mecanismos de acción de estos motores proteicos nos basaremos en nuestro conocimiento de las proteínas G y de otras NTPasas con lazo P.

Un motor proteico está formado por un núcleo ATPasa y una estructura extendida

Consideremos en primer lugar la estructura de la miosina. Los resultados de los estudios mediante microscopía electrónica de la miosina del músculo esquelético muestran que tiene una estructura con dos cabezas unida a una larga cola (Figura 34.2). Tal como vimos en el Capítulo 33, la proteólisis parcial puede ser una herramienta muy útil para determinar la actividad de las proteínas grandes. Tratando la miosina con tripsina y papaína se obtienen cuatro fragmentos: dos fragmentos S1, un frag-

Hidden page



superenrollamiento de dos cadenas a partir de los fragmentos restantes de las dos cadenas pesadas que se enrollan una sobre otra (Figura 34.6). Estas estructuras, que en conjunto tienen una longitud de unos 1700 Å, unen las cabezas de la miosina a otras estructuras. En la miosina muscular, varios dominios LMM se agrupan para formar haces fibrosos de orden superior.

La *quinesina convencional* (quinesina 1), la primera quinesina descubierta, tiene una estructura que presenta varias características comunes con la miosina. El dímero de proteína muestra dos cabezas unidas a una estructura extendida (cola). El tamaño del dominio de las cabezas es aproximadamente la tercera parte del correspondiente a la miosina. La determinación de su estructura tridimensional ha permitido conocer que su motor proteico, también está basado en un núcleo de NTPasa con lazo P (Figura 34.8). El dominio de la miosina es mucho mayor que el correspondiente a la quinesina debido a la inserción de dos grandes fragmentos. En la quinesina convencional, al dominio de la cabeza le sigue una región de unos 500 aminoácidos. De un modo similar a la región correspondiente de la miosina, la estructura extendida de la quinesina forma un α -helicoide de hebras enrolladas. Pero a diferencia de la miosina, la región α -helicoide directamente adyacente al dominio de la cabeza no es la región de unión para las cadenas ligeras de la quinesina. En vez de ello, las cadenas ligeras de la quinesina, si están presentes, se unen en una zona próxima al carboxilo terminal y están diseñadas para enlazar el motor a su carga intracelular.

La dineína tiene una estructura bastante diferente. Tal como se ha visto antes, la cadena pesada de la dineína presenta seis regiones homólogas a la subfamilia AAA de los dominios NTPasa. Aunque de momento no se disponen de datos cristalográficos, los resultados de los estudios con microscopía electrónica y de comparación con las estructuras conocidas de otras ATPasas AAA han hecho posible la construcción de un modelo estructural para la cabeza de la dineína (Figura 34.8). El dominio de la cabeza está anexado a una estructura extendida de unos 1.300 aminoácidos que enlaza las unidades de dineína para formar oligómeros y que interacciona con otras proteínas.

Figura 34.6 Helicoide de dos hebras superenrolladas de la miosina. Las dos α -hélices enrolladas una sobre otra forman estructuras superenrolladas a izquierdas. Estas estructuras se estabilizan mediante residuos hidrofóbicos en los puntos de contacto entre las dos hélices. [Tomado de 2TMA.pdb.]

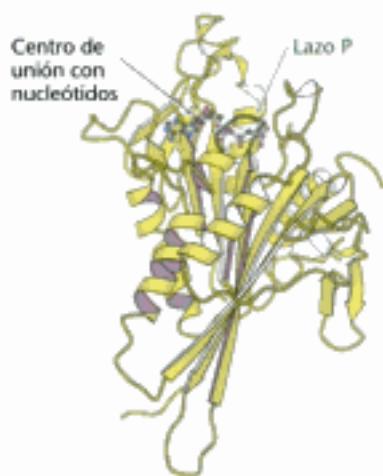


Figura 34.7 Estructura del dominio de la cabeza de la quinesina a alta resolución. El dominio de la cabeza de la quinesina tiene la estructura de un núcleo NTPasa con lazo P (resultado por el sombreado en púrpura). [Tomado de 1I6I.pdb.]

La unión y la hidrólisis del ATP inducen cambios conformacionales y de afinidad de unión en los motores proteicos

Una característica clave de las NTPasas con lazo P, tales como las proteína G, es que pueden sufrir cambios estructurales como consecuencia de la unión a NTP y a su hidrólisis. Aún más, estos cambios estructurales modifican la afinidad de unión a otras moléculas. Así pues, no es de extrañar que los dominios NTPasa de los motores pro-

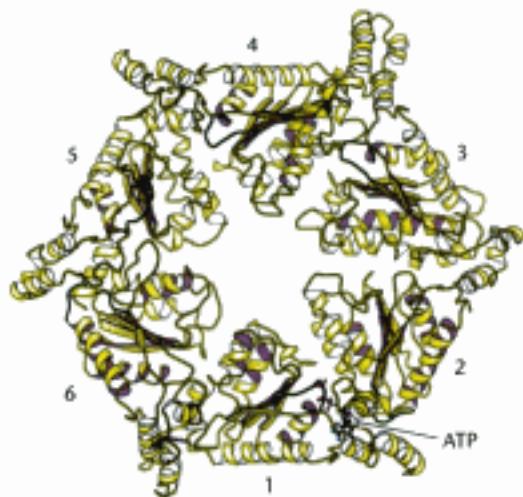


Figura 34.8 Modelo del dominio de la cabeza de la dineína. En este modelo del dominio de la cabeza de la dineína, el ATP se une al primero de los seis dominios NTPasa con lazo P (están numerados). El modelo se basa en las micrografías electrónicas y en las estructuras de otros miembros de la familia de las ATPasas AAA. La función precisa de los seis centros no se conoce con exactitud. [Tomado de 1HNS.pdb.]

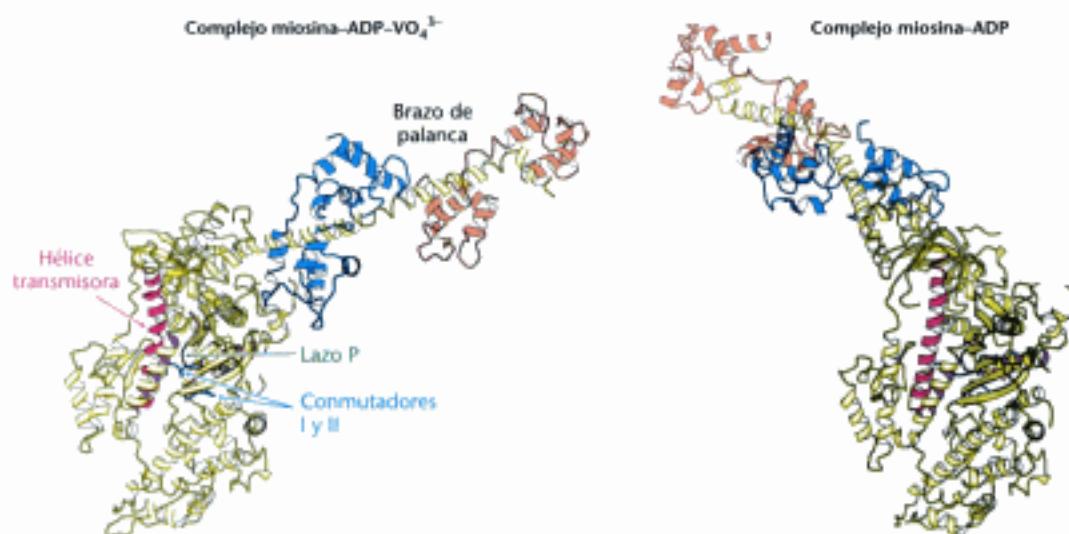


Figura 34.9 Movimiento del brazo de palanca. Dos formas del fragmento S1 de la miosina del músculo de vieira. Al variar la naturaleza del nucleótido unido de ADP- VO_4^{3-} a ADP o viceversa se observan grandes cambios conformativos, incluida la reorientación de unos 90 grados del brazo de palanca. [Tomado de 1DFL.pdb y 1B7T.pdb.]

teicos presenten respuestas análogas al unirse a nucleótidos. El fragmento S1 de la miosina del músculo de la vieira es un vistoso ejemplo de estos cambios (Figura 34.9). Se ha determinado la estructura del fragmento S1 unido al complejo formado por ADP y vanadato (VO_4^{3-}), que es un análogo del ATP, o, más concretamente del estado de transición en la hidrólisis del ATP. En presencia del complejo ADP- VO_4^{3-} , la larga hélice que une las cadenas ligeras (de aquí en adelante nos referiremos a ella como *brazo de palanca*) emerge hacia afuera del dominio de la cabeza. En presencia de ADP sin VO_4^{3-} , el brazo de palanca se encuentra rotado unos 90 grados con relación a su posición con el complejo ADP- VO_4^{3-} . ¿Cómo puede producir esta gran transición la identidad de las especies del centro de unión a nucleótidos? Alrededor del centro de unión a nucleótidos, dos regiones se posicionan próximas al grupo γ -fosfato del ATP y adoptan una conformación más distendida que cuando está ausente dicho grupo (Figura 34.10). Este cambio conformativo permite encajarse en esta posición a la α -hélice larga (denominada *hélice transmisora - hélice relé*). El extremo carboxilo terminal de la hélice transmisora interacciona con las estructuras de la base del brazo de palanca, y mediante un cambio en la posición de la hélice transmisora permite una reorientación del brazo de palanca.

La unión con el ATP disminuye de forma significativa la afinidad de la cabeza de la miosina por los filamentos de actina. Hasta el momento no ha sido posible determinar la estructura a alta resolución de los complejos miosina-actina, por tanto el mecanismo básico de este cambio permanece desconocido. Sin embargo, el extremo amino terminal de la hélice repetidora interacciona con los dominios de la miosina que se unen a la actina, lo cual claramente sugiere una vía para el acoplamiento entre la unión con nucleótidos y los cambios en la afinidad por la actina. La importancia de los cambios en la afinidad por la actina se pondrán en evidencia cuando estudiemos el papel de la miosina en la producción directa del movimiento (Sección 34.2).

En la quinesina ocurren cambios conformativos análogos. Las quinesinas, también, tienen una hélice transmisora que puede adoptar configuraciones diferentes cuando la quinesina se une a

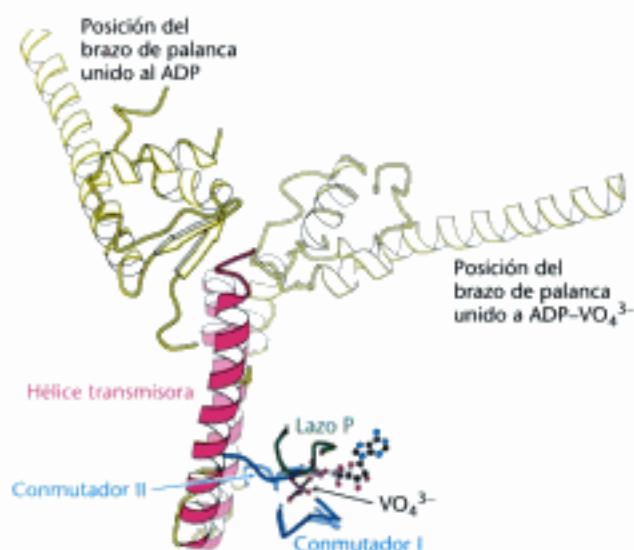


Figura 34.10 Hélice transmisora. La superposición de elementos clave en las dos formas de la miosina de vieira muestra los cambios estructurales transmitidos por la hélice repetidora desde los comutadores I y II al brazo de palanca. Los comutadores I y II interactúan con el VO_4^{3-} en el lugar que sería ocupado por el grupo γ -fosfato del ATP. La estructura del complejo miosina-ADP- VO_4^{3-} se representa en colores pálidos.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Mediante cristalografía de rayos X a resolución atómica se ha determinado la estructura del monómero de actina y estos estudios se han utilizado para interpretar la estructura de los filamentos de actina que previamente ya se habían estudiado mediante microscopía electrónica a baja resolución. Cada monómero de actina presenta cuatro dominios (Figura 34.15). Estos dominios de aproximan unos a otros rodeando a un nucleótido enlazado, que puede ser ATP o ADP. La forma ATP se convierte en la de ADP por hidrólisis.

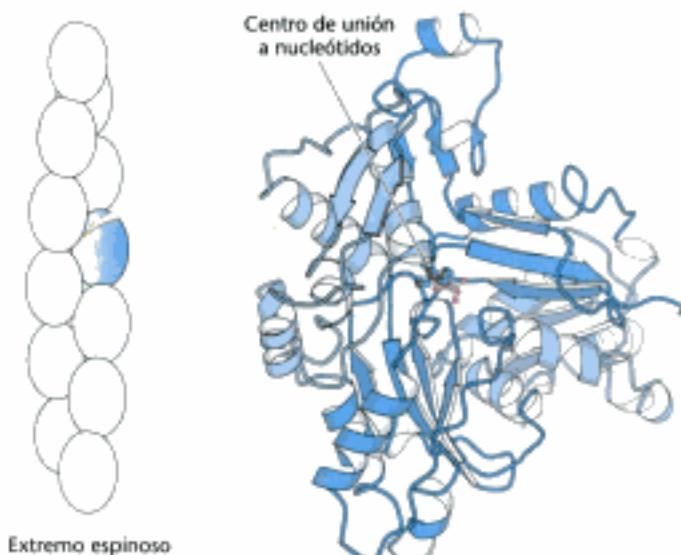


Figura 34.15 Estructura de la actina.
 (Izquierda) Visión esquemática de algunos monómeros de actina de un filamento de actina, (uno de ellos sombreado en azul) (Derecha) Los dominios en la estructura de cuatro dominios del monómero de actina se representan mediante tonos azules diferentes. [Tomado de 1J6Z.pdb.]

Los monómeros de actina (denominados frecuentemente *actina-G* por su forma globular) se reúnen para formar los filamentos de actina (denominados *actina-F*, fibrosa; ver Figura 34.15). La actina-F presenta una estructura helicoidal; cada monómero se relaciona con el precedente mediante una traslación de 27,5 Å y una rotación de 166 grados alrededor del eje de la hélice. Dado que la rotación es próxima a 180 grados, la actina-F se asemeja a un filamento de dos hebras. Se debe resaltar que cada monómero de actina está orientado a lo largo del filamento de actina-F en la misma dirección, y en consecuencia la estructura es polar, con extremos claramente diferenciables. Un extremo es el denominado extremo espinoso (más), y el otro es el denominado extremo apuntado (menos). Los nombres de "espinoso" y "apuntado" hacen referencia al aspecto del filamento de actina cuando los fragmentos S1 de la miosina están unidos a él.

¿Cómo se forman los filamentos de actina? Al igual que muchas estructuras biológicas, los filamentos de actina son auto-ensamblables; es decir, en condiciones adecuadas, los monómeros de actina se reúnen para formar filamentos polares bien estructurados. La agregación de los dos o tres primeros monómeros es muy desfavorable. Así pues, unos complejos proteicos especializados, incluyendo uno denominado Arp 2/3, sirven en las células como núcleo de asociación para la actina. Una vez formado el núcleo inicial del filamento, la adición de los sucesivos monómeros está más favorecida. Estudiemos la reacción de polimerización con mayor detalle. Supongamos un filamento de actina con n subunidades, A_n . A este filamento se le puede añadir otro monómero de actina, A, para dar A_{n+1} .

$$K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]}$$



Para esta reacción, la constante de disociación, K_d , define las concentraciones de monómero para las cuales puede ocurrir la reacción, ya que la concentración de polímeros de longitud $n + 1$ será prácticamente igual a la de los polímeros de longitud n . Luego,

$$[A_n] \sim [A_{n+1}] \text{ y por tanto } K_d = \frac{[A_n][A]}{[A_{n+1}]} = \sim [A]$$

Dicho de otro modo, la reacción de polimerización tendrá lugar hasta que la concentración de monómeros se reduzca hasta el valor de K_d . Si la concentración de monómeros es menor del valor de K_d , la reacción de polimerización se detendrá; en efecto, los filamentos existentes se despolimerizarán hasta que el valor de la concentración de monómeros alcance el valor de K_d . Teniendo en cuenta este fenómeno, a K_d se le denomina *concentración crítica* para el polímero. Se debe recordar que la actina contiene un centro de unión a nucleótidos que puede contener tanto ATP como ADP. La concentración crítica para el complejo actina-ATP es aproximadamente 20 veces menor que la del complejo actina-ADP, la actina-ATP se polimeriza más rápidamente que la actina-ADP.

En el interior celular los filamentos de actina son estructuras muy dinámicas que están continuamente ganando y perdiendo monómeros. La polimerización de la actina-ATP se puede iniciar con la nucleación por complejos, tales como Arp 2/3. Por el contrario, la hidrólisis del ATP unido hasta ADP favorece la despolimerización. Esta reacción actúa como marcador de tiempos para hacer cinéticamente inestables a los filamentos de actina. Hay proteínas que realizan su función, uniéndose a los monómeros de actina o bien promoviendo la separación de los filamentos de actina. Las reacciones de polimerización pueden ejercer fuerzas, empujando o tirando, sobre las membranas celulares. *La polimerización regulada de la actina es clave para los cambios de la forma celular asociados a la motilidad celular en las amebas así como en células humanas, como los macrófagos.*

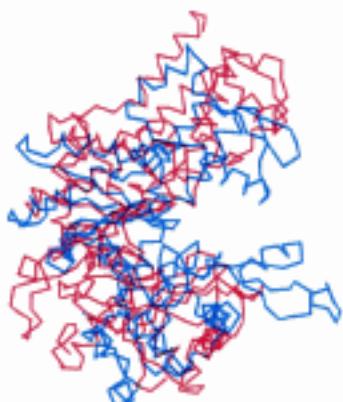
 La existencia de un citoesqueleto bien definido es característica de los eucariotas; los procariotas carecen de estas estructuras. ¿Cómo evolucionaron los filamentos de actina? La comparación de la estructura tridimensional de la actina-G con la de otras proteínas mostró marcadas similitudes con algunas, incluidas las quinasas de azúcares como la hexoquinasa (Figura 34.16; ver también la p. 437). Es notable que el centro de unión a nucleótidos de la actina se corresponde con el centro de unión a ATP de la hexoquinasa. Así pues, la actina evolucionó a partir de un enzima que utilizaba ATP como sustrato.

Recientemente, se ha caracterizado un homólogo procariótico de la actina. Esta proteína, denominada MreB, desempeña un papel importante en la determinación de la forma celular en los bacilos, bacterias filamentosas y helicoidales. Las estructuras internas formadas por la MreB recuerdan al citoesqueleto de actina de los eucariotas, aunque están menos difundidas. Incluso aunque la secuencia de esta proteína solamente es idéntica en un 15% con respecto a la actina, la MreB se pliega con una estructura tridimensional muy similar. También, se polimeriza en estructuras en diversos aspectos similares a la actina-F, incluida la alineación de los monómeros que la componen.

Los movimientos de las proteínas motrices aisladas se pueden observar directamente

La contracción muscular es un proceso complejo, en el que intervienen muchas moléculas diferentes de miosina. Los estudios relativos al movimiento de *moléculas de miosina aisladas* a lo largo de filamentos de actina han aportado un conocimiento en profundidad sobre el mecanismo de la contracción muscular y otros procesos complejos.

Una poderosa herramienta para estos estudios es la denominada *trampa óptica*, que se basa en la utilización de rayos láser con un enfoque muy preciso (Figura 34.17). Con ella se pueden inmovilizar pequeñas esferas y mantenerlas en una posición determinada en la disolución.



 **Figura 34.16 Actina y hexoquinasa.** La comparación entre la actina (en azul) y la hexoquinasa de levadura (en rojo) muestra similitudes estructurales que indican una homología. Ambas proteínas presentan una profunda hendidura donde se unen los nucleótidos.

Hidden page

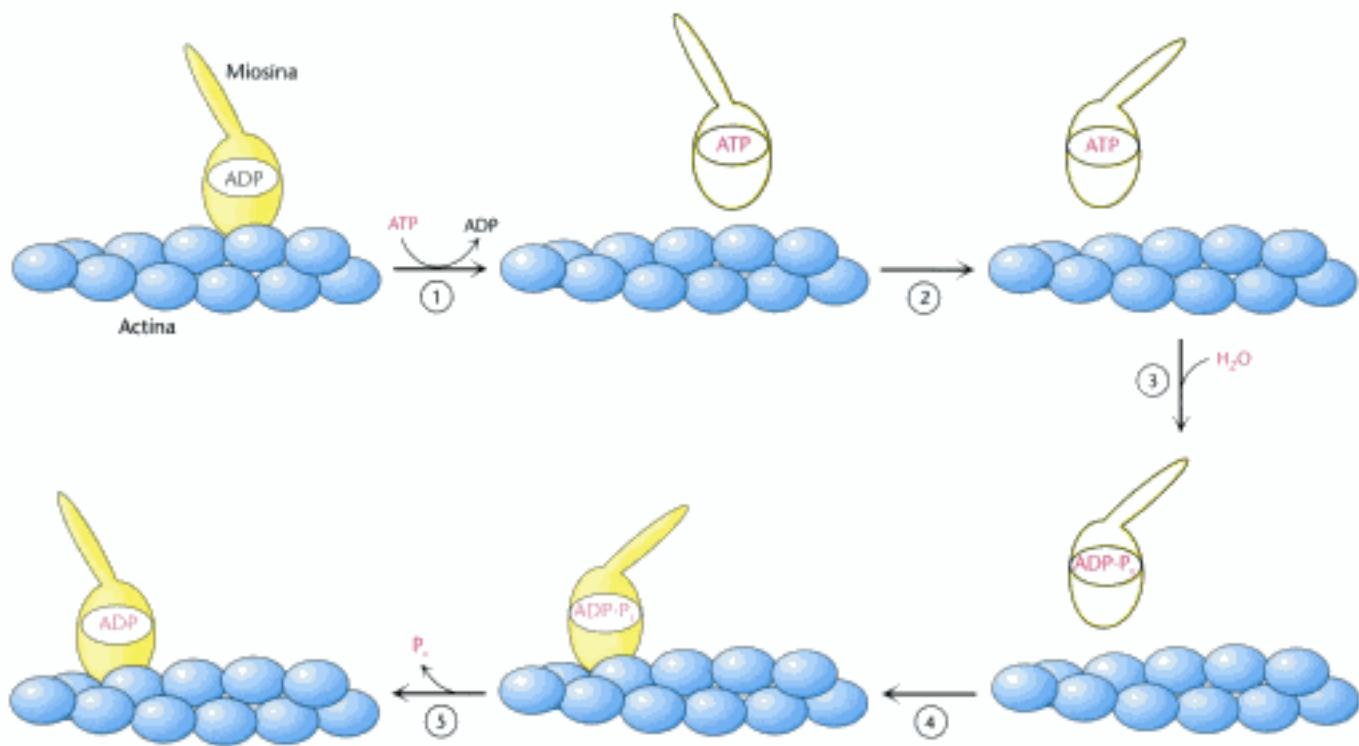


Figura 34.18 Desplazamiento de la miosina a lo largo de la actina. La cabeza de la miosina (en amarillo) en su forma ADP se une al filamento de actina (azul). El intercambio de ADP por ATP conduce (1) a la liberación de la miosina de la actina y (2) a una importante reorientación del brazo de palanca de la miosina. La hidrólisis de ATP (3) permite a la cabeza de la miosina avanzar y volver a unirse con la actina (4). La liberación de Pi (5) asociada a esta unión aumenta la fuerza de interacción entre la miosina y la actina y sitúa al brazo de palanca en su posición inicial.

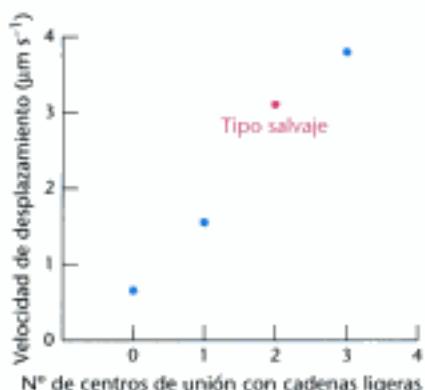


Figura 34.19 Longitud del brazo de palanca de la miosina. La comparación de las velocidades de desplazamiento de la actina, de un conjunto de miosinas mutantes con números diferentes de cadenas ligeras, muestra una relación lineal; a mayor número de centros de unión con cadenas ligeras (y por tanto, mayor longitud del brazo de palanca) mayor velocidad de desplazamiento. [Tomado de T. Q. P. Uyeda, P. D. Abramson y J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(1996): 4459-4464.]

porcionar su golpe de potencia. Ya que sólo unas pocas cabezas se encuentran unidas, el filamento de actina es relativamente libre para deslizarse. El ciclo de cada cabeza tiene una frecuencia de unas cinco veces por segundo y en cada ciclo el desplazamiento es de 110 Å. Sin embargo, dado que con el mismo filamento de actina interactúan cientos de cabezas, el desplazamiento medio de la miosina en relación al filamento de actina puede alcanzar los 80 000 Å por segundo permitiendo la contracción del sarcómero que pasa rápidamente del estado totalmente relajado al totalmente contraído. El disponer de muchas cabezas de miosina que de forma rápida e independiente se unen y desplazan a lo largo del filamento de actina permite alcanzar una velocidad mucho mayor que la alcanzable con una sola proteína motriz.

La longitud del brazo de palanca determina la velocidad del motor

Una característica clave de los motores de miosina es el papel de amplificador del brazo de palanca. El brazo de palanca amplía los pequeños cambios estructurales que suceden en el centro de unión a nucleótidos hasta alcanzar, por cada ciclo de hidrólisis de ATP, el desplazamiento de 110 Å a lo largo del filamento de actina. Una hipótesis importante en el mecanismo propuesto para el desplazamiento de la miosina a lo largo del filamento de actina es que la longitud recorrida en cada ciclo es función de la longitud del brazo de palanca. Así pues, la longitud del brazo de palanca influiría sobre la velocidad de desplazamiento de la actina con respecto a un grupo dado de cabezas de miosina.

Esta hipótesis se contrastó experimentalmente utilizando formas mutantes de miosina con brazos de palanca de longitudes diferentes. El brazo de palanca de la miosina muscular incluye centros de unión para dos cadenas ligeras (Sección 34.1). Así pues, los investigadores acortaron el brazo de palanca mediante la deleción de secuencias correspondientes a uno o a ambos centros de unión. Realizado lo anterior, se determinaron las velocidades de desplazamiento de los filamentos de actina con respecto a estas

miosinas mutadas (Figura 34.19). Tal como se suponía, la velocidad decreció al acortarse el brazo de palanca. Mediante la inserción de 23 aminoácidos correspondientes al centro de unión para una cadena ligera reguladora adicional, se obtuvo una miosina mutante con un brazo de palanca anormalmente largo. Curiosamente, esta forma mutante manifestó que no sólo soportaba el desplazamiento de la actina sino que era *mucho más rápido que el de la proteína salvaje*. Estos resultados apoyan fuertemente el papel propuesto para el brazo de palanca en la actividad del motor de miosina.

34.3 La quinesina y la dineína se desplazan a lo largo de los microtúbulos

El citoesqueleto, además de actina, incluye otros componentes, en especial filamentos intermedios y microtúbulos. Los microtúbulos sirven de guía para dos clases de proteínas motrices, denominadas quinesinas y dineínas. Las quinesinas en su desplazamiento a lo largo de los microtúbulos transportan habitualmente orgánulos y vesículas desde el centro celular a la periferia. Las dineínas en su desplazamiento relativo a los microtúbulos participan en la vibración de los cilios y flagelos de la superficie de algunas células eucarióticas. Además, la dineína transporta cargas desde la periferia hasta el centro de la célula.

 Algunos miembros de la familia de las quinesinas son cruciales en el transporte de orgánulos y otras cargas a los extremos nerviosos de la periferia neuronal. Así pues, no es de extrañar que mutaciones en estas quinesinas produzcan enfermedades del sistema nervioso. Por ejemplo, mutaciones en la quinesina denominada KIF1B β pueden producir la neuropatía más común (debilidad y dolor en las manos y pies), la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que afecta a una de cada 2500 personas. En algunas personas afectadas se ha encontrado una mutación glutamina-a-leucina en el lazo P del dominio motor de esta quinesina. Se han producido ratones con una ruptura en el gen ortólogo, los cuales presentan pérdidas de conocimiento ("knock-out"). Los ratones heterozigóticos en relación a la ruptura muestran síntomas similares a los observados en los estadios iniciales de la enfermedad en el hombre; los homozigóticos mueren poco después del nacimiento. Se han comenzado a relacionar las mutaciones en otros genes de quinesina con la predisposición a la paraplejia espástica humana. En estas enfermedades, los defectos en el transporte asociado a quinesinas pueden alterar directamente la función nerviosa, y el descenso de la actividad de determinadas neuronas puede conducir a otros procesos degenerativos.

Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos

Los microtúbulos están formados por dos tipos homólogos de subunidades de 50 kd, α y β -tubulina, que se ensamblan en una estructura helicoidal, donde se alternan ambos tipos de tubulinas para formar la pared de un cilindro hueco (Figura 34.20). Un microtúculo puede considerarse constituido por trece protofilamentos que corren para-

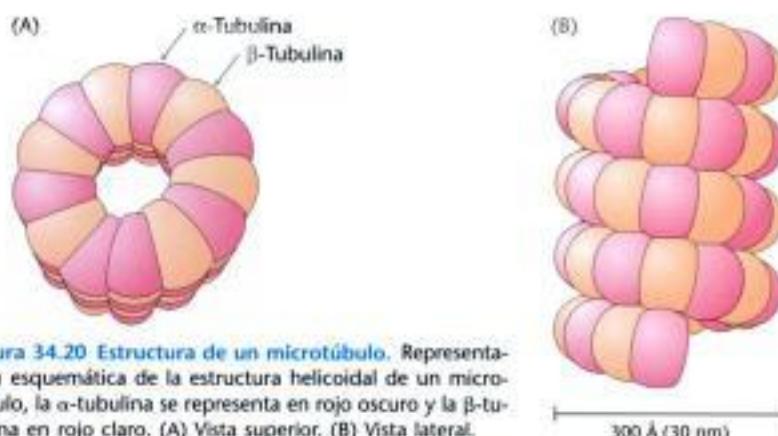
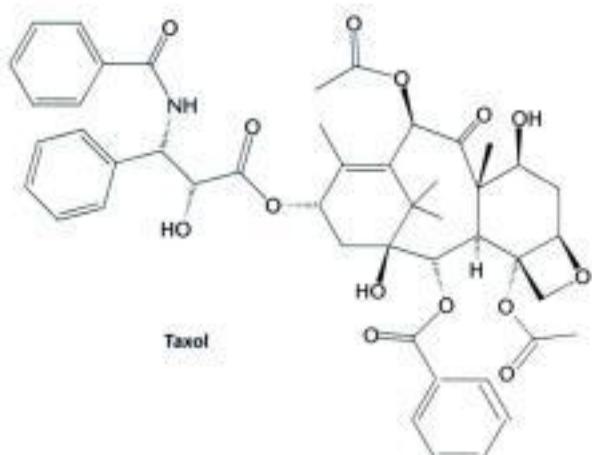


Figura 34.20 Estructura de un microtúculo. Representación esquemática de la estructura helicoidal de un microtúculo, la α -tubulina se representa en rojo oscuro y la β -tubulina en rojo claro. (A) Vista superior. (B) Vista lateral.

Hidden page



El taxol y sus derivados han sido utilizados como agentes antitumorales ya que actúan preferentemente sobre las células en división muy activa, como es el caso de los tumores.

El movimiento de la quinesina es altamente progresivo

Las quinesinas son proteínas motrices que se desplazan a lo largo de los microtúbulos. Ya hemos visto como la actina se desplaza a lo largo de los filamentos de actina en un proceso en el cual la actina se disocia en cada ciclo; después de cada golpe de potencia, cada grupo de cabeza de la miosina, actuando de forma independiente, se disocia de la actina. Por el contrario, cuando la molécula de quinesina se desplaza a lo largo del microtúbulo, los dos grupos de cabezas de la molécula de quinesina actúan en tandem: primero se une una y seguidamente la otra. Una molécula de quinesina puede avanzar muchos pasos antes de que ambas cabezas se disocien al mismo tiempo. Dicho de otro modo, el movimiento de la quinesina es muy progresivo. La observación de una única molécula permite medir la progresividad del movimiento

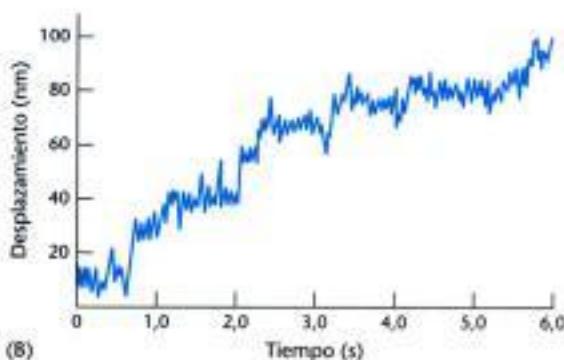
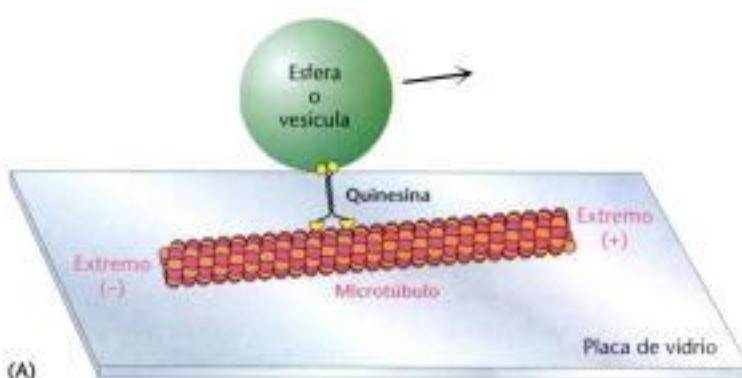


Figura 34.23 Medida del movimiento de la quinesina. (A) Se puede observar directamente el desplazamiento de las esferas o vesículas, realizado por dímeros individuales de quinesina a lo largo de un microtúbulo. (B) La gráfica muestra el desplazamiento de una esfera transportada por una molécula de quinesina. En un periodo de 6 segundos se suceden muchos pasos. La amplitud media del paso es de 8 nm (80 Å). [Parte (B) tomada de K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp y S. M. Block. *Nature* 365(1993): 721-727.]

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

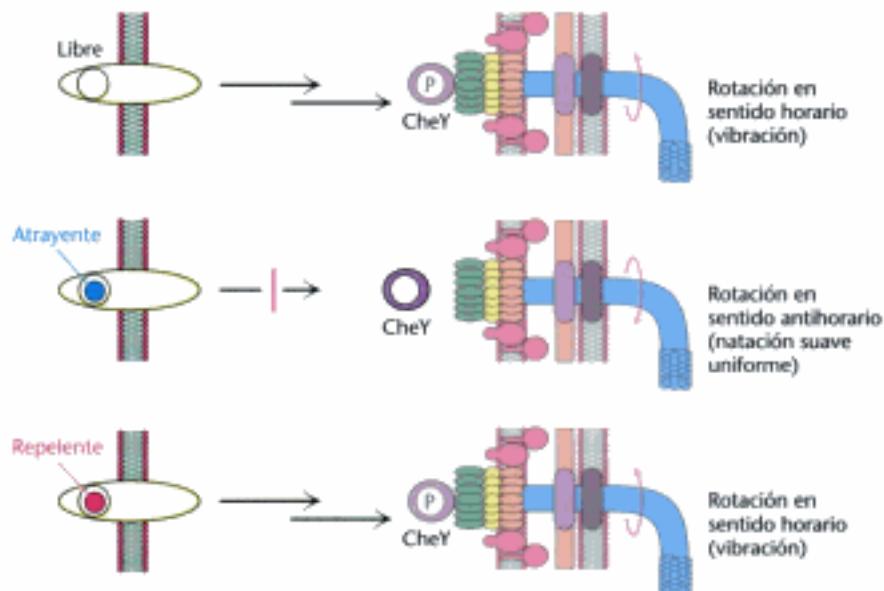


Figura 34.32 Vía de señalización en la quimiotaxis. Los receptores de la membrana celular inicián la vía de señalización que conduce a la fosforilación de la proteína CheY. La CheY fosforilada se une al motor flagelar y favorece el giro en sentido horario. Cuando un atrayente se une al receptor, se bloquea esta vía y se produce el giro antihorario y la natación suave y uniforme. Cuando se une un repelente, se estimula esta vía, y se eleva la concentración de CheY, y por tanto frecuentes rotaciones en sentido horario y aparece la vibración.

durante grandes períodos de tiempo sin presentar vibraciones. Sin embargo, cuando se desplaza hacia concentraciones menores de químico-atrayente la bacteria vibra con frecuencia. Con los químicos-repelentes el comportamiento es inverso. El resultado de este comportamiento es un *movimiento al azar en zig-zag* que favorece el avance hacia las condiciones más favorables para la bacteria.

La quimiotaxis depende de una vía de señalización que termina en el motor flagelar. La vía de señalización comienza con la unión de ciertas moléculas a los receptores de la membrana plasmática (Figura 34.32). En su estado *libre*, estos receptores inicián una vía que eventualmente conduce a la fosforilación de un residuo específico de aspartato de una proteína soluble denominada *CheY*. La *CheY* en su forma fosforilada se une a la base del motor flagelar. Una vez unidos el motor con la *CheY*, éste gira en sentido horario en vez de antihorario y provoca la vibración.

La unión del químico-atrayente a la superficie del receptor bloquea la vía de señalización conducente a la fosforilación de *CheY*. La *CheY* fosforilada se hidroliza espontáneamente liberando al grupo fosfato, en un proceso acelerado por otra proteína, la *CheZ*. La concentración de *CheY* fosforilada cae, y el flagelo tiende a dejar de rotar en sentido horario. En estas condiciones la bacteria nada de un modo uniforme sin vibraciones. Así pues, la rotación reversible del motor flagelar y la vía de señalización basada en la fosforilación operan conjuntamente para generar una respuesta eficaz a las condiciones ambientales.

La bacteria detecta los gradientes espaciales de químico-atrayentes midiéndolos a tiempos diversos. La bacteria establece una trayectoria al azar y, si tras un corto recorrido la concentración de químico-atrayente se eleva, la vibración disminuye y la bacteria prosigue rápidamente en la misma dirección. Si la concentración disminuye, la frecuencia de la vibración se eleva y la bacteria prueba con otras trayectorias al azar. El éxito de este mecanismo nuevamente muestra la capacidad evolutiva para resolver problemas; pueden existir diversas soluciones y se prueban al azar, y aquellas que resultan beneficiosas son seleccionadas y explotadas.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Supongamos que una esfera de $2 \mu\text{m}$ es transportada con una velocidad de $0,6 \mu\text{m s}^{-1}$ en un medio acuoso con una viscosidad de $\eta = 0,01 \text{ poise} = 0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$.

- ¿Cuánta es la fuerza desarrollada por la quinesina? Expresar el valor en dinas ($1 \text{ dina} = 1 \text{ g cm}^{-2}$).
- ¿Cuánto trabajo realiza en un segundo? Expresar el valor en ergios ($1 \text{ ergio} = 1 \text{ dina cm}$).
- Un motor de quinesina hidroliza aproximadamente 80 moléculas de ATP por segundo. ¿Cuánta es la energía asociada a esta hidrólisis de ATP expresada en ergios? Comparar este valor con el trabajo realizado.

9. Pasos demasiado largos. En una publicación se ha descrito una molécula de quinesina capaz de desplazarse a lo largo de los microtúbulos con unos pasos de 6 nm . Nuestra posición es de escepticismo respecto de la información. ¿Por qué?

10. Aplaudiendo con una mano. La KIF1A es un motor proteico progresivo que se desplaza hacia el extremo (+) de los microtúbulos *como si fuese un monómero*. La KIF1A sólo tiene un único dominio motor. ¿Qué otros elementos estructurales deberíamos esperar encontrar en la KIF1A?

Problema de mecanismos

11. Girando hacia atrás. Utilizando como base la estructura propuesta en la Figura 34.30 para el motor flagelar bacteriano, proponer una vía para el flujo transmembrana de protones cuando el motor flagelar está girando en sentido horario en vez de antihorario.

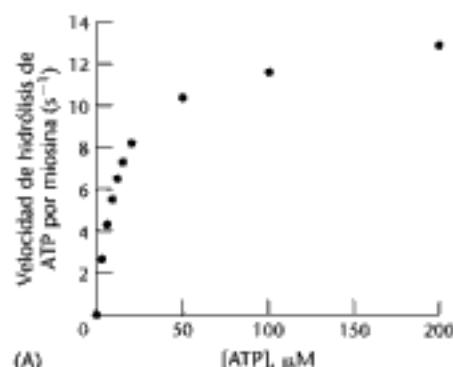
Problema de integración del capítulo

12. Músculo liso. El músculo liso, a diferencia del músculo esquelético, no está regulado por el mecanismo tropomina-tropomiosina. En su lugar, el músculo liso de los vertebrados se regula mediante el grado de fosforilación de las cadenas ligeras. La fosforilación provoca la contracción y la desfosforilación conduce a la relajación. Al igual que en el músculo esquelético, la contracción del músculo liso se activa mediante una elevación de la concentración del ion calcio citoplasmático. Con base en los conocimientos sobre el mecanismo de acción del ion calcio en otras vías de transducción de señales, proponer un mecanismo de actuación para el ion calcio en este proceso.

Problema de interpretación de datos

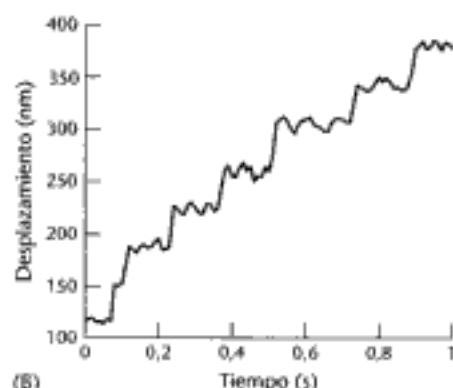
13. Miosina V. Del tejido cerebral se ha aislado la miosina V, perteneciente a la abundante familia de las miosinas. Esta miosina tiene una serie de características nada comunes. Primero, según su secuencia aminoácida, cada cadena pesada tiene seis centros contiguos de unión con la calmodulina, similares a los de las cadenas ligeras. Segundo, forma dímeros pero no oligómeros de mayor coordinación. Finalmente, a diferencia de los demás miembros de la familia de las miosinas, la miosina V es muy progresiva.

En la figura A se representa la velocidad de hidrólisis de ATP en función de la concentración de ATP.



- Calcular los valores de k_{cat} y K_M para el ATP.

Utilizando la técnica de la trampa óptica, se puede seguir el movimiento de dímeros aislados de miosina V; el resultado se muestra en la figura B.



[Datos tomados de M. Rief, R. S. Rock, A. D. Mehta, M. S. Mooseker, R. E. Cheney y J. A. Spudich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(2000): 9482-9486.]

- Calcular la amplitud del paso de la miosina V.

La velocidad de liberación de ADP para la miosina V es de unas $13 \text{ moléculas s}^{-1}$.

- Combinando las observaciones referentes a la secuencia aminoácida de la miosina, la amplitud observada del paso y los resultados cinéticos, proponer un mecanismo para el movimiento progresivo de la miosina V.

Hidden page

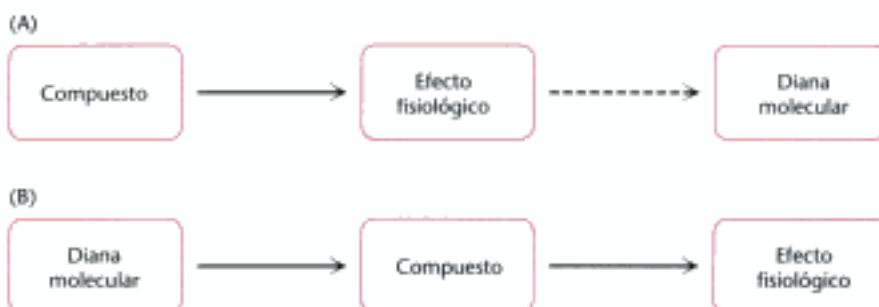


Figura 35.1 Dos vías para el descubrimiento de medicamentos. (A) Se descubre un compuesto que tiene un efecto fisiológico deseable. Se puede identificar la diana molecular en otra etapa a medida que sea necesario. B) Primeramente se selecciona una diana molecular. Se identifican los nuevos medicamentos que se unen a la diana y posteriormente se examinan sus efectos fisiológicos.

cular conocida. Se buscan los compuestos, bien por análisis sistemático o mediante el diseño de moléculas con las propiedades deseadas, que se unan a la molécula diana y modulen sus propiedades. Una vez que dichos compuestos están disponibles, los científicos pueden explorar sus efectos en las células y en los organismos apropiados. En este proceso pueden encontrarse muchos resultados inesperados, por la complejidad de los sistemas biológicos.

En este capítulo, exploramos la ciencia de la farmacología. Examinamos una serie de historias de casos que ilustran el descubrimiento de fármacos, incluyendo muchos de sus conceptos, métodos y ensayos. Veremos, más tarde, cómo los conceptos y las herramientas de la genómica están influyendo en los métodos de preparación de fármacos. Concluiremos el capítulo con un resumen de las etapas en la elaboración de un fármaco.

Farmacología

La ciencia que trata del descubrimiento, la química, la composición, la identificación, los efectos biológicos y fisiológicos, los usos y la fabricación de fármacos.

35.1 El desarrollo de fármacos requiere numerosas pruebas

Muchos compuestos tienen efectos significativos cuando se introducen en el cuerpo, pero sólo una pequeña fracción de ellos tienen el potencial de ser fármacos útiles. Un compuesto extraño, no adaptado a su papel en la célula a lo largo de la evolución debe tener una serie de propiedades especiales para funcionar eficazmente, sin originar un daño grave. A continuación revisaremos algunas de las pruebas que deben realizar los diseñadores de fármacos.

Los nuevos fármacos deben ser moduladores potentes de sus dianas

La mayoría de los fármacos se unen específicamente a proteínas, generalmente receptores o enzimas, dentro del organismo. Para que sea efectivo, un fármaco tiene que unirse a un número suficiente de las proteínas diana cuando se toma a una dosis razonable. Un factor que determina la eficacia del fármaco es la fuerza de unión, a menudo dirigida por los principios de unión, relacionados con el modelo de Michaelis-Menten estudiado en el capítulo 8.

Una molécula que se une a alguna molécula diana a menudo se denomina *ligando*. En la Figura 35.2 se muestra una curva de unión a un ligando. Las moléculas del ligando ocupan progresivamente más centros diana de unión a medida que aumenta la concentración del ligando, hasta que prácticamente todos los centros disponibles están ocupados. La tendencia de un ligando a unirse a su diana se mide por la constante de disociación, K_d , definida por la expresión:

$$K_d = [R][L]/[RL]$$

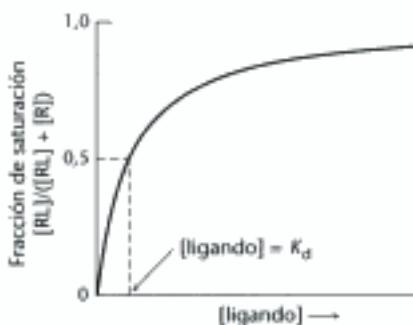


Figura 35.2 Unión a un ligando. El ajuste de la dosis de un ligando a un receptor conlleva la formación del complejo RL. En los casos simples, la reacción de unión sigue una curva de saturación sencilla. La mitad de los receptores se unen al ligando cuando la concentración del ligando iguala la constante de disociación, K_d , del complejo RL.

Hidden page

Hidden page

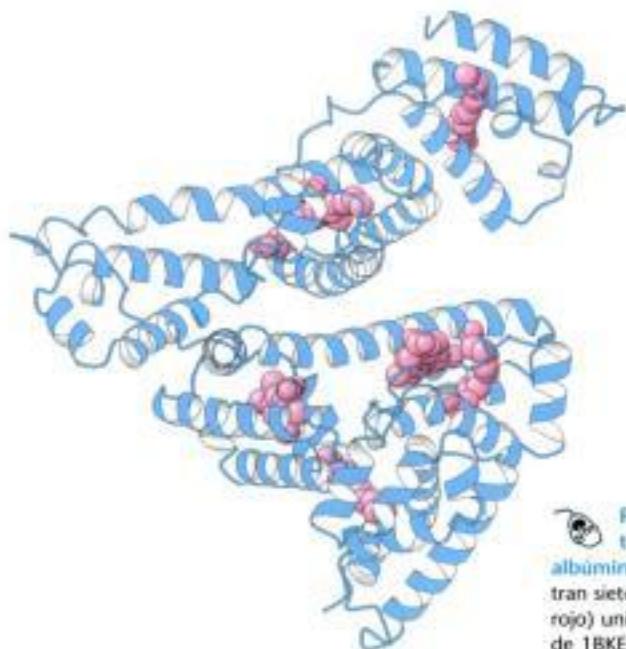


Figura 35.7 Estructura del transportador de fármacos: albúmina sérica humana. Se muestran siete moléculas hidrofóbicas (en rojo) unidas a esa molécula. [Dibujo de 1BKE.pdb.]

Distribución. Los compuestos captados por las células epiteliales del intestino pueden pasar al torrente sanguíneo. Sin embargo, los compuestos hidrofóbicos y otros muchos no se disuelven libremente en la sangre. Estos compuestos se unen a proteínas, como la albúmina (Figura 35.7), que son abundantes en el suero sanguíneo y, de esta forma, son transportados allí donde alcance el torrente circulatorio.

Cuando un compuesto ha llegado al torrente circulatorio se distribuye en los distintos fluidos y tejidos, que a menudo se denominan *compartimientos*. Algunos compuestos se concentran en los compartimentos diana, bien uniéndose ellos mismos a las moléculas diana o por otros mecanismos. Otros compuestos tienen una distribución más amplia (Figura 35.8). Un fármaco eficaz llegará al compartimiento diana en cantidad suficiente; la concentración del compuesto en el compartimiento diana es menor si el compuesto se distribuye entre varios compartimientos.

Algunos compartimentos diana son especialmente difíciles de alcanzar. Muchos compuestos son excluidos del sistema nervioso central por la *barrera hematoence-*

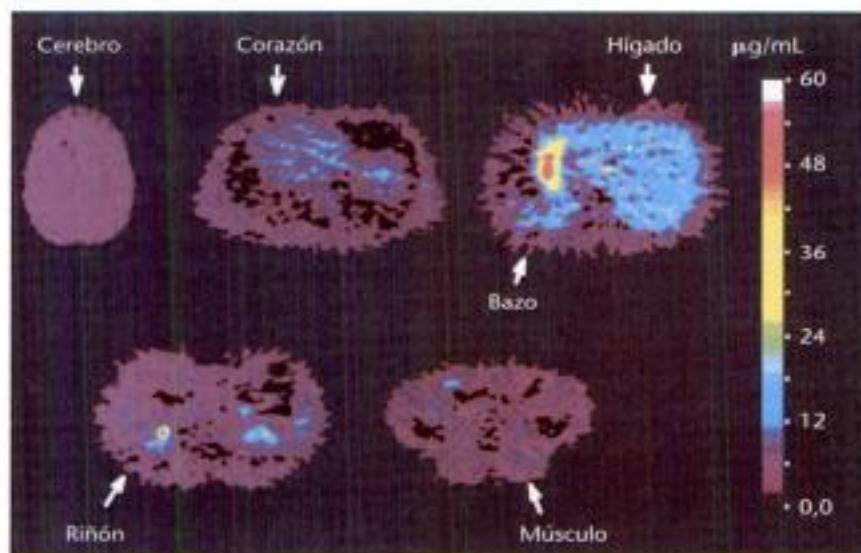


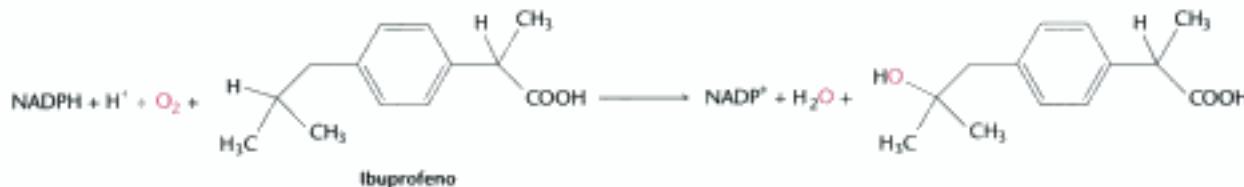
Figura 35.8 Distribución del fármaco fluconazol. Una vez introducidos, los compuestos se distribuyen en varios órganos del cuerpo. La distribución del agente antifúngico fluconazol se monitorizó mediante la utilización del análisis por tomografía de emisión de positrones (PET). Estas imágenes se obtuvieron de un voluntario humano 90 minutos después de haberle inyectado una dosis de 5 mg kg^{-1} de fluconazol que contenía cantidades traza de fluconazol marcado con el isótopo emisor de positrones ^{18}F . [De A. J. Fischman y col. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 37(1993): 1270-1277.]

fálica, que consiste en conexiones estrechas entre las células endoteliales que rodean los vasos sanguíneos en el cerebro y la médula espinal.

Metabolismo y excreción. Una prueba final para una molécula farmacológica experimental consiste en evadir las defensas del organismo frente a los compuestos extraños. Dichos compuestos (a menudo denominados *compuestos xenobióticos*) se expulsan con frecuencia del cuerpo por la orina o las heces, a menudo después de haber sido metabolizados de alguna forma (degradados o modificados), favoreciendo así la excreción. Este *metabolismo de los fármacos* plantea una amenaza considerable para la eficacia del fármaco, debido a que disminuye su concentración deseada durante su metabolización. Así, un compuesto que se metabolice rápidamente debe ser administrado con mayor frecuencia o a dosis superiores.

Dos de las vías más comunes del metabolismo de compuestos xenobióticos son la *oxidación* y la *conjugación*. Las reacciones de oxidación favorecen la excreción en al menos dos formas: aumentar la solubilidad en agua y, así, facilitar el transporte, e introducir grupos funcionales que participan en etapas metabólicas posteriores. Estas reacciones a menudo están mediadas por los enzimas citocromo P450 en el hígado (p. 750). El genoma humano codifica más de 50 isoenzimas P450 diferentes, muchos de los cuales participan en el metabolismo de xenobióticos. Una reacción típica catalizada por un isoenzima P450 es la hidroxilación del ibuprofeno (Figura 35.9).

Figura 35.9 Conversión del ibuprofeno por P450. Los isoenzimas del citocromo P450, principalmente en el hígado, catalizan reacciones metabólicas de xenobióticos, como la hidroxilación. La reacción introduce un átomo de oxígeno derivado del oxígeno molecular.



La conjugación es la adición de grupos determinados al compuesto xenobiótico. Son comunes la adición de glutatión (p. 586), de ácido glucurónico y de sulfato (Figura 35.10). La adición a menudo aumenta la solubilidad en agua y proporciona etiquetas que puedan ser reconocidas como diana de excreción. Son ejemplos de conjugación la adición de glutatión al fármaco anticanceroso ciclofosfamida, la adición de glucuronidato al analgésico morfina y la adición de un grupo sulfato al agente estimulante del crecimiento del cabello minoxidilo.



Resulta interesante que la sulfatación del minoxidilo produce un compuesto que es más activo en estimular el crecimiento del cabello que el compuesto no modificado. Así pues, los productos metabólicos del fármaco, aunque generalmente son menos activos que el fármaco, pueden en ocasiones resultar más activos.

Cabe destacar que una reacción de oxidación a menudo precede a la conjugación, puesto que la reacción de oxidación puede generar grupos hidroxilo y otros grupos, a los que se pueden adicionar grupos como el ácido glucurónico. Las reacciones de

Hidden page

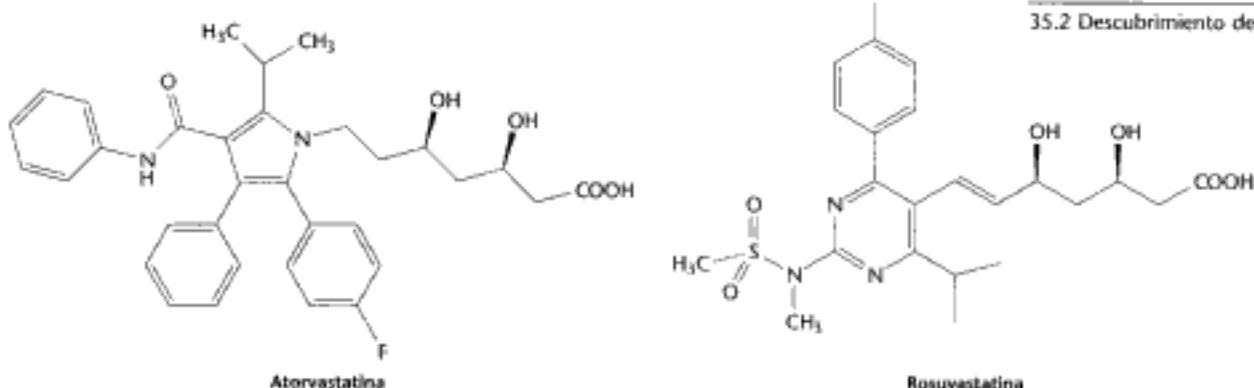
Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page



La lovastatina y sus compuestos relacionados estructuralmente son productos naturales o compuestos derivados directamente de productos naturales. El siguiente paso fue el desarrollo de moléculas totalmente sintéticas que fueran inhibidores más potentes de la HMG-CoA reductasa (Figura 35.18). Estos compuestos son eficaces a dosis menores, reduciéndose los efectos secundarios.

Los inhibidores originales de la HMG-CoA reductasa o sus precursores fueron descubiertos por análisis sistemático de bibliotecas de productos naturales. Más recientemente, los diseñadores de fármacos han intentado analizar grandes bibliotecas de productos naturales y de compuestos sintéticos puros, preparados durante muchos programas de preparación de medicamentos. En condiciones favorables, durante este proceso pueden ensayarse cientos de miles o incluso millones de compuestos, lo que se conoce como *procedimiento analítico de alto rendimiento ("high-throughput screening")*. Se pueden sintetizar los compuestos en estas bibliotecas uno cada vez para su análisis. Un método alternativo es sintetizar una gran cantidad de compuestos estructuralmente relacionados que difieren unos de otros solamente en una o unas pocas posiciones a la vez. A este método a menudo se denomina *química combinatoria*. Aquí se sintetizan los compuestos mediante la utilización de las mismas reacciones químicas, pero con una serie de reactantes variable. Supongamos que un armazón molecular se construye con dos centros reactivos y que se pueden utilizar 20 reactantes en el primer centro y 40 reactantes en el segundo centro. Se podrían producir un total de $20 \times 40 = 800$ compuestos posibles.

Un método clave en la química combinatoria es la *síntesis split-pool* (Figura 35.19). El método depende de métodos de síntesis en fase sólida, desarrollados primero para la síntesis de péptidos (p.26). Los compuestos se sintetizan en pequeñas matrices o soportes. Se forman las matrices que contienen un *armazón* de inicio apropiado y se dividen ("split") en n grupos, correspondiendo n al número de bloques de construcción que se utilizan en un centro. Se llevan a cabo las reacciones añadiendo los reactantes en el primer centro, y se aislan las matrices por filtración. Entonces se combinan ("pooled") los n grupos de matrices, se mezclan y separan en m grupos, correspondiendo m al número de reactantes que se utilizan en el segundo centro. Se inicien las reacciones adicionando estos nm reactantes, y nuevamente se aislan las matrices. El resultado importante es que cada matriz contiene solamente un compuesto, incluso aunque la biblioteca entera de matrices contenga muchos. Además, aunque se lleven a cabo sólo $n + m$ reacciones, se producirán $n \times m$ compuestos. Con los valores anteriores para n y m , $20 + 40 = 60$ reacciones producen $20 \times 40 = 800$ compuestos. En algunos casos, se pueden realizar directamente los ensayos con los compuestos adheridos todavía al soporte para encontrar compuestos con las propiedades deseadas (Figura 35.20). Alternativamente, se puede aislar cada matriz y soltar el compuesto de la matriz para producir compuestos libres para el análisis. Una vez se ha identificado un compuesto interesante, se deben utilizar métodos analíticos de varios tipos para identificar cuál de los $n \times m$ compuestos está presente.

Cabe destacar que el "universo" de compuestos farmacoides es enorme. Se estima que son posibles más de 10^{40} compuestos con pesos moleculares inferiores a

Figura 35.18 Estatinas sintéticas. La atorvastatina (Lipitor) y rosuvastatina (Crestor) son fármacos totalmente sintéticos que inhiben a la HMG-CoA reductasa.

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

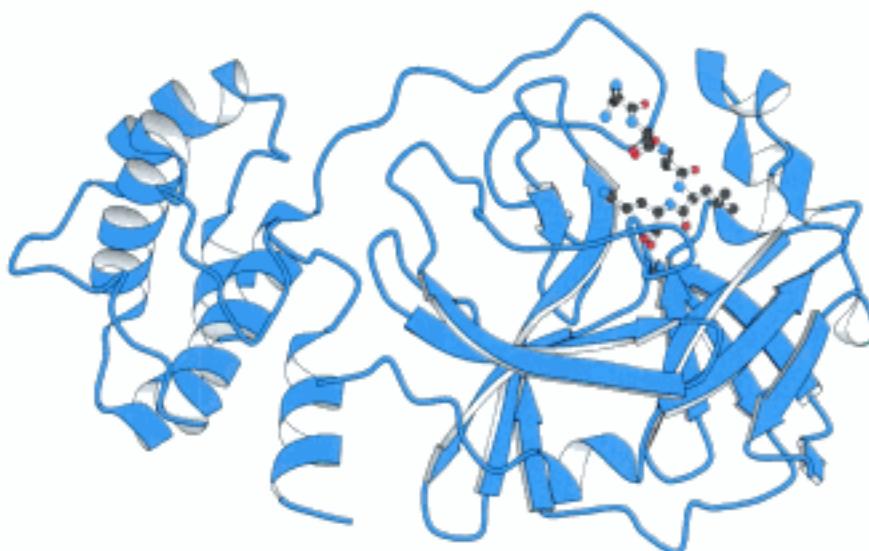
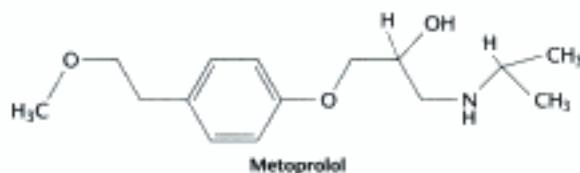


Figura 35.25 Diana de fármacos emergentes. Se muestra la estructura de una proteasa del coronavirus que causa SARS (síndrome respiratorio agudo grave) unida a un inhibidor. Se determinó esta estructura en menos de un año tras la identificación del virus. [Tomado de 1P9S.pdb.]

Las diferencias genéticas influyen en las respuestas individuales a los fármacos

Muchos fármacos no son eficaces en cualquier individuo, a menudo debido a las diferencias genéticas entre las personas. Las personas que no responden podrían presentar pequeñas diferencias en la molécula diana del fármaco o en proteínas que intervienen en el transporte y metabolismo del fármaco. El objetivo de los campos emergentes de la farmacogenética y farmacogenómica es diseñar fármacos que o bien actúen más consistentemente de unas personas a otras o sean adaptados a individuos con genotipos particulares.

Los fármacos como el metoprolol, que se une al receptor β 1-adrenérgico, sirven con frecuencia en el tratamiento de la hipertensión.



Pero algunas personas no responden bien. En la población americana son comunes dos variantes del gen que codifica el receptor β 1-adrenérgico. El alelo más común tiene una serina en la posición 49 y arginina en la posición 389. En algunas personas, sin embargo, la glicina sustituye a uno u otro de estos residuos. En estudios los participantes con dos copias del alelo más frecuente respondieron al metoprolol: se redujo la presión sanguínea diastólica diurna a una media de $14,7 \pm 2,9$ mm Hg. Por el contrario, los participantes con una variante alélica mostraron una reducción similar de la presión sanguínea, y el fármaco no tuvo efecto significativo en los participantes con las dos variantes alélicas (Figura 35.26). Estas observaciones sugieren la posible utilidad de la genotipación de individuos en estas posiciones. Entonces, uno podría predecir si es o no es posible que un tratamiento con metoprolol u otro bloqueante β vaya a ser eficaz.

Dada la importancia de ADME y las propiedades de toxicidad para determinar la eficacia de un fármaco, no es sorprendente que variaciones en las proteínas que participan en el transporte y metabolismo de un fármaco puedan alterar la eficacia de ese fármaco. Un ejemplo importante es la utilización de fármacos tiopurinas como la 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y azatioprina para el tratamiento de enfermedades como la leucemia, trastornos inmunes y la enfermedad inflamatoria intestinal.

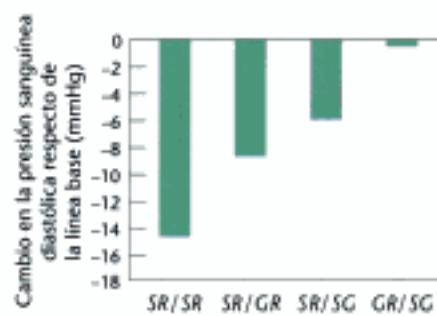
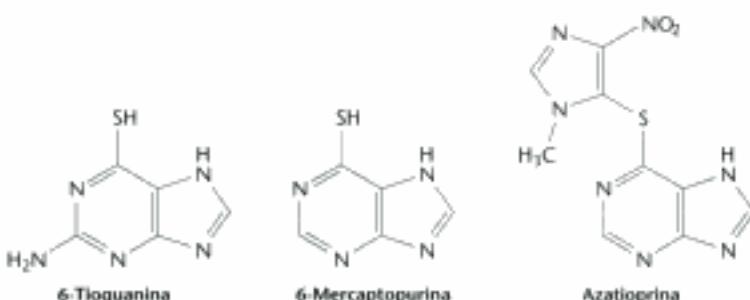
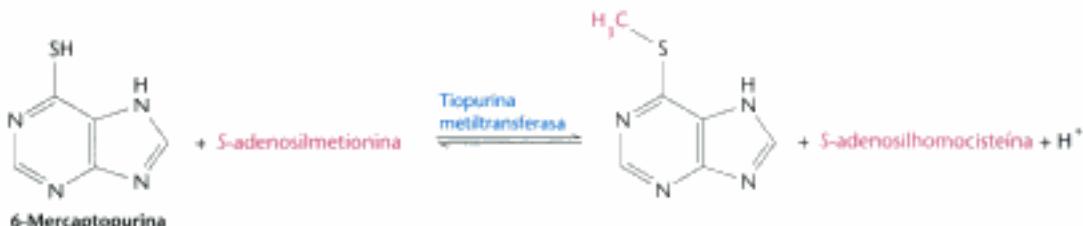


Figura 35.26 Correlación fenotipo-genotípico. Cambios medios de la presión sanguínea diastólica en el tratamiento con metoprolol. Las personas con dos copias del alelo más frecuente (S_49R_{389}) muestran descensos significativos de la presión sanguínea. Aquellos con una variante alélica (GR o SG) muestran descensos más moderados y aquellos con dos variantes alélicas (GR/SG) no presentan descensos. [De J. A. Johnson y col., Clin. Pharmacol. Ther. 74(2003): 44-52.]



Una minoría de los pacientes que han sido tratados con estos fármacos presentan signos de toxicidad a dosis que la mayoría de los pacientes toleran bien. Estas diferencias entre pacientes se deben a variaciones raras en el gen que codifica el enzima metabolizador de xenobióticos tiopurina metiltransferasa, que adiciona un grupo metilo a átomos de azufre.



La variante enzimática es menos estable. Los pacientes con estas variantes enzimáticas pueden acumular niveles tóxicos de los fármacos si no se tienen las precauciones apropiadas. Así, la variabilidad genética en un enzima que participa en el metabolismo de fármacos tiene un importante papel en la determinación de la variación en la tolerancia de diferentes personas a los niveles particulares de un fármaco. Se han implicado a muchos otros enzimas metabolizadores de fármacos y proteínas de transporte en el control de determinadas reacciones a fármacos específicos. La identificación de los factores genéticos permitirá un conocimiento profundo de por qué algunos fármacos funcionan bien en unas personas pero mal en otras. En el futuro puede que los médicos examinen los genes de los pacientes para ayudar a planificar programas farmacoterapéuticos.

35.4 La preparación de nuevos medicamentos tiene lugar en varias etapas

En los Estados Unidos, la FDA exige que se demuestre que un medicamento nuevo es eficaz y seguro antes de que pueda ser utilizado a gran escala en seres humanos. Este requerimiento debe ser particularmente cierto para fármacos experimentales que han de ser tomados por personas relativamente sanas. Se aceptan más efectos secundarios para prototipos encaminados a tratar pacientes significativamente enfermos, como aquellos con formas graves de cáncer, donde existen claras consecuencias desfavorables por no haber un tratamiento eficaz.

Los ensayos clínicos son muy lentos y caros

Los ensayos clínicos prueban la eficacia y los posibles efectos secundarios de un fármaco experimental antes de ser aprobado por la FDA para su uso general. Estos ensayos tienen lugar en al menos tres fases (Figura 35.27). En la fase 1 un pequeño número de voluntarios sanos (generalmente de 10 a 100) toman el medicamento para un estudio inicial de seguridad. A estos voluntarios se les da una serie de dosis y se les monitoriza para cualquier señal de toxicidad. No se evalúa específicamente la eficacia del nuevo medicamento.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3	
Descubrimiento preclínico del fármaco				Uso clínico
	Seguridad	Seguridad Eficacia Dosis	Seguridad Eficacia Efectos colaterales	
				• •

Figura 35.27 Fases de un ensayo clínico. Los ensayos clínicos tienen lugar en fases que examinan la seguridad y la eficacia en grupos cada vez mayores.

En la fase 2 se prueba la eficacia del fármaco experimental en un pequeño número de personas que podrían beneficiarse del medicamento. Se obtienen más datos respecto a la seguridad del fármaco. Estos ensayos están a menudo controlados y son doble-ciego. En un estudio controlado se dividen los sujetos al azar en dos grupos. A los sujetos del grupo tratamiento se les da el tratamiento en investigación. A los sujetos del grupo control se les da bien un placebo —esto es, un tratamiento como pastillas de azúcar que no tienen un valor intrínseco— o el mejor tratamiento disponible, si fuera poco ético eliminar completamente el tratamiento base. En un estudio de doble-ciego ni los sujetos ni los investigadores saben qué individuos están en el grupo de tratamiento ni qué individuos están en el grupo control. Un estudio doble-ciego evita prejuicios durante el ensayo. Cuando se ha completado el ensayo, se dan a conocer las asignaciones de los sujetos en los grupos tratamiento y control y se comparan los resultados para los dos grupos. En los ensayos de la fase 2 se investigan a menudo una serie de dosis para determinar qué dosis parecen estar libres de efectos secundarios y qué dosis parecen ser eficaces.

No se debería subestimar el poder del efecto placebo, es decir, la tendencia a percibir mejoras en un sujeto que cree estar recibiendo recibiendo un tratamiento posiblemente beneficioso. En un estudio de un tratamiento quirúrgico artroscópico para el dolor de rodilla, por ejemplo, los sujetos que creían que habían sido operados porque les mostraron cintas de video y otros recursos presentaron el mismo grado de mejoría, como media, que los sujetos que fueron realmente operados.

En la fase 3 se llevan a cabo estudios similares en poblaciones numerosas. En esta fase se intenta establecer de forma más precisa la eficacia de un prototipo y detectar efectos secundarios que puedan manifestarse en un pequeño porcentaje de los individuos que recibieron el tratamiento. En un estudio típico de la fase 3 pueden participar miles de personas.

Los ensayos clínicos pueden ser extremadamente costosos. Se deben reclutar y monitorizar cientos de miles de pacientes durante el periodo del ensayo. Muchos médicos, enfermeras, farmacólogos clínicos, estadísticos y otros profesionales participan en el diseño y la ejecución del ensayo. Los costes pueden suponer desde decenas de millones hasta cientos de millones de dólares. Es necesario recoger numerosos archivos, incluyendo la documentación de cualquier reacción adversa. Estos datos son recopilados y enviados a la FDA. Se estima que hoy en día el coste total de la puesta a punto de un medicamento está entre 400 y 800 millones de dólares.

Incluso después de que un medicamento se ha aprobado y se ha utilizado, pueden surgir problemas. Como se ha mencionado anteriormente, el rofecoxib (Vioxx), por ejemplo, se retiró del mercado después de haberse detectado efectos secundarios cardíacos significativos en ensayos clínicos posteriores. Estos casos subrayan la necesidad de que se sopesen los efectos beneficiosos y los posibles riesgos para quienes utilicen cualquier medicamento.

El desarrollo de la resistencia a fármacos limita la utilidad de los medicamentos frente a agentes infecciosos y al cáncer

Muchos fármacos se utilizan durante largos períodos de tiempo sin perder su eficacia. Sin embargo, en algunos casos, particularmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas o cancerosas, los tratamientos farmacológicos que eran inicialmente

Hidden page

de inhibidores de proteínas específicas de células cancerosas presentes en ciertas leucemias (p. 401). Por ejemplo, se hicieron indetectables los tumores de pacientes tratados con mesilato de imatinib, dirigido contra la proteína quinasa Bcr-Abl. Desgraciadamente, los tumores de muchos de los pacientes tratados con mesilato de imatinib son recurrentes después de un período de varios años. En muchos de estos casos, las mutaciones han alterado la proteína Bcr-Abl de tal forma que ya no se inhibe por las concentraciones de mesilato de imatinib utilizadas en la terapia.

Los pacientes de cáncer a menudo toman a la vez numerosos fármacos durante la quimioterapia, y en muchos casos las células cancerosas se hacen resistentes simultáneamente a muchos o a todos ellos. La resistencia múltiple a fármacos puede deberse a la proliferación de células cancerosas que sobreexpresan un número de proteínas de transporte ABC, que bombean los fármacos fuera de la célula (p. 358). Así, las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a fármacos sobreexpresando proteínas humanas normales o modificando las proteínas responsables del fenotipo canceroso.

Resumen

35.1 El desarrollo de fármacos requiere numerosas pruebas

La mayoría de los fármacos actúan uniéndose a enzimas o receptores y modulando sus actividades. Para ser eficaz, un fármaco debe unirse a sus dianas con gran afinidad y especificidad. Sin embargo, incluso la mayoría de los compuestos con la afinidad y especificidad deseada no son medicamentos adecuados. La mayoría de los compuestos se absorben débilmente, se excretan rápidamente del cuerpo o bien se modifican por vías metabólicas que actúan sobre compuestos extraños. En consecuencia, cuando se toman por vía oral estos compuestos no llegan a sus dianas en las concentraciones adecuadas durante un período de tiempo suficiente. Las propiedades de un fármaco relacionadas con su absorción, distribución, metabolismo y excreción se denominan propiedades ADME. La biodisponibilidad oral es una medida de la capacidad del fármaco de ser absorbido; es la relación entre la máxima concentración de un compuesto suministrado oralmente y la concentración máxima de la misma dosis inyectada directamente. La estructura de un compuesto puede afectar a su biodisponibilidad de formas complejas, pero las generalizaciones denominadas reglas de Lipinski proporcionan una guía útil. Las vías del metabolismo de fármacos incluyen la oxidación por enzimas del citocromo P450 (metabolismo de fase I) y la conjugación con glutatión, ácido glucurónico o sulfato (metabolismo de fase II). Un compuesto también puede no ser un fármaco útil porque es tóxico, bien porque module demasiado eficazmente la molécula diana o porque se une también a otras proteínas diferentes de su diana. El hígado y riñón ejercen funciones centrales en el metabolismo y la excreción de fármacos.

35.2 Se pueden descubrir nuevos fármacos de forma fortuita, por análisis sistemático o mediante el diseño

Muchos fármacos se han descubierto fortuitamente, esto es, por una observación casual. El antibiótico penicilina se forma por un moho, que contaminó accidentalmente una placa de cultivo, destruyendo las bacterias vecinas. Se descubrió que los fármacos como la clorpromazina y el sildenafil tenían efectos beneficiosos en la fisiología humana que eran completamente diferentes a los esperados. Los fármacos hipocolesterolémiantes, las estatinas, se prepararon después de que se analizaron de forma sistemática numerosos grupos de compuestos para comprobar actividades potencialmente interesantes. Se han aprovechado los métodos de la química combinatoria para generar numerosos grupos de compuestos químicamente relacionados, pero diferentes para el análisis sistemático. En algunos casos, se dispone de la estructura tridimensional de la diana farmacológica y puede utilizarse en el diseño de inhibidores potentes y específicos. El inhibidor de proteasas del HIV indinavir y los

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Apéndice A Constantes físicas y conversión de unidades

Valores de las constantes físicas

Constante física	Símbolo	Valor
Unidad de masa atómica (dalton)	uma	$1,660 \times 10^{-24}$ g
Número de Avogadro	N	$6,022 \times 10^{23}$ mol $^{-1}$
Constante de Boltzmann	k	$1,381 \times 10^{-23}$ J K $^{-1}$
		$3,298 \times 10^{-24}$ cal K $^{-1}$
Electrón-voltio	eV	$1,602 \times 10^{-19}$ J
		$3,828 \times 10^{-20}$ cal
Constante de Faraday	F	$9,649 \times 10^4$ C mol $^{-1}$
		$2,306 \times 10^4$ cal voltio $^{-1}$ eq $^{-1}$
Curio	Ci	$3,70 \times 10^{10}$ desintegraciones s $^{-1}$
Constante de los gases	R	$8,315$ J mol $^{-1}$ K $^{-1}$
		$1,987$ cal mol $^{-1}$ K $^{-1}$
Constante de Planck	\hbar	$6,626 \times 10^{-34}$ J s
		$1,584 \times 10^{-34}$ cal s
Velocidad de la luz en el vacío	c	$2,998 \times 10^{10}$ cm s $^{-1}$

Abreviatura: C, coulombio; cal, caloría; cm, centímetro; K, Kelvin; eq, equivalente; g, gramo; J, julio; s, segundo.

Constantes matemáticas

$$\pi = 3,14159$$

$$e = 2,71828$$

$$\log_e x = 2,303 \log_{10} x$$

Factores de conversión

Magnitud física	Equivalente
Longitud	$1 \text{ cm} = 10^{-2} \text{ m} = 10 \text{ mm} = 10^4 \text{ mm} = 10^7 \text{ nm}$
	$1 \text{ cm} = 10^8 \text{ Å} = 0,3937 \text{ pulg.}$
Masa	$1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \text{ µg}$
	$1 \text{ g} = 3,527 \times 10^{-2}$ onzas (sistema inglés)
Volumen	$1 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ m}^3 = 10^3 \text{ mm}^3$
	$1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 \times 10^{-3} \text{ litro} = 10^{-3} \mu\text{l}$
	$1 \text{ cm}^3 = 6,1 \times 10^{-2} \text{ in}^3 = 3,53 \times 10^{-5} \text{ ft}^3$
Temperatura	$K = {}^\circ\text{C} + 273,15$
	${}^\circ\text{C} = (5/9)({}^\circ\text{F} - 32)$
Energía	$1 \text{ J} = 10^7 \text{ erg} = 0,239 \text{ cal} 5 \text{ J W s}$
Presión	$1 \text{ torr} = 1 \text{ mm Hg (}0^\circ\text{C)}$
	$= 1,333 \times 10^2 \text{ newtons m}^{-2}$
	$= 1,333 \times 10^2 \text{ pascal}$
	$= 1,316 \times 10^{-3} \text{ atm}$

Prefijos estándar

Prefijo	Símbolo	Factor
kilo	k	10^3
hecto	h	10^2
deca	da	10^1
deci	d	10^{-1}
centi	c	10^{-2}
milli	m	10^{-3}
micro	µ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
pico	p	10^{-12}

Apéndice B Constantes de acidez

Valores pK_a de algunos ácidos

Ácido	pK_a (a 25°C)	Ácido	pK_a (a 25°C)
Ácido acético	4,76	Ácido málico, pK_1	3,40
Ácido acetacético	3,58	Ácido pK_2	5,11
Ácido ascórbico, pK_1	4,10	Ácido pirofosfórico, pK_1	0,85
pK_2	11,79	pK_2	1,49
Ácido benzoico	4,20	pK_3	5,77
Ácido <i>n</i> -butílico	4,81	pK_4	8,22
Ácido cacodílico	6,19	Ácido succínico, pK_1	4,21
Ácido carbónico, pK_1	6,35	pK_2	5,64
pK_2	10,33	Agua*	15,74
Ácido cítrico, pK_1	3,14	Fenol	9,89
pK_2	4,77	Glicina, pK_1	2,35
pK_3	6,39	pK_2	9,78
Ácido fórmico	3,75	Ion amonio	9,25
Ácido fosfórico, pK_1	2,12	Ion etilamonio	10,81
pK_2	7,21	Ion imidazolio	6,95
pK_3	12,67	Ion piridinio	5,25
Ácido láctico,	3,86	Ion trimetilamonio	9,79
Ácido maleico, pK_1	1,83	Tris (hidroximetil) aminometano	8,08
pK_2	6,07		

* $[H^+] [OH^-] = 10^{-14}$; $[H_2O] = 55,5 \text{ M}$.

Valores típicos de pK_a de los grupos ionizables de las proteínas

Grupo	Ácido	\rightleftharpoons	Base	pK_a característico	Grupo	Ácido	\rightleftharpoons	Base	pK_a característico
Grupo α -carboxilo terminal		\rightleftharpoons		3,1	Cisteína		\rightleftharpoons		8,3
Ácido aspártico		\rightleftharpoons		4,1	Tirosina		\rightleftharpoons		10,4
Ácido glutámico		\rightleftharpoons			Lisina		\rightleftharpoons		10,0
Histidina		\rightleftharpoons		6,0	Arginina		\rightleftharpoons		12,5
Grupo α -amino terminal		\rightleftharpoons		8,0					

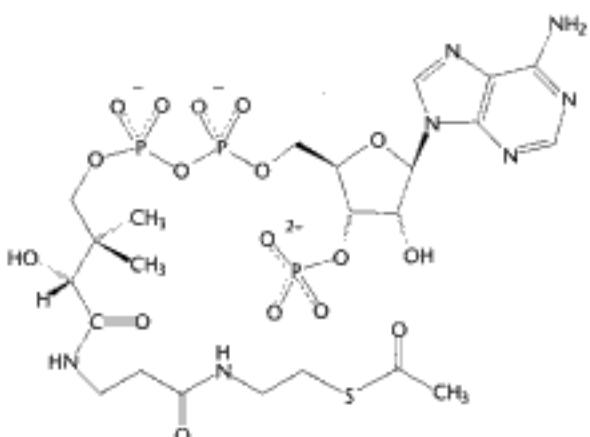
Note: Los valores de pK_a dependen de la temperatura, la fuerza iónica y el microentorno del grupo ionizable.

Hidden page

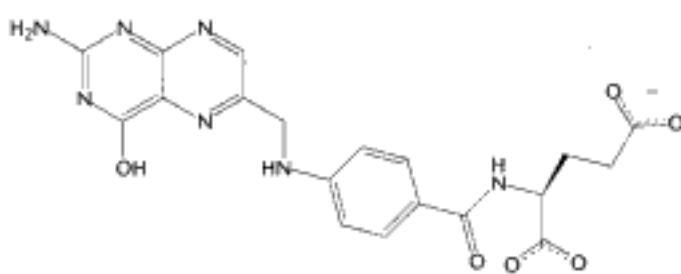
Hidden page

Glosario de compuestos

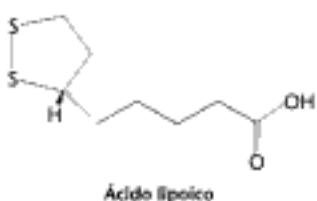
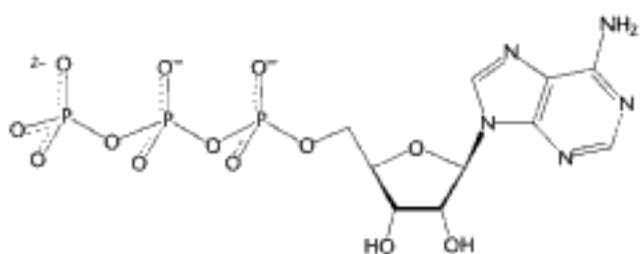
Las siguientes páginas contienen las estructuras de aminoácidos, intermediarios metabólicos comunes, bases nucleotídicas y cofactores importantes. En algunos casos, se muestran dos versiones de la estructura: la estructura de Fischer (abajo) y una versión más precisa estereoquímicamente (arriba).



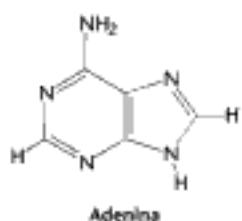
Acetil coenzima A (acetil-CoA)



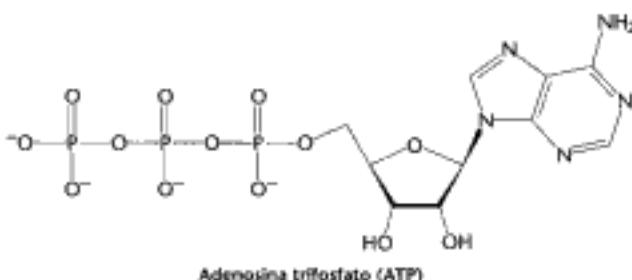
Ácido fólico



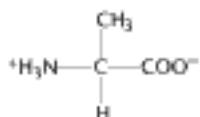
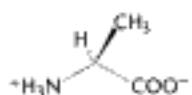
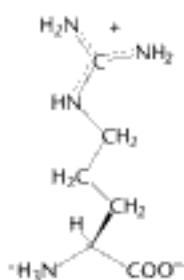
Ácido lipoico



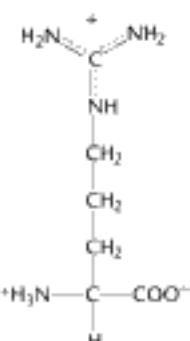
Adenina



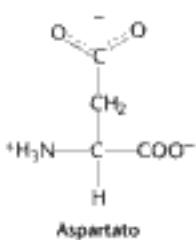
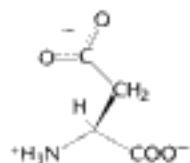
Adenosina trifosfato (ATP)



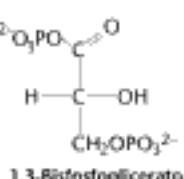
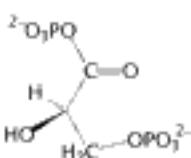
Alanina



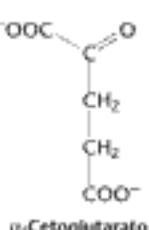
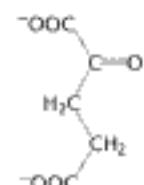
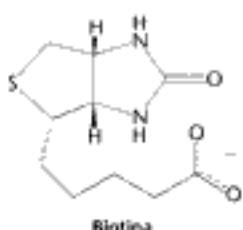
Arginina



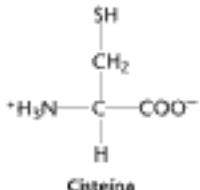
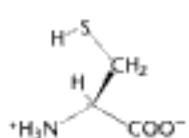
Aspartato



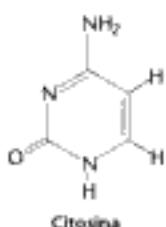
1,3-Bisfosfoglicerato

 β -Cetoglutarato

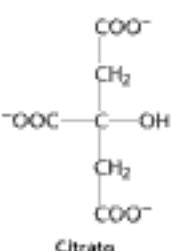
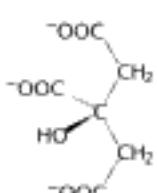
Biotina

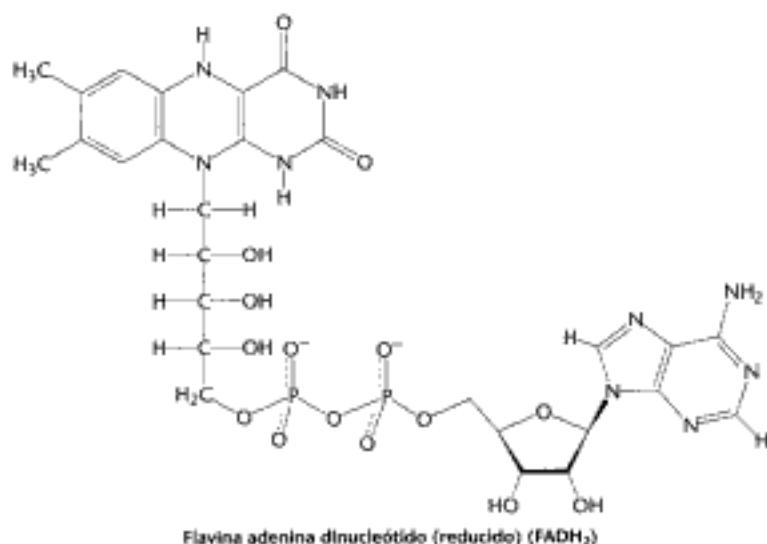
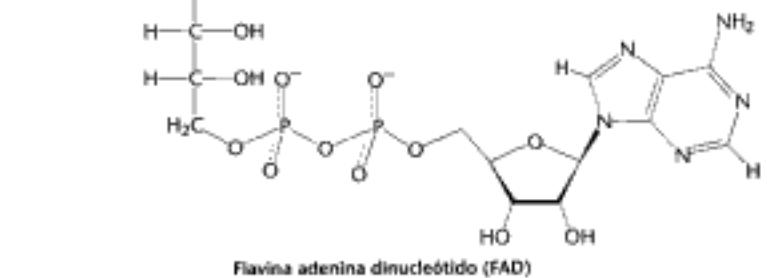
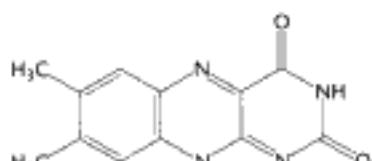
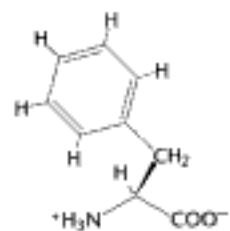
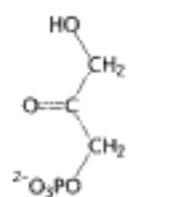
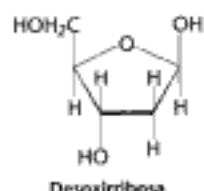
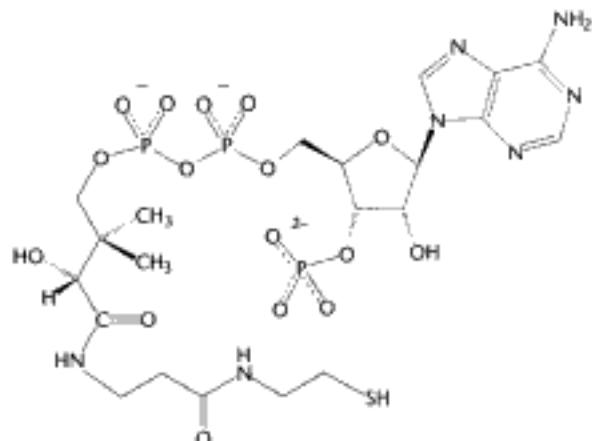


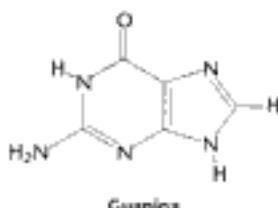
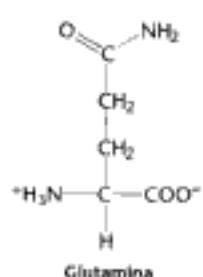
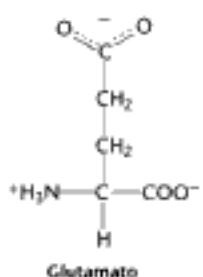
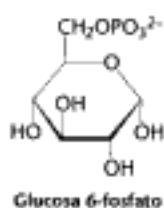
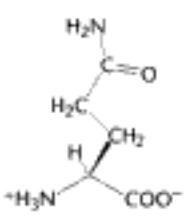
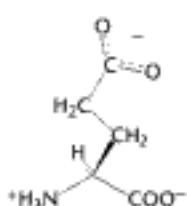
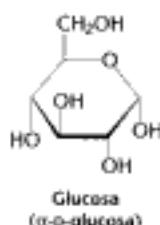
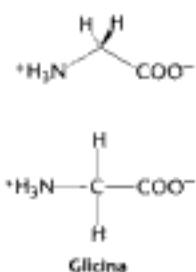
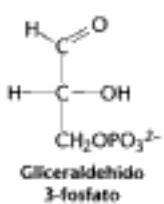
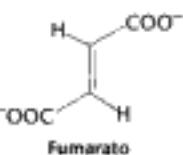
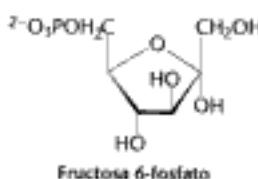
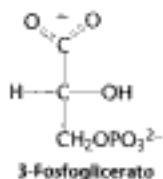
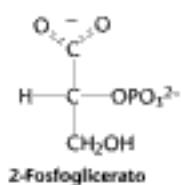
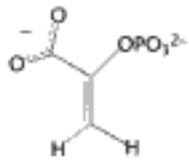
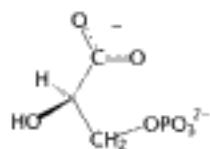
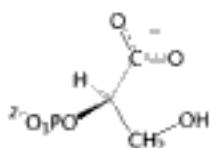
Cisteína

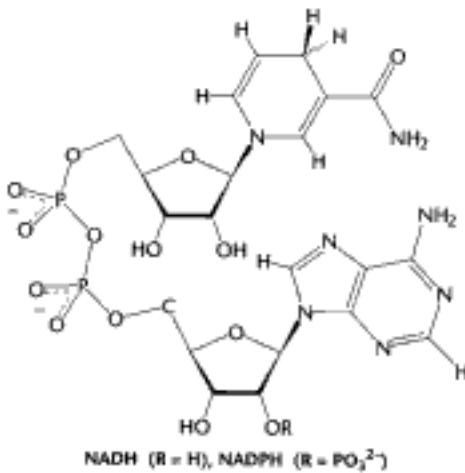
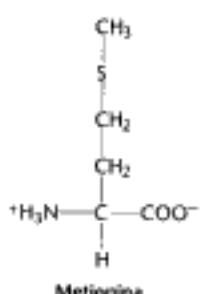
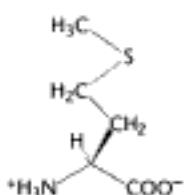
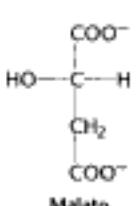
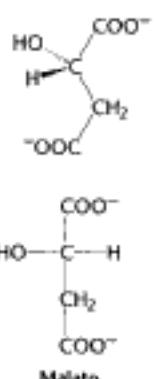
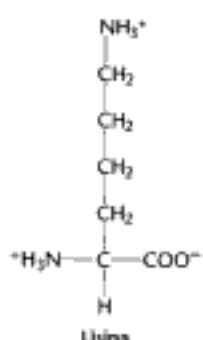
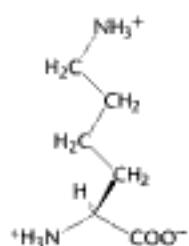
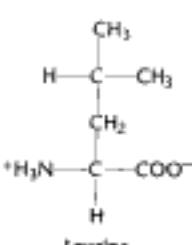
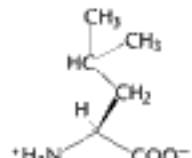
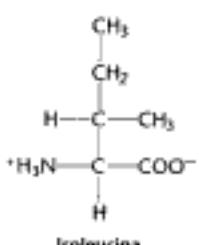
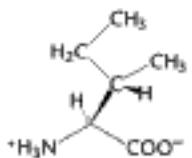
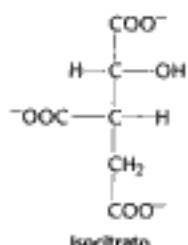
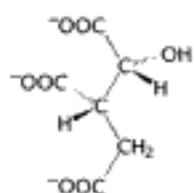
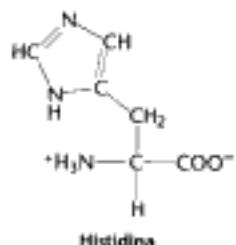
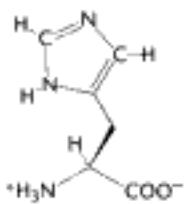


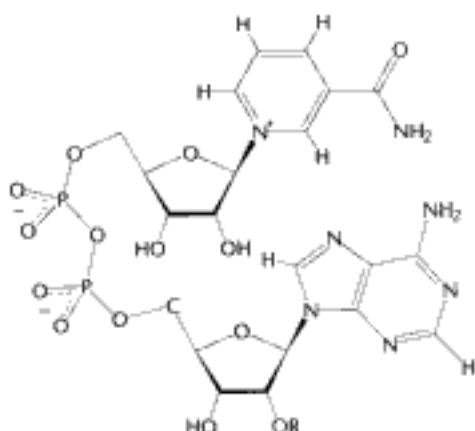
Citosina



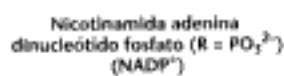




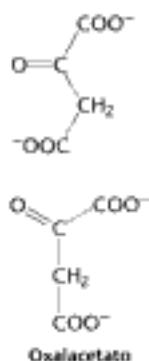




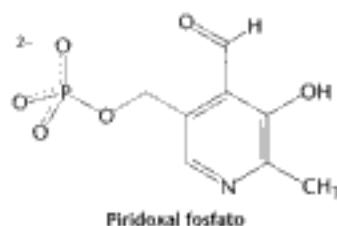
Nicotinamida
adenina dinucleótido ($R = H$),
(NAD^+)



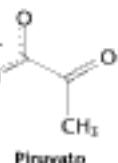
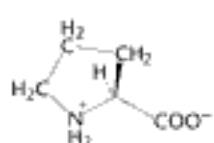
Nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato ($R = PO_4^{2-}$)
($NADP^+$)



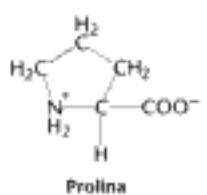
Oxalacetato



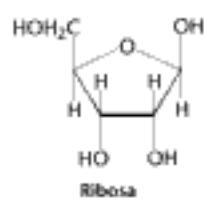
Piridoxal fosfato



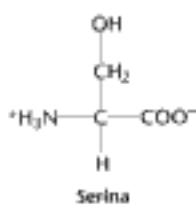
Piruvato



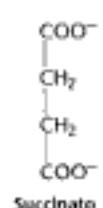
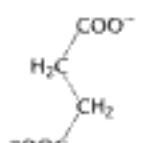
Proline



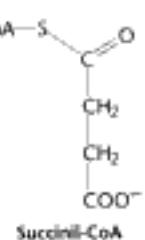
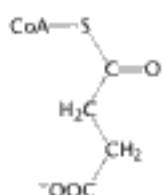
Ribosa



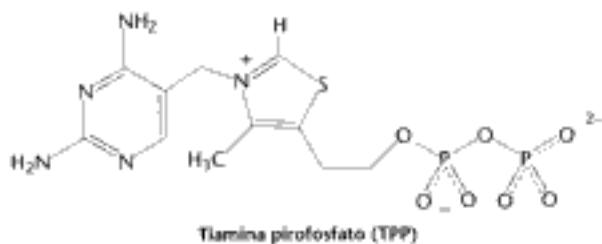
Serina



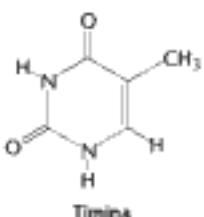
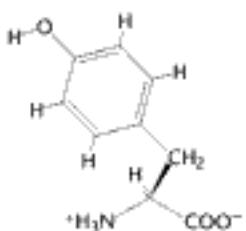
Succinato



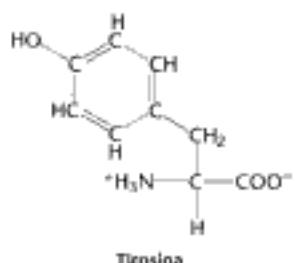
Succinil-CoA



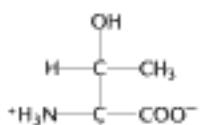
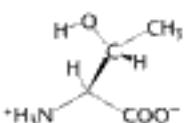
Tiamina pirofosfato (TPP)



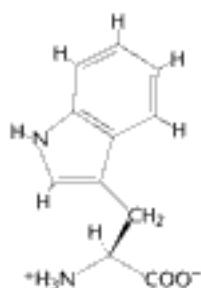
Timina



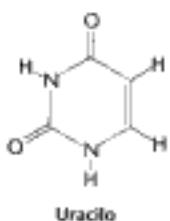
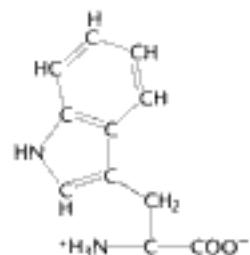
Tiroxina



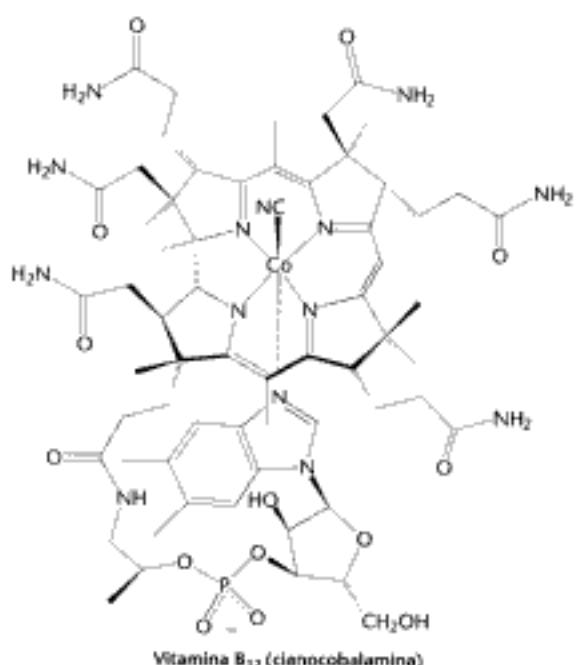
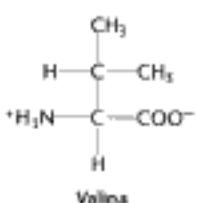
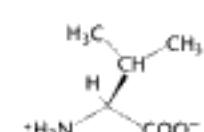
Treonina



Triptófano



Uracilo

Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)

Hidden page

Hidden page

Hidden page

Hidden page

2. Debe utilizarse cDNA de la ovoalbúmina. *E. coli* no dispone de la maquinaria que se requiere para cortar y empalmar el transcripto primario que formaría el DNA del genoma.

3. La presencia de la secuencia *Aat*I sería, como promedio, de $(1/4)^4$, es decir, 1/256, debido a que la probabilidad de cualquier base para estar en una posición determinada es un cuarto y en esa secuencia existen cuatro posiciones. Por la misma razón, la presencia de la secuencia *Nor*I sería $(1/4)^6$, es decir, 1/65 536. Por consiguiente la digestión con *Aat*I produciría fragmentos con una longitud media de ~250 pares de bases (0,25 kb) mientras que con *Nor*I se obtendrían fragmentos de ~66 000 pares de bases (66 kb) de longitud media.

4. No, porque la mayoría de los genes humanos son mucho más largos de 4 kb. Se obtendrían fragmentos que sólo contienen un trozo pequeño del gen completo.

5. La transferencia Southern del DNA digerido con *Mst*II diferenciaría los genes normal y mutante. La pérdida de un centro de restricción provocaría la sustitución de dos fragmentos en la transferencia Southern por un solo fragmento más largo. Este hallazgo no demostraría que el GTG ha sustituido al GAG; otros cambios de la secuencia en el centro de restricción darían el mismo resultado.

6. Una estrategia sencilla para generar muchos mutantes es sintetizar una serie degenerada de *cassettes* utilizando una mezcla de nucleósidos activados en rondas particulares de síntesis de oligonucleótidos. Supongamos que la región codificadora de 30 pb empieza con GTT, que codifica Val. Si en la primera y segunda ronda de síntesis se utiliza una mezcla de los cuatro nucleótidos, los oligonucleótidos resultantes empezarán con la secuencia XYT (en la que X y Y pueden ser A, C, G o T). Estas 16 versiones diferentes de la cassette codificarán proteína que en la primera posición alguno de estos aminoácidos: Phe, Leu, Ile, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Arg o Gly. Del mismo modo, se pueden hacer cassettes degeneradas en los que varían simultáneamente dos o más codones.

7. Puesto que la PCR puede amplificar cantidades tan pequeñas como una sola molécula de DNA, una declaración que asegure que se ha aislado un DNA ancestral debe ser recibida con cierto escepticismo. Ese DNA debería ser secuenciado. Si fuese similar al humano, bacteriano o de hongos lo más probable es que una contaminación fuese la fuente del DNA amplificado. ¿Y si fuese semejante al de las aves o de los cocodrilos? Esta similitud de secuencia reforzaría la tesis de que fuese de dinosaurios, porque estas especies son evolutivamente próximas a los dinosaurios.

8. A una temperatura de hibridación elevada solamente los emparejamientos muy estrictos entre el cebador y la diana serían estables porque todas (o la mayoría) de las bases necesitarían encontrar a su pareja para estabilizar la hélice cebador-diana. Si se baja la temperatura se toleran más emparejamientos erróneos, de modo que se amplifica la posibilidad de obtener genes con menos similitud de secuencias. Respecto al gen de levadura, se necesitaría sintetizar cebadores correspondientes a los extremos del gen y después usar estos cebadores y el genoma humano como diana. Si a 54 °C no se amplifica nada, el gen humano será diferente del de levadura, pero aún puede existir una menor correspondencia. Repetir el experimento a temperatura de hibridación más baja.

9. Digerir el DNA genómico con un enzima de restricción y seleccionar el fragmento que contenga la secuencia conocida. Cerrar en círculo este fragmento. Entonces llevar a cabo un PCR utilizando una pareja de cebadores que sirvan de molde para la síntesis de DNA lejos de la secuencia conocida.

10. La proteína codificada contiene cuatro repeticiones de una secuencia específica.

11. Utilizar síntesis química o reacción en cadena de la polimerasa para preparar sondas de hibridación que sean

complementarias de los dos extremos del fragmento de DNA conocido (previamente aislado). Rechazar los clones que representan los fragmentos de la biblioteca de DNA con sondas de los dos extremos de hibridación. Seleccionar los clones que hibridan con una de las sondas, pero no, con la otra; estos clones son los adecuados para representar los fragmentos de DNA que contienen un extremo del fragmento conocido junto con la región adyacente del cromosoma particular.

12. Aunque pertenecen a una misma especie, los perros individuales muestran una enorme variación en tamaño corporal y una considerable diversidad en otras características físicas. Por tanto, el análisis genómico de los perros individuales aportaría claves valiosas respecto a los genes responsables de la diversidad dentro de la especie.

13. T_m es la temperatura de fusión de un ácido nucleico de doble hebra. Si la temperatura de fusión de los cebadores fuese muy diferente, la extensión de la hibridación con el DNA diana sería distinta durante la fase del emparejamiento. De ello resultaría una replicación diferente de las hebras.

14. Una mutación en el sujeto B ha alterado uno de los genes (alelos) para X, dejando los otros intactos. El hecho de que el gen mutado sea menor sugiere que ha tenido lugar una delección en una de las copias del gen. El otro gen funcional se transcribe y traduce, y aparentemente produce suficiente proteína para que el individuo sea asintomático.

El sujeto C tiene sólo la versión menor del gen. Este gen no se transcribe (Northern blot negativo) ni se traduce (Western blot negativo).

El sujeto D tiene una copia de tamaño normal del gen pero carece de RNA y de proteína. Puede existir una mutación en la región promotora del gen que impide la transcripción.

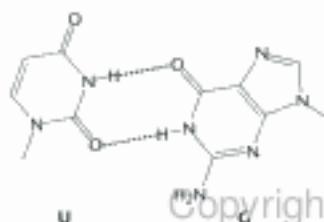
El individuo E tiene una copia de tamaño normal del gen que se transcribe, pero no se sintetiza la proteína, lo que sugiere que una mutación impide la traducción. Hay una serie de explicaciones posibles incluyendo una mutación que habiese introducido un codón stop prematuro en el mRNA.

El sujeto F tiene una cantidad normal de proteína pero aún presenta el problema metabólico. Este resultado sugiere que la mutación afecta a la actividad de la proteína. Por ejemplo, una mutación que altera el centro activo del enzima Y.

15. Chongqing: el residuo 2, L → R, CTG → CGG
 Karachi: el residuo 5, A → P, GCC → CCC
 Rio Swan: el residuo 6, D → G, GAC → GGC

Capítulo 6

1. Hay 26 identidades y dos huecos en una calificación de 210. Las dos secuencias son idénticas aproximadamente en un 26%. El nivel de homología es adecuado para considerarlo estadísticamente significativo.
 2. Es probable que estén emparentadas por evolución divergente, porque la estructura tridimensional se conserva mejor que la identidad de secuencias.
 3. (1) Calificación por identidades = 225; calificación Blosum = 7.
 (2) Calificación por identidades = 15; Blosum = 210.
 4. U



5. Existen 4^{40} , es decir, $1,2 \times 10^{24}$ moléculas diferentes. Cada molécula tiene una masa de $2,2 \times 10^{-24}$, porque 1 mol del polímero tiene una masa de $330 \text{ g mol}^{-1} \times 40$ y hay $6,02 \times 10^{23}$ moléculas mol^{-1} . Por consiguiente se requerirían 26,4 kg de RNA.
6. Porque la estructura tridimensional está mucho más estrechamente asociada a la función que la secuencia, la estructura terciaria está evolutivamente más conservada que la primaria. En otras palabras, la función de las proteínas es su característica más importante y esta función viene determinada por la estructura. Así pues, debe conservarse la estructura y no necesariamente una secuencia específica de aminoácidos.

7. La calificación de alineamiento es $6 \times 10 = 60$. Son posibles muchas respuestas dependiendo de la secuencia reordenada al azar. Un resultado posible sería:

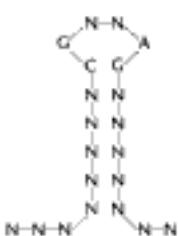
Secuencia barajada: TKADKAGEYL.

Alineamiento: (1) ASNFLDKAGK

TKADKAGEYL

La calificación de alineamiento es $4 \times 10 = 40$

8. (a) Casi con toda certeza divergen de un antepasado común.
 (b) Casi con certeza divergen de un antepasado común.
 (c) Pueden derivar de un antepasado común, pero el alineamiento de secuencias no aporta suficiente evidencia.
 (d) Pueden derivar de un antepasado común pero el alineamiento de secuencias no es adecuado para demostrarlo.
9. La proteína A es claramente homóloga de B, dado el 65% de identidad de secuencias, de modo que debemos esperar que A y B tengan estructuras tridimensionales muy semejantes. Igualmente las proteínas B y C son claramente homólogas, al presentar un 55% de identidad de secuencias, de modo que cabe esperar que B y C tengan estructuras tridimensionales muy similares. Por consiguiente, podemos concluir que las proteínas A y C deben tener estructuras tridimensionales similares, aunque sólo sean idénticas en un 15% de sus secuencias.
10. La estructura secundaria adecuada es:



11. Hay 107 ó 108 identidades (dependiendo de cuál de las secuencias humanas registradas se elija).

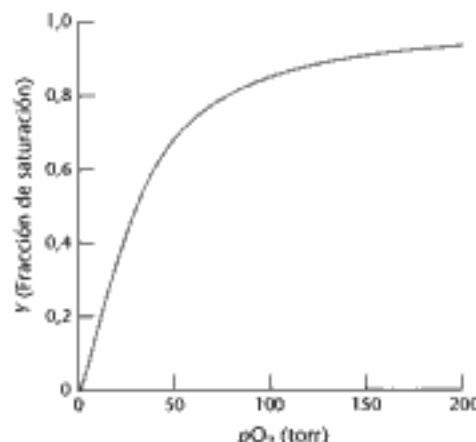
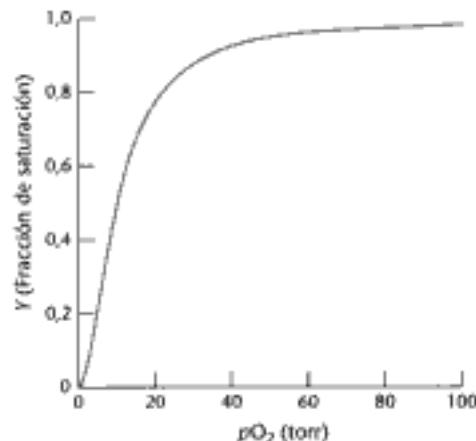
Capítulo 7

- El cachalote se desplaza a grandes distancias entre dos inspiraciones del aire. La elevada concentración de mioglobina en los músculos del cachalote mantiene un aporte adecuado de oxígeno a los músculos entre dos inspiraciones consecutivas.
- La capacidad de transporte de oxígeno sería de 62,7%.
- Una mayor concentración de BPG desplazaría la curva de unión del oxígeno hacia la derecha, originando un aumento en el P_{50} . Los valores mayores del P_{50} provocarían la disociación del oxígeno en los tejidos y por tanto aumentaría el porcentaje de oxígeno liberado en los tejidos.
- La unión del oxígeno parece provocar que los iones cobre y sus ligandos asociados de histidina se desplacen más próximos unos de otros y por tanto también desplacen las hélices a las que las

histidinas están unidas (en semejanza con el cambio conformacional de la hemoglobina).

- La hemoglobina modificada no debería mostrar cooperatividad. Aunque el imidazol en disolución se unirá al hierro del hemo (en vez de la histidina) y facilitará la unión del oxígeno, el imidazol carece de la conexión crucial a la α -hélice particular que debiera desplazarse para transmitir el cambio de conformación.
- El inositol pentafosfato de la parte c.

7. (a)



8. La liberación del ácido hará descender el pH. El descenso de pH promueve la liberación de oxígeno en los tejidos. Sin embargo, la liberación favorecida de oxígeno en los tejidos aumentará la propensión de los glóbulos rojos a tomar forma de boz.

- La hemoglobina "vallada" presenta un bolsillo para la unión reversible del oxígeno al Fe, mientras impide la dimerización Fe-O-Fe. El ligando metilimidazol protege al Fe en la otra cara y evita la dimerización.
- (a) $Y = 0,5$ cuando $pO_2 = 10$ torr. El gráfico de Y frente a pO_2 parece indicar poca o nula cooperatividad.
- (b) El gráfico de Hill muestra una ligera cooperatividad con $n = 1,3$ en la región central.
- (c) Los dímeros desoxi de la hemoglobina de lamprea podrían tener menor afinidad por el oxígeno que los monómeros. Si la unión del primer átomo de oxígeno al dímero origina la disociación del dímero para dar dos monómeros, entonces el proceso sería cooperativo. Según este mecanismo la unión del

oxígeno a cada monómero resultaría más fácil que la unión del primer átomo de oxígeno al dímero desoxi.

Capítulo 8

1. (a) 31,1 μmoles , (b) 0,05 μmoles , (c) 622 s^{-1} .

2. (a) Si $K_M = 5,2 \times 10^{-6} \text{ M}$,

(b) $V_{\max} = 6,84 \times 10^{-10} \text{ moles min}^{-1}$, (c) 337 s^{-1} .

3. La penicilinasa, igual que la glicopéptido transpeptidasa, forma un intermediario acil-enzima con su sustrato pero lo transfiere al agua y no a la glicina terminal del puente de pentaglicina.

4. (a) En ausencia de inhibidor, V_{\max} es $47,6 \mu\text{mol min}^{-1}$ y K_m es $1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$. En presencia de inhibidor, V_{\max} es la misma, y la K_m aparente es $3,1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

(b) Competitiva.

(c) $1,1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

(d) f_{IS} es 0,243 y f_{EI} es 0,488.

(e) f_{IS} es 0,73 en ausencia de inhibidor y 0,49 en presencia de inhibidor $2 \times 10^{-3} \text{ M}$. La relación de estos valores, 1,49, es la misma que la de las velocidades de reacción bajo estas condiciones.

5. (a) V_{\max} es $9,5 \mu\text{mol min}^{-1}$. K_m es $1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$, la misma que sin inhibidor.

(b) No competitiva.

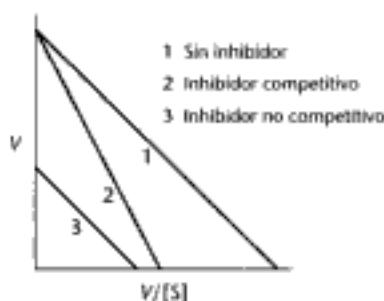
(c) $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

(d) 0,73 en presencia o en ausencia de este inhibidor no competitivo.

6. (a) $V = V_{\max} - (V/[S]) K_m$.

(b) Pendiente = $-K_m$, intersección $y = V_{\max}$, intersección $x = V_{\max}/K_m$.

(c) A continuación se muestra una representación de Eadie-Hofstee.



7. Los dadores potenciales de puentes de hidrógeno a pH 7 son las cadenas laterales de los siguientes residuos: arginina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, serina, treonina, triptófano y tirosina.

8. Las velocidades de utilización de A y B vienen dadas por:

$$V_A = \left(\frac{k_2}{K_M} \right)_A [E][A]$$

y

$$V_B = \left(\frac{k_2}{K_M} \right)_B [E][B]$$

Por consiguiente, la relación entre estas dos velocidades será:

$$\frac{V_A}{V_B} = \left(\frac{k_2}{K_M} \right)_A [A] / \left(\frac{k_2}{K_M} \right)_B [B]$$

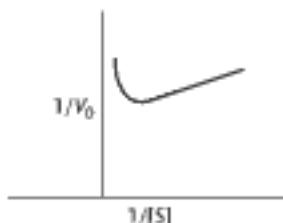
Así pues, el enzima discrimina entre sustratos competitivos, no sobre los valores de K_M , sino sobre los de k_2/K_M .

9. La mutación lentiñifica la reacción en un factor de 100 porque la energía libre de activación aumenta en $53,22 \text{ kJ mol}^{-1}$ (12,72 kcal mol^{-1}). La fuerte unión del sustrato en relación con el estado de transición hace más lenta la catálisis.

10. $11 \mu\text{mol min}^{-1}$.

11. Si la cantidad total de enzima $[E_T]$ aumenta, V_{\max} aumentará porque $V_{\max} = k_2/[E_T]$. Pero como $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$; por ello resulta independiente de la concentración de sustrato. La gráfica de en medio describe esta situación.

12. (a)



(b) Ésta es inhibición por sustrato; a concentraciones elevadas el sustrato forma complejos improductivos en el centro activo. El esquema de abajo muestra cómo podría ocurrir. El sustrato normalmente se une con una orientación definida, representada en el dibujo como rojo con rojo y azul con azul. A concentraciones elevadas el sustrato puede unirse al centro activo de modo que cada extremo de la molécula se sitúa en el centro activo con la orientación adecuada, pero la unión la realizan a la vez dos moléculas diferentes de sustrato.



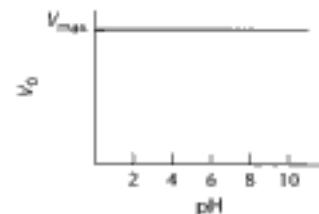
Unión normal del sustrato al centro activo. El sustrato se escindirá y se originarán las bolas roja y azul.



Inhibición por sustrato

13. La etapa limitante de la velocidad será la primera. Los enzimas E_B y E_C operan a $1/2V_{\max}$, mientras que K_m para el enzima E_A es mayor que la concentración de sustrato. E_A estaría operando aproximadamente a $10^{-2} V_{\max}$.

14. (a) Cuando $[S^+]$ es mucho mayor que K_m , el pH tendrá un efecto despreciable sobre el enzima porque S^+ interaccionará con E^- tan pronto como esté disponible.

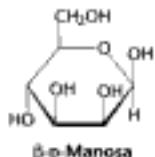


(b) Cuando $[S^+]$ sea mucho menor que el valor de K_m , el gráfico de V_0 respecto al pH se convierte en una curva de valoración de los grupos ionizables, siendo la actividad enzimática el indicador de la valoración. A pH bajo, la elevada concentración de H^+ mantendrá el enzima en la forma EH inactiva. Cuando el pH

Hidden page

Hidden page

3. (a) Aldosa-cetosa, (b) epímeros, (c) aldosa-cetosa, (d) anómeros, (e) aldosa-cetosa y (f) epímeros.
 4. La proporción del anómero α es 0,36 y la del anómero β es 0,64.
 5. La glucosa es reactiva debido a la presencia de un grupo aldehido en su forma de cadena abierta. El grupo aldehido se condensa lentamente con los grupos amino para formar aductos tipo bases de Schiff.
 6. Un piranósido reacciona con dos moléculas de periodato; uno de los productos es el formiato. Un furanósido reacciona solamente con una molécula de periodato; no se produce formiato.
 7. Del metanol.
 8. (a) β -D-Manosa; (b) β -D-galactosa; (c) β -D-fructosa; (d) β -D-glucosamina.
 9. Si la unidad de trisacárido de la glicoproteína es crítica para la interacción, el trisacárido por sí mismo debe ser un inhibidor competitivo de la adhesión celular.
 10. Los extremos reductores formarán 1,2,3,6-tetrametilglucosa. Los puntos de ramificación darán 2,3-dimetilglucosa. El resto de la molécula originaria 2,3,6-trimetilglucosa.
 11. (a) Es un azúcar no reductor. No son posibles formas con cadena abierta. (b) D-Galactosa, D-glucosa y D-fructosa.
 (c) D-Galactosa y sacarosa (glucosa + fructosa).
 12.

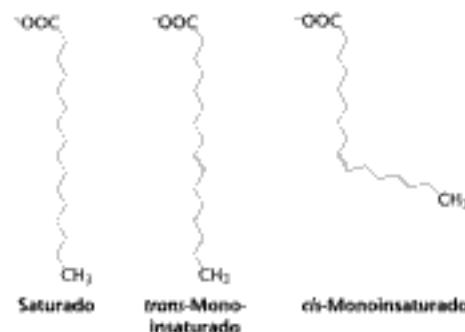


- La unión hemiacetal del anómero α se rompe para originar la forma abierta. La rotación de los enlaces entre C-1 y C-2 permite la formación del anómero β y resulta una mezcla de isómeros.
 13. El calor convierte la forma piranosa muy dulce en la forma furanosa más estable pero menos dulce. En consecuencia es difícil controlar con precisión el dulzor de la preparación, lo cual también explica por qué la miel pierde dulzor con el tiempo. Para la estructura ver la figura 11.6.
 14. (a) Cada molécula de glucógeno tiene un extremo reductor, mientras que el número de extremos no reductores viene determinado por el número de ramas o de enlaces α -1,6.
 (b) Debido a que el número de extremos no reductores excede en gran medida al de reductores, en una colección de moléculas de glucógeno los procesos de degradación y de síntesis tienen lugar en los extremos no reductores para aumentar al máximo esos dos procesos.
 15. 64. Cada sitio puede estar o no estar glicosilado, de modo que el número de proteínas posibles sería $2^6 = 64$.
 16. Tal como se estudió en el capítulo 9, muchos enzimas son estereoespecíficos. Los enzimas de la síntesis de la sacarosa distinguen claramente entre los isómeros de los sustratos y unen únicamente la pareja correcta.

Capítulo 12

1. $2,86 \times 10^6$ moléculas, porque cada hoja de la bicapa contiene $1,43 \times 10^6$ moléculas.
 2. 2×10^{-7} cm, $6,32 \times 10^{-6}$ cm y 2×10^{-4} cm.
 3. El radio de esta molécula es de $3,1 \times 10^{-7}$ cm y su coeficiente de difusión es de $7,4 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Las distancias medias recorridas son $1,72 \times 10^{-7}$ cm en 1 ms, $5,42 \times 10^{-6}$ en 1 μs y $1,7 \times 10^{-4}$ cm en 1 s.

4. Cuando la temperatura baja la membrana sufre una transición de fase desde un estado muy fluido a otro casi congelado. Un portador puede transferir iones a través de la membrana solamente cuando la bicapa es muy fluida. En cambio, un formador de conductos permite que los iones atraviesen su poro aunque la bicapa sea totalmente rígida.
 5. El decrecimiento inicial en la amplitud del espectro de resonancia paramagnética resalta de la reducción de moléculas de fosfatidilcolina de spin marcado en la hoja externa de la bicapa. En estas condiciones experimentales el ascorbato no atraviesa la membrana y por ello no se reducen los fosfolípidos en la hoja interna. El decalamiento lento del espectro residual es debido a la reducción de fosfolípidos que se han desplazado a la hoja externa de la bicapa.
 6. La adición del carbohidrato introduce una barrera energética significativa en el flip-flop porque el componente carbohidrato hidrofílico tendría que desplazarse a través de un entorno hidrofóbico. Esta barrera energética potencia la asimetría de la membrana.
 7. La presencia de un doble enlace cis introduce un pliegue que dificulta el empaquetamiento de los ácidos grasos. Los dobles enlaces cis mantienen la fluidez. Los ácidos grasos trans no tienen efectos estructurales, pero resultan poco frecuentes.



8. En un entorno hidrofóbico, la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios estabilizaría el átomo de hidrógeno amídico con el oxígeno carbonílico de la cadena polipeptídica, de modo que se formaría una hélice α . En un entorno acuoso, estos grupos se estabilizarian mediante interacciones con el agua, de modo que no hay razones de tipo energético para que se forme una hélice α . Por consiguiente, es más probable que se formen hélices α en un entorno hidrofóbico.
 9. El desplazamiento a temperaturas más bajas haría decrecer la fluidez, al potenciar el empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas por interacciones de van der Waals. Para evitarlo se sintetizarían nuevos fosfolípidos con cadenas más cortas y mayor número de dobles enlaces. Las cadenas más cortas reducirían el conjunto de interacciones de van der Waals y los dobles enlaces cis originarían pliegues en la estructura que impedirían el empaquetamiento de las colas de ácido graso de los fosfolípidos.
 10. Cada una de las 21 proteínas v-SNARE podría interactuar con cada uno de los 7 socios t-SNARE. El número total de diferentes pares que interactuarían se obtiene por multiplicación: $7 \times 21 = 147$ diferentes parejas v-SNARE-t-SNARE.
 11. (a) El gráfico muestra que al aumentar la temperatura la bicapa lípida se hace más fluida. T_m es la temperatura de transición desde un estado menos fluido a otro más fluido. El colesterol amplifica la transición desde un estado al otro. En resumen, el colesterol hace que la fluidez de la membrana sea menos sensible a los cambios de temperatura.

(b) Este efecto es importante porque la presencia de colesterol tiende a estabilizar la fluididad de la membrana evitando las transiciones bruscas. Como la función de las proteínas depende de la fluididad de las membranas, el colesterol mantiene el entorno apropiado para la función de las proteínas de membrana.

12. La proteína C es una proteína transmembrana de *C. elegans*. Atraviesa la membrana mediante cuatro hélices α que coinciden fundamentalmente con los cuatro picos del gráfico de hidropatía. Llamativamente, la proteína A también es una proteína de membrana, una porina. Esta proteína está constituida principalmente por láminas β y carece de las ventanas predominantemente hidrofóbicas de las hélices de membrana. Este gráfico demuestra que, aunque estos gráficos de hidropatía son útiles, no resultan infalibles.

13. Para purificar cualquier proteína, primero hay que solubilizarla. En el caso de proteínas de membrana la solubilización requiere un detergente: moléculas hidrofóbicas que se unen a la proteína y después reemplazan al entorno lipídico de la membrana. Si se separa el detergente la proteína se agrega y precipita de la disolución. A menudo resulta difícil llevar a cabo las etapas de purificación, tales como cromatografía de intercambio iónico, en presencia de suficiente detergente para mantener soluble a la proteína. Se deben generar cristales de complejos proteína-detergente apropiados.

Capítulo 13

1. El costo de energía libre es de 32 kJ mol^{-1} ($7.6 \text{ kcal mol}^{-1}$). El trabajo químico realizado es 20.4 kJ mol^{-1} ($4.9 \text{ kcal mol}^{-1}$) y el trabajo eléctrico realizado es 11.5 kJ mol^{-1} ($2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$).

2. La concentración de glucosa dentro de la célula es 66 veces mayor que la externa [$(c_2/c_1) = 66$] cuando el aporte de energía libre es de 10.8 kJ mol^{-1} ($2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$).

3. Por analogía con la Ca^{2+} -ATPasa, con tres iones Na^+ unidos a la conformación E_1 en el interior de la célula y con dos iones K^+ unidos a la conformación E_2 en el exterior de la célula, el mecanismo posible sería el siguiente:

- Podría empezar un ciclo catalítico con el enzima en su estado desfosforilado (E_1) con tres iones sodio unidos.
- La conformación E_1 enlaza ATP. Un cambio conformacional atrapa los iones sodio dentro del enzima.
- Se transfiere el grupo fosforilo desde el ATP a un residuo aspartilo.
- Al liberar ADP el enzima cambia su conformación global, incluyendo el dominio de membrana. La nueva conformación (E_2) libera los iones sodio al lado de la membrana opuesto al que habían entrado y enlaza dos iones potasio en el lado en que ha liberado los iones sodio.
- El residuo fosforilaspartato se hidroliza liberando fosfato inorgánico.

Con la liberación del fosfato se pierden las interacciones que estabilizan E_2 y el enzima vuelve a la conformación E_1 . Los iones potasio se liberan en la cara citoplasmática de la membrana. La unión de tres iones sodio del lado citoplasmático de la membrana completa el ciclo.

4. Establecer un gradiente de lactosa a través de vesículas de membrana que contengan lactosa permeasa adecuadamente orientada. Inicialmente el pH debería ser el mismo a ambos lados de la membrana y la concentración de lactosa debería ser mayor en el lado "salida" de la lactosa permeasa. A medida que la lactosa

fluye "al revés" a través de la permeasa disminuye su gradiente de concentración, mientras que se establece un gradiente de pH que puede medirse cuando se disipa el gradiente de lactosa.

5. Un conducto iónico debe transportar los iones en ambas direcciones con la misma velocidad. El flujo neto de esos iones sólo viene determinado por la composición de las disoluciones a los dos lados de la membrana.

6. El grupo guanidinio cargado positivamente se parece al sodio y se une a los grupos carboxilato cargados negativamente en la boca del conducto.

7. El bloqueo de los conductos iónicos inhibe los potenciales de acción, produciendo la pérdida de la función nerviosa. Igual que la tetradotoxina, estas moléculas de toxina son útiles para aislar e inhibir específicamente a determinados conductos iónicos.

8. Porque los iones sodio están cargados y, como los conductos de sodio, sólo transportan a ese ion (y no a aniones), la acumulación de un exceso de cargas positivas a un lado de la membrana domina a los gradientes químicos.

9. No. Los conductos se abrirán o cerrarán adecuadamente en respuesta a un estímulo externo, pero la conductancia unitaria del conducto abierto resultaría muy poco influenciada.

10. La razón de las formas cerrada/abierta del conducto es 10^5 , 5000, 250, 12.5 y 0.625 cuando están unidos, respectivamente, 0, 1, 2, 3 ó 4 ligandos. Por tanto, la fracción de los conductos abiertos es 10^{-5} , 2×10^{-5} , 3.98×10^{-5} , 7.41×10^{-2} y 0.62.

11. Estos fosfatos orgánicos inhiben a la acetilcolinesterasa porque reaccionan con la serina del centro activo para formar un derivado fosforilado estable. Así se provoca una parálisis respiratoria al bloquear la transmisión sináptica de las sinapsis colinérgicas.

12. (a) La unión de la primera molécula de acetilcolina aumenta la razón abierto/cerrado por un factor de 240, y la unión de la segunda por un factor de 11 700.

(b) Por lo tanto los aportes de energía libre son respectivamente 14 kJ mol^{-1} ($3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) y 23 kJ mol^{-1} ($5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$).

(c) No. El modelo MCW predice que la unión de cada ligando tendrá el mismo efecto sobre la razón abierto/cerrado.

13. La batracotoxina bloquea la transición del estado abierto al cerrado.

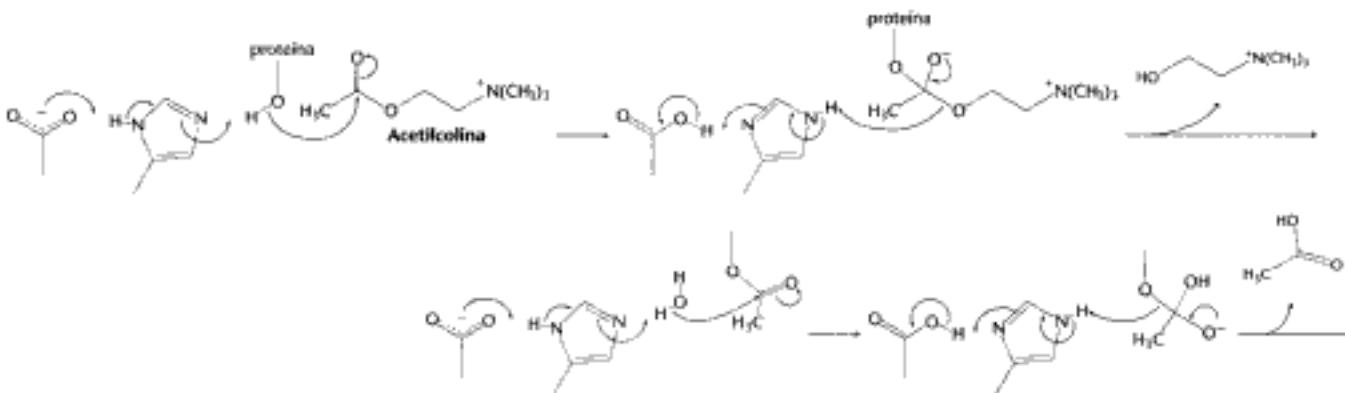
14. (a) Los iones cloruro fluyen hacia dentro de la célula

(b) El flujo de cloruro es inhibidor porque hiperpolariza la membrana.

(c) El conducto consta de cinco subunidades.

15. La hazafia catalítica de la colinesterasa asegura que la duración del impulso nervioso sea muy corta.

16. Ver la ecuación de abajo.



17. (a) La toxina sólo inhibe a ASIC1a. (b) Sí; cuando se retira la toxina la actividad del conducto sensible a los ácidos empieza a restaurarse. (c) 0,9 nM.

18. Esta mutación pertenece a la clase de mutaciones cuyo efecto es el síndrome de los conductos lentos (SCS). Los resultados sugieren que existe un defecto en el cierre del conducto; de modo que éste permanece abierto durante períodos prolongados de tiempo. Alternativamente, el conducto puede tener una afinidad elevada por la acetilcolina que controla al conducto.

19. La mutación reduce la afinidad de la acetilcolina por el receptor. El registro mostraría la apertura del conducto sólo esporádicamente.

20. La glucosa presenta una curva de transporte que sugiere la participación de un portador, porque la velocidad inicial es elevada pero se aminora a concentraciones mayores, efecto compatible con la saturación del portador, lo que recuerda a los enzimas michaelianos (p. 217). El indol no presenta el fenómeno de la saturación, lo que implica que la molécula es lipofílica y atraviesa la membrana por difusión simple. La ouabaina es un inhibidor específico de la bomba $\text{Na}^+ \text{-K}^+$. Si la ouabaina fuese a inhibir el transporte de la glucosa se debería a la existencia de un cotransportador $\text{Na}^+ \text{-glucosa}$.

Capítulo 14

1. Los residuos de glutamato cargados negativamente imitan a los residuos de fosfoserina o fosfatreonina cargados negativamente y estabilizan la conformación activa del enzima.

2. No. La fosfoserina y la fosfatreonina son notablemente más cortas que la fosfotirosina.

3. Los receptores del factor de crecimiento pueden activarse por dimerización. Si un anticuerpo consigue que un receptor se dimerice, en la célula se activaría la vía de transducción de señal.

4. La subunidad α mutada estaría siempre en la forma GTP y, por consiguiente, permanecería en forma activa, estimulando su vía señalizadora.

5. Los iones calcio difunden lentamente porque se unen a muchas superficies proteicas dentro de la célula impidiendo su movimiento libre. El cAMP no se une con esa frecuencia y por ello difunde con mayor rapidez.

6. G_{ox} estimula a la adenilato ciclase, llevándola a generar cAMP. Esta señal provoca la movilización de la glucosa (véase el Cap. 21). Si la cAMP fosfodiesterasa estuviese inhibida, entonces los niveles de cAMP continuarían siendo elevados aun después de finalizar la señal de la adrenalina y continuaría la movilización de la glucosa.

7. La red completa de vías iniciada por la insulina incluye un gran número de proteínas y resulta sustancialmente más compleja que la indicada en la figura 14.24. Además, en la terminación de la señal de la insulina actúan muchas más proteínas. Un defecto en cualquiera de las proteínas de la vía de señalización de la insulina o de la terminación subsiguiente de la respuesta a la insulina podría originar potencialmente algún problema. Por tanto, no resulta sorprendente que muchos defectos genéticos distintos puedan causar los dos tipos de diabetes.

8. La unión de hormona de crecimiento hace que su receptor monomérico se dimerice. El receptor dímerico puede entonces activar a una tirosina quinasa separada a la que se enlaza el receptor. La vía de señalización puede entonces continuar de modo semejante a las vías que son activadas por el receptor de insulina o bien otros receptores de EGF de mamífero.

9. La insulina puede conseguir la respuesta que normalmente obtiene el EGF. La unión de insulina estimulará fácilmente la dimerización y la fosforilación del receptor quinomérico y por tanto señalar los sucesos subsiguientes que normalmente provocan la unión de EGF. La exposición de estas células al EGF no tendría efecto alguno.

10. 10^5

11. La formación de diacilglicerol implica la participación de la fosfolipasa C. Una vía sencilla implicaría la activación del receptor por fosforilación cruzada, seguida de la unión de fosfolipasa C γ (a través de los dominios SH2). La participación de la fosfolipasa C indicaría que se formó IP $_3$, y, por consiguiente, aumentarían las concentraciones de calcio.

12. En la reacción catalizada por la adenilato ciclase, el grupo 3'-OH ataca nucleofílicamente al átomo de fósforo a unido al grupo 5'-OH, desplazando al pirofosfato. La reacción catalizada por la DNA polimerasa es similar, excepto en que el grupo 3'-OH pertenece a un nucleótido diferente.

13. (a) $X \approx 10^{-7} \text{ M}$; $Y \approx 5 \times 10^{-6} \text{ M}$; $Z \approx 10^{-3} \text{ M}$.

(b) X representa una afinidad más elevada porque se requiere una cantidad mucho más pequeña de X para ocupar la mitad de los centros.

(c) La afinidad de enlace encaja casi perfectamente con la capacidad de estimular a la adenilato ciclase, lo que sugiere que el complejo hormona-receptor conduce a la estimulación de ese enzima.

(d) Trataríamos de realizar el experimento en presencia de anticuerpos contra G_{ox} .

14. (a) La unión total no distingue entre unión a un receptor específico, unión a receptores diferentes y unión inespecífica a la membrana.

Hidden page

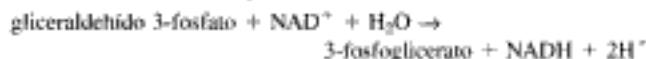
entre los dos lóbulos del enzima. Sin embargo, la xilosa carece del hidroximetilo y por eso no puede fosforilarse. En su lugar, el centro ocupado normalmente por el hidroximetilo C-6 lo ocupa una molécula de agua que actúa como aceptora del fosforilo procedente del ATP.

8. (a) La vía de la fructosa 1-fosfato forma gliceraldehido 3-fosfato.
- (b) Se prescinde de la fosfofructoquinasa, un enzima clave de control. Además, la fructosa 1-fosfato estimula a la piruvato quinasa.
9. (a) Aumenta; (b) aumenta; (c) aumenta; (d) disminuye.
10. La fructosa 2,6-bisfosfato, presente a concentraciones elevadas cuando abunda la glucosa, normalmente inhibe a la gluconeogénesis porque bloques a la fructosa 1,6-bisfosfatasa. En esta anomalía genética la fosfatasa es activa con independencia del nivel de glucosa. Por consiguiente, se incrementa el ciclo de sustrato. El nivel de fructosa 1,6-bisfosfato es, por tanto, menor de lo normal. Se forma menos piruvato y, por consiguiente, se genera menos ATP.

11. Las reacciones *b* y *e* resultarían bloqueadas.

12. No habría carbonos marcados. El CO₂ añadido al piruvato (formado a partir de lactato) para originar oxalacetato se pierde al convertir el oxalacetato en fosfoenolpiruvato.

13. La reacción neta en presencia de arseniato es:



En presencia de arseniato la glicólisis tiene lugar, pero se pierde el ATP que normalmente se formaría en la conversión de 1,3-bisfosfoglicerato en 3-fosfoglicerato. Así pues, el arseniato desacopla la oxidación y la fosforilación al formarse un acilarsenato extremadamente labil.

14. Este ejemplo ilustra la diferencia entre la utilización *estequiométrica* o *catalítica* de una molécula. Si la célula utilizase el NAD⁺ estequiométricamente, se necesitaría una nueva molécula de NAD⁺ cada vez que se produjese lactato. Tal como veremos, la síntesis de NAD⁺ requiere consumir ATP. Por otro lado, si el NAD⁺ que se convierte en NADH fuese reciclado y reutilizado, una pequeña cantidad de esa molécula podría regenerar una gran cantidad de lactato. Este es el caso que se da en la célula. El NAD⁺ se regenera por oxidación del NADH y luego se reutiliza. Por tanto, el NAD⁺ se usa catalíticamente.

15. Consideremos la ecuación de equilibrio de la adenilato quinasa:

$$K_{eq} = [\text{ATP}][\text{AMP}] / [\text{ADP}]^2 \quad (1)$$

o bien

$$[\text{AMP}] = K_{eq}[\text{ADP}]^2 / [\text{ATP}] \quad (2)$$

Recordemos que en la célula [ATP] > [ADP] > [AMP]. A medida que se utiliza el ATP se produce una pequeña disminución en su concentración que se acompaña de un incremento porcentual mayor en [ADP] porque su concentración era menor. Este mayor porcentaje incrementará aún más la [AMP] porque se relaciona con el cuadrado de [ADP]. En resumen, la ecuación 2 demuestra que el registro del estado energético mediante el AMP amplifica pequeños cambios en la [ATP], consiguiendo un control más riguroso.

16. La síntesis de glucosa durante un ejercicio intenso constituye un buen ejemplo de cooperación entre órganos en los organismos superiores. Cuando el músculo se contrae vigorosamente se produce lactato a partir de la glucosa, mediante la glicólisis. El lactato se libera a la sangre y es absorbido por el hígado donde se convertirá en glucosa, mediante la gluconeogénesis. Esta glucosa

nuevamente sintetizada se libera y es captada por el músculo para generar energía.

17. El consumo de cuatro moléculas más con elevados potenciales de transferencia de fosforilos desplaza la constante de equilibrio de la gluconeogénesis por un factor de 10¹², lo que hace termodinámicamente factible la conversión de piruvato en glucosa. Sin este aporte energético la gluconeogénesis no tendría lugar.
18. El mecanismo es análogo al de la triosa fosfato isomerasa (Figura 16-5). Tiene lugar a través de un intermediario enodiol. Se debe esperar que el centro activo tenga una base general (análoga al glutamato 165 de TPI) y un ácido general (análogo a la histidina 95 de TPI).

19. La galactosa es un componente de las glicoproteínas. Probablemente la ausencia de galactosa supondría una inadecuada formación o función de las glicoproteínas que requiere el sistema nervioso central. Más generalmente, el hecho de que los síntomas aparezcan en ausencia de galactosa sugiere que la galactosa es necesaria de alguna manera.

20. (a) Curiosamente, el enzima utiliza ADP como dador de fosforilos, en vez de ATP.
- (b) Tanto el AMP como el ATP actúan como inhibidores competitivos del ADP, el dador de fosforilos. Aparentemente, el enzima de *P. furiosus* no es inhibido alostéricamente por el ATP.

Capítulo 17

1. (a) Después de una vuelta del ciclo del ácido cítrico, el marcaje aparece en C-2 y C-3 del oxalacetato.
- (b) En la formación de acetil-CoA a partir de piruvato, el marcaje aparece en el CO₂.
- (c) Después de una vuelta del ciclo del ácido cítrico, el marcaje aparece en C-1 y C-4 del oxalacetato.
- (d) y (e) El mismo destino que en la parte *a*.
2. (a) Además de los enzimas del ciclo del ácido cítrico, se requieren la isocitrato liasa y la malato sintasa.
- (b) 2 Acetil-CoA + 2 NAD⁺ + FAD + 3 H₂O → oxalacetato + 2 CoA + 2 NADH + FADH₂ + 3 H⁺
- (c) No. Por consiguiente, los mamíferos no pueden producir una síntesis neta de oxalacetato a partir de acetil-CoA.

3. -41,0 kJ mol⁻¹ (-9,8 kcal mol⁻¹).

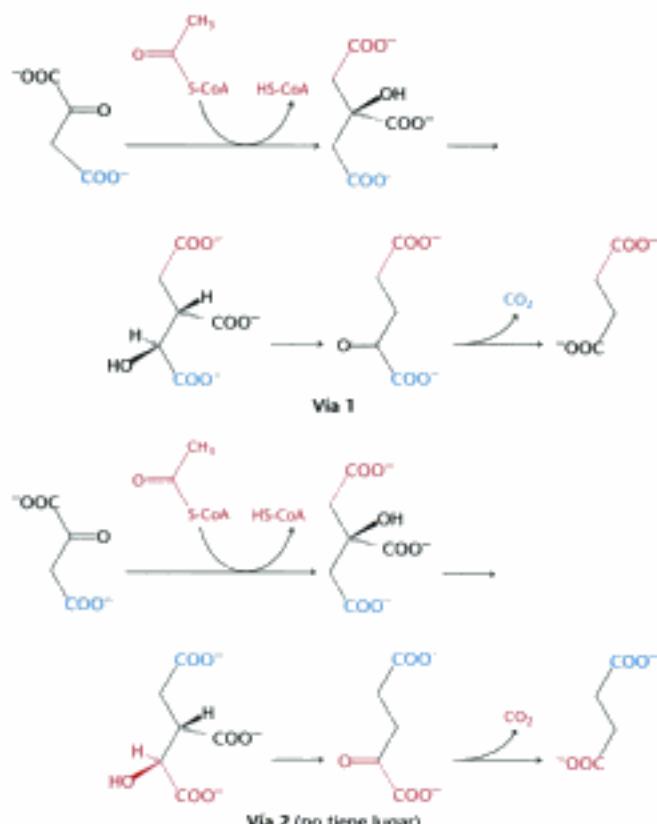
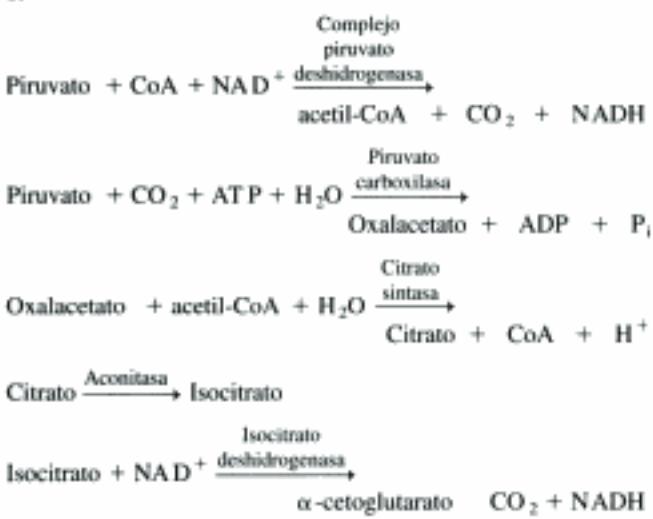
4. Los enzimas y los complejos enzimáticos son catalizadores biológicos. Recordemos que un catalizador facilita una reacción química sin que él mismo se altere de modo permanente. El oxalacetato se puede considerar como un catalizador porque se une a un grupo acetilo, lo guía a la descarboxilación oxidativa de sus dos carbonos y él mismo se regenera al completar el ciclo. En resumen, el oxalacetato (y cualquier intermediario del ciclo) actúa como un catalizador.

5. El pirofosfato de tiamina tiazolotina es un análogo del estado de transición. El anillo azufrado de este análogo está descargado y es muy similar al estado de transición del coenzima normal, en las reacciones catalizadas por la tiamina (por ejemplo, la forma resonante del hidroxietil-TPP descargado).

6. Una disminución de la cantidad de CO₂ requerirá un aumento de la glicólisis anaeróbica para producir más energía, originando la formación de grandes cantidades de ácido láctico. En condiciones de shock se administra un inhibidor de la quinasa para garantizar que la piruvato deshidrogenasa opere al máximo.

7. (a) Las concentraciones estacionarias de los productos son exigüas comparándolas con las de los sustratos. (b) La relación entre malato y oxalacetato debe ser mayor que 1,57 × 10⁴ para que se forme oxalacetato.

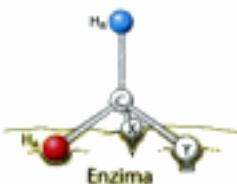
8.



9. No podemos conseguir la conversión neta de las grasas en glucosa debido a que la única forma de introducir los carbonos de la grasa en el oxalacetato, el precursor de la glucosa, es a través del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, aunque entren en el ciclo dos carbonos en forma de acetil-CoA, se pierden también dos carbonos en forma de CO_2 , antes de que se forme oxalacetato. Así pues, aunque algunos átomos de carbono procedentes de las grasas puedan acabar como átomos de la glucosa, no podemos obtener una síntesis neta de glucosa a partir de grasas.

10. El intermediario enólico del acetil-CoA ataca al átomo de carbono carbonílico del glioíxilato para formar un enlace C-C. Esta reacción es similar a la de condensación del oxalacetato con el intermediario enólico del acetil-CoA en la reacción catalizada por la citrato sintasa. El glioíxilato contiene un átomo de hidrógeno en lugar del grupo $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ del oxalacetato; por otra parte, la reacción es prácticamente idéntica en ambos casos.

11. El citrato es una molécula simétrica. En consecuencia, se supuso que los dos grupos $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ deberían reaccionar de forma idéntica. Así pues, por cada molécula de citrato que reaccionase según la vía 1*, existiría otra molécula que lo haría por la vía 2*. De este modo solamente *la mitad* del carbono marcado aparecería en forma de CO_2 .



Los grupos tales como H_A y H_B , no equivalentes desde el punto de vista estérico, casi siempre se diferenciarán en las reacciones enzimáticas. La causa de esta diferenciación es que el enzima mantiene al sustrato en una orientación específica. La unión a estos tres lugares, tal como se ha descrito en este esquema, es una manera fácilmente visible de lograr esa orientación del sustrato, pero no es la única forma de conseguir esa orientación.

13. (a) La oxidación completa del citrato requiere 4.5 μmoles de O_2 por cada μmol de citrato.



Así pues, 3 μmoles de citrato consumirán 13.5 μmoles de O_2 .

(b) El citrato induce el consumo de mucho más O_2 del que se requiere para la simple oxidación del citrato. Por consiguiente, el citrato facilita el consumo de O_2 por el tejido.

14. (a) En ausencia de arsenito, el total de citrato permanece constante. En su presencia, el nivel de citrato cae, lo que sugiere que es metabolizado.

(b) La acción del arsenito no se altera. El citrato aún desaparece. (c) El arsenito impide la regeneración del citrato. Recordemos (p. 495) que el arsenito inhibe al complejo piruvato deshidrogenasa.

15. (a) La infección inicial no resulta afectada por la ausencia de isocitrato liasa, pero la ausencia de este enzima inhibe a la fase latente de la infección.

(b) Sí.

(c) Un crítico podría decir que, en el proceso de eliminación del gen de la isocitrato liasa, se lesionó a algún otro gen y la ausencia de ese otro gen evita la infección latente. La reinserción del gen de la isocitrato liasa en las bacterias de las que había sido eliminado deshace la validez de esta crítica.

(d) La citrato liasa capacita a la bacteria para sintetizar los carbohidratos que necesita para sobrevivir, incluyendo los carbohidratos que integran la membrana celular.

Capítulo 18

1. (a) 12,5; (b) 14; (c) 32; (d) 13,5; (e) 30; (f) 16.

2. Los bioquímicos utilizan E'_0 , el valor a pH 7, mientras que los químicos utilizan E_0 , el valor a concentración de $H^+ 1\text{ M}$. El acento (prima) significa que el estado estándar es a pH 7.

3. (a) El transporte electrónico y la síntesis de ATP bloqueados en el complejo IV.

(b) Transporte de electrones y síntesis de ATP bloqueados por inhibición del paso de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interna.

(c) Transporte de electrones y síntesis de ATP bloqueados en el complejo I.

(d) Síntesis de ATP bloqueada sin inhibición del transporte de electrones, porque se disipa el gradiente de protones.

(e) Transporte de electrones y síntesis de ATP bloqueados en el complejo IV.

(f) Transporte de electrones y síntesis de ATP bloqueados en el complejo III.

4. Si no se disipa el gradiente de protones por la entrada de protones a la mitocondria, generando ATP, el exterior de la mitocondria puede adquirir una carga positiva tan grande que la cadena de transporte de electrones no puede bombear protones contra ese gradiente.

5. (a) Ningún efecto. La mitocondria no puede metabolizar la glucosa.

(b) Ningún efecto. No hay combustible para potenciar la síntesis de ATP.

(c) La $[O_2]$ cae porque el citrato es un combustible útil y se puede formar ATP a partir de ADP y P_i .

(d) El consumo de oxígeno se detiene porque la oligomicina inhibe la síntesis de ATP, que está acoplada a la actividad de la cadena de transporte electrónico.

(e) No hay efecto por la razón aducida en el apartado d.

(f) La $[O_2]$ cae rápidamente porque el sistema está desacoplado y no requiere la síntesis de ATP para que disminuya la fuerza protonmotriz.

(g) La $[O_2]$ cae aunque a menor velocidad. La rotenona inhibe al complejo I, pero la presencia de succinato posibilita que los electrones entren en el complejo II.

(h) Cesa el consumo de oxígeno porque se inhibe el complejo IV y toda la cadena queda bloqueada.

6. (a) La razón P:O es igual al producto de $(H^+/2e^-)$ y $(-\Delta P/H^+)$. Nótese que la razón P:O es idéntica a la razón $(-\Delta P/2e^-)$.

(b) 2,5 y 1,5, respectivamente.

7. ΔG° es de $+67\text{ kJ mol}^{-1}$ ($+16,1\text{ kcal mol}^{-1}$) para la oxidación por NAD^+ y de $+47,7\text{ kJ mol}^{-1}$ ($+11,4\text{ kcal mol}^{-1}$) para la oxidación por FAD. La oxidación del succinato por NAD^+ no es termodinámicamente factible.

8. El cianuro puede resultar letal porque se une a la forma férrica de la citocromo oxidasa y, por tanto, inhibe la fosforilación oxidativa. El nítrito convierte la ferrihemoglobina en ferrihemoglobina a la que también se une el cianuro. Así pues, la ferrihemoglobina compite por el cianuro con la citocromo oxidasa. Esta competencia es terapéuticamente eficaz puesto que la cantidad de ferrihemoglobina que puede formarse sin perturbar al transporte de oxígeno es mucho mayor que la cantidad de citocromo oxidasa total.

9. La energía libre disponible por la translocación de 2, 3 y 4 protones es respectivamente $-38,5$, $-57,7$ y $-77,4\text{ kJ mol}^{-1}$ ($-9,23$, $-13,8$ y $-18,5\text{ kcal mol}^{-1}$). La energía libre que se consume en la síntesis de un mol de ATP en condiciones estándar es $30,5\text{ kJ}$ ($7,3\text{ kcal}$). Así pues, la energía libre residual de $-8,1$, $-27,2$ y $-46,7\text{ kJ mol}^{-1}$ ($-1,93$, $-6,5$ y $-11,2\text{ kcal mol}^{-1}$) puede facilitar la síntesis de ATP hasta que la relación $[ATP]/[ADP][P_i]$ sea respectivamente $26,2$, $6,5 \times 10^4$ y $1,6 \times 10^6$. La suspensión de mitocondrias aisladas sintetiza ATP hasta que la relación es mayor que 10^6 , lo que demuestra que el número de protones translocados por cada ATP que se sintetiza es, por lo menos, de tres.

10. Un defecto de este tipo (llamado síndrome de Luft) se encontró en una mujer de 38 años que era incapaz de realizar un trabajo físico prolongado. El valor de su metabolismo basal era más del doble del normal, pero su función tiroidea resultó ser normal. Una biopsia muscular demostró que sus mitocondrias eran muy variables y de estructura anómala. Los estudios bioquímicos revelaron que en estas mitocondrias la oxidación y la fosforilación no estaban estrechamente acopladas. En esta paciente, gran parte de la energía de las moléculas oxidables se convertía en calor en lugar de ATP.

11. La diciclohexilcarbodiimida reacciona fácilmente con los grupos carboxilo, como se ha comentado con anterioridad en relación con su uso en la síntesis de péptidos (Sección 3.4). Por consiguiente, las diaminas más adecuadas serán las cadenas laterales del aspartato y el glutamato. De hecho, el aspartato 61 de la subunidad c de F_0 de *E. coli* se modifica específicamente con este reactivo. La sustitución de este aspartato por una asparragina mediante mutagénesis específica de punto también elimina la conducción de protones.

12. La triosa fosfato isomerasa convierte a la dihidroxiacetona fosfato (potencialmente situada en una vía muerta) en gliceraldehído 3-fosfato (un intermediario de la vía principal).

13. Este inhibidor (al igual que la antimicina A) bloquea la reducción del citocromo c_1 por QH_2 , el punto de convergencia.

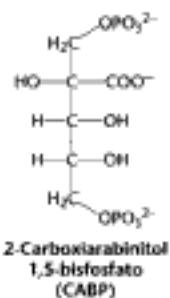
14. Si se desacopla la fosforilación oxidativa no se produciría ATP. En el intento infructuoso de producir ATP se consumiría mucho combustible. El peligro radica en la dosis. Un desacoplamiento excesivo provocaría un daño tisular en los órganos muy aeróbicos, como son el cerebro y el corazón, lo que tendría graves consecuencias para el organismo en su conjunto. La energía que habitualmente se hubiese transformado en ATP se liberaría en forma de calor. Para mantener la temperatura corporal debería aumentar la sudoración aunque el mismo proceso de sudar depende del ATP.

Hidden page

- (f) Cisteina.
 (g) La modificación específica de grupo o mutagénesis específica de sitio.

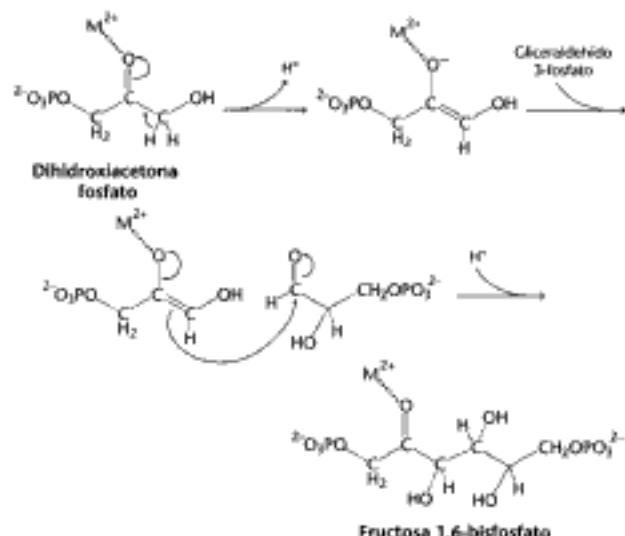
Capítulo 20

- La aldolasa participa en el ciclo de Calvin, mientras que la transaldolasa participa en la vía de las pentosas fosfato.
- La concentración de 3-fosfoglicerato aumentaría, mientras que la de ribulosa 1,5-bisfosfato decrecería.
- La concentración de 3-fosfoglicerato decrecería, mientras que la de ribulosa 1,5-bisfosfato aumentaría.
- (a) 2-Carboxiarabinitol 1,5-bisfosfato (CABP)

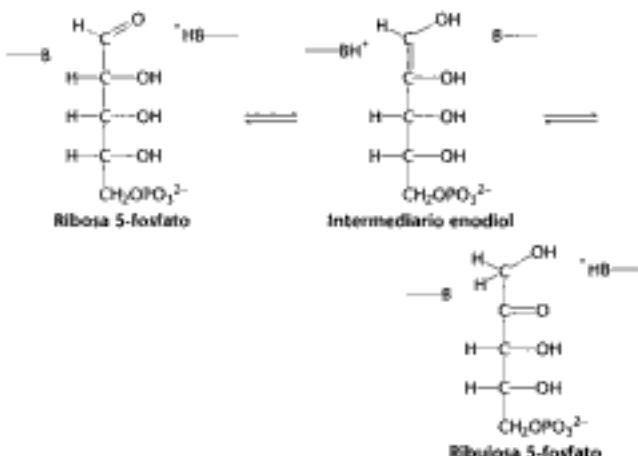


- (b) El CABP es semejante al complejo de adición formado en la reacción del CO₂ con la ribulosa 1,5-bisfosfato.
 (c) Como se había previsto, el CABP es un potente inhibidor de la rubisco.
 5. Aspartato + glioxilato → oxalacetato + glicina
 6. El ATP se convierte en AMP. Para reconvertir ese AMP en ATP, se requieren dos moléculas de ATP: una para formar ADP y otra para pasar el ADP a ATP.
 7. La actividad oxigenasa de la rubisco aumenta con la temperatura. Las hierbas silvestres son plantas C₄, mientras que las hierbas del césped carecen de esta propiedad. En consecuencia, las plantas silvestres prosperan durante los calores estivales porque la vía C₄ les aporta un amplio suministro de CO₂.
 8. Cuando progrese el calentamiento global las plantas C₄ invadirán las latitudes superiores, mientras que las plantas C₃ se retirarán a las regiones más frías.
 9. El marcado aparece en C-5 de la ribulosa 5-fosfato.
 10. Descarboxilación oxidativa de isocitrato a α-cetoglutarato. En ambas reacciones se forma un β-cetoácido intermedio.
 11. Se marcan C-1 y C-3 de la fructosa 6-fosfato, mientras que la eritrosa 4-fosfato no resulta marcada.
 12. (a) 5 glucosa 6-fosfato + ATP → 6 ribosa 5-fosfato + ADP + H⁺
 (b) Glucosa 6-fosfato + 12 NADP⁺ + 7 H₂O → 6 CO₂ + 12 NADPH + 12 H⁺ + P_i
 13. Formar una base de Schiff entre una cetosa sustrato y la transaldolasa, reducirlo con NaBH₄ tritiado y analizar mediante la "huella dactilar" al enzima marcado.
 14. La ΔE_{0'} para la reducción del glutatión por el NADPH es +0,09 V. Por consiguiente, ΔG^{0'} será -17,4 kJ mol⁻¹ (-4,2 kcal mol⁻¹), a lo que corresponde una constante de equilibrio de 1126. La relación requerida [NADPH]/[NADP⁺] es 8,9 × 10⁻⁵.

15.



16.



17. Una alícuota de un homogenizado del tejido se incuba con glucosa marcada con ¹⁴C en C-1 y otra con glucosa marcada con ¹⁴C en C-6. Se compara la radiactividad de las dos muestras. Lo crucial de este experimento es que, por la vía de las pentosas fosfato sólo se descarboxila el C-1, mientras que por la glicolítica, seguida por el complejo piruvato deshidrogenasa y ciclo del ácido cítrico se descarboxilan por igual C-1 y C-6. La razón para la equivalencia de esos dos carbonos en la segunda vía es que el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato se interconvierten rápidamente gracias a la triosa fosfato isomerasa.

18. La reducción de cada CO₂ hasta el nivel de una hexosa requiere 2 moles de NADPH. La reducción del NADP⁺ es un proceso que consume 2 electrones. Por consiguiente, la formación de dos moles de NADPH requiere el bombeo de cuatro fotones por el fotosistema I. Los electrones promocionados por el fotosistema I deben ser repuestos por el fotosistema II, que necesita absorber un número igual de fotones. Por tanto, para generar el NADPH requerido se necesitan 8 fotones. La energía aportada por 8 moles de fotones es de 1594 kJ (381 kcal). Así pues, la eficiencia global de la fotosíntesis es

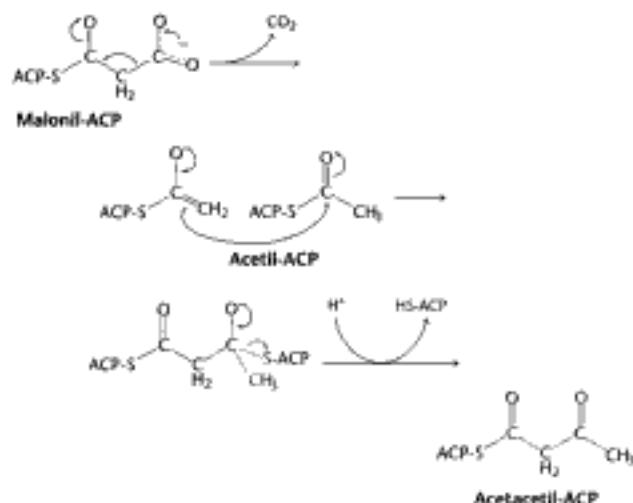
Hidden page

Hidden page

centros activos disponibles o bien la concentración del enzima. Los enzimas alostéricos que alteran los valores de la V_{max} , como respuesta a su regulación se llaman a veces enzimas de la clase V. El tipo más corriente de enzimas alostéricos, en los que se altera K_m , se llaman enzimas de la clase K. El palmitil-CoA produce la despolimerización y por ello la inactivación.

15. El anión tiolato del CoA ataca al grupo 3-ceto para formar un intermediario tetraédrico. Este se rompe formando acil-CoA y el anión enolato del acetil-CoA. La protonación del enolato origina acetil-CoA.

16.



17. (a) Las grasas se queman en la llama de los carbohidratos. Sin carbohidratos no habría reacciones anapleróticas para reponer los componentes del ciclo del ácido cítrico. Con una dieta exclusiva de grasas se acumularía el acetil-CoA procedente de la degradación de los ácidos grasos.

(b) Acetona de los cuerpos cetónicos.

(c) Sí. Los ácidos grasos impares generarian propionil-CoA que se convierte en succinil-CoA, un componente del ciclo del ácido cítrico. Serviría para restaurar el ciclo y mitigar la halitosis.

18. Una grasa marcada puede entrar en el ciclo del ácido cítrico como acetil-CoA y formar oxalacetato marcado, pero únicamente después de perderse dos carbonos como CO₂. En consecuencia, aunque el oxalacetato aparezca marcado no hay una síntesis neta de la cantidad de oxalacetato y por consiguiente no hay aumento de glucosa o glucógeno.

19. (a) La V_{max} disminuye y K_m aumenta. V_{max} (tipo salvaje) = 13 nmol min⁻¹ mg⁻¹; K_m (tipo salvaje) = 8,3 nmol min⁻¹ mg⁻¹; K_m (mutante) = 74 μM.

(b) Ambos valores, V_{max} y K_m disminuyen. V_{max} (tipo salvaje) = 41 nmol min⁻¹ mg⁻¹; K_m (tipo salvaje) = 104 μM; V_{max} (mutante) = 23 nmol min⁻¹ mg⁻¹; K_m (mutante) = 69 μM.

(c) el tipo salvaje es más sensible significativamente al malonil-CoA.

(d) Con respecto a la carnitina, el mutante desarrolla aproximadamente un 65% de la actividad del tipo salvaje; respecto al palmitil-CoA, un 50%. Por otra parte, una disolución de malonil-CoA 10 μM inhibe aproximadamente el 80% del tipo salvaje pero no tiene un efecto apreciable sobre el enzima mutante.

(e) El glutamato parece jugar un papel más notorio en la regulación por malonil-CoA que en la catálisis.

Capítulo 23

1. (a) La actividad ATPasa del proteasoma 26S reside en la subunidad 19S. La energía de la hidrólisis del ATP puede utilizarse en desplegar el sustrato, que es demasiado grande para entrar en el barril catalítico. También puede necesitarse ATP para introducir el sustrato en el barril.

(b) Corrobora la respuesta de la parte a. Como son pequeños los péptidos no necesitan ser desplegados. Además, los péptidos pequeños pueden entrar del todo a la vez y no necesitan traslocación.

2. (a) Piruvato, (b) oxalacetato, (c) α-cetoglutarato, (d) α-cetoisocapruato, (e) fenilpiruvato y (f) hidroxifenilpiruvato.

3. (a) Aspartato + α-cetoglutarato + GTP + ATP + 2 H₂O + NADH + H⁺ → 1/2glucosa + glutamato + CO₂ + ADP + GDP + NAD⁺ + 2 P_i

Los coenzimas requeridos son piridoxal fosfato en la reacción de transaminación y NAD⁺/NADH en las reacciones redox.

(b) Aspartato + CO₂ + NH₄⁺ + 3 ATP + NAD⁺ + 4 H₂O → oxalacetato + urea + 2 ADP + 4 P_i + AMP + NADH + H⁺

4. En el proteasoma eucariótico, las distintas subunidades β tienen diferentes especificidades de sustrato, permitiendo que las proteínas se degraden con mayor efectividad.

5. Las seis subunidades probablemente existen como un heterohexámero. Con experimentos cruzados se podría probar el modelo y ayudar a determinar qué subunidad es adyacente a otra.

6. Pirofosfato de tiamina.

7. Actúa como un sumidero de electrones.

8. CO₂ + NH₄⁺ + 3 ATP + NAD⁺ + aspartato + 3 H₂O → urea + 2 ADP + 2 P_i + AMP + PP_i + NADH + H⁺ + oxalacetato

Se consumen cuatro grupos de alta transferencia de energía.

9. Ornitina transcarbamila (análogo a PALA; ver Capítulo 10).

10. El amonio puede conducir a la aminación del α-cetoglutarato, produciéndose una concentración elevada de glutamato en una reacción no regulada. Del ciclo del ácido cítrico desaparecería este α-cetoglutarato, para la síntesis de glutamato, disminuyendo, por tanto, la capacidad de respiración celular.

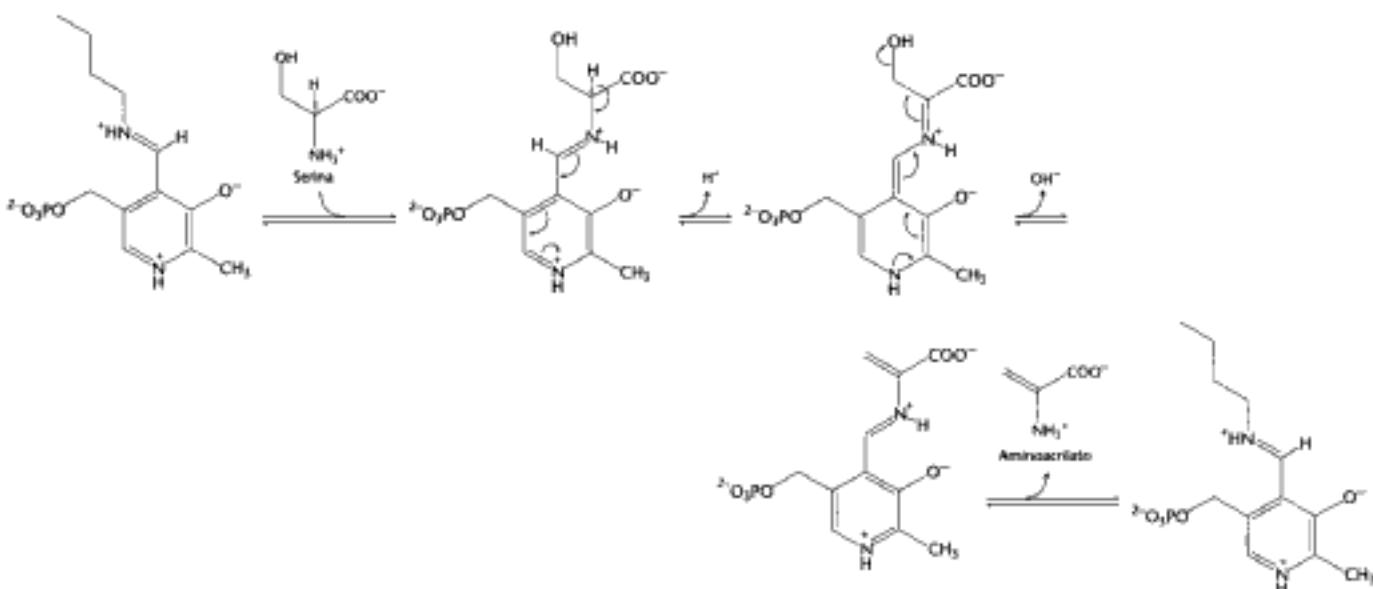
11. El análisis por espectrometría de masas sugiere poderosamente que son deficientes tres enzimas: la piruvato deshidrogenasa, la α-cetoglutarato deshidrogenasa y la α-cetodeshidrogenasa de cadenas ramificadas. Lo más lógico es que falte o sea defectuoso el componente E3 común a estos tres enzimas. Esta hipótesis podría comprobarse purificando estos enzimas y analizando su capacidad para regenerar la lipoamida.

12. Debería darse una dieta restringida en proteinas y suplementada con benzoato, fenilacetato y arginina. El nitrógeno se eliminaría en forma de hipurato, fenilacetilglutamina y citralina.

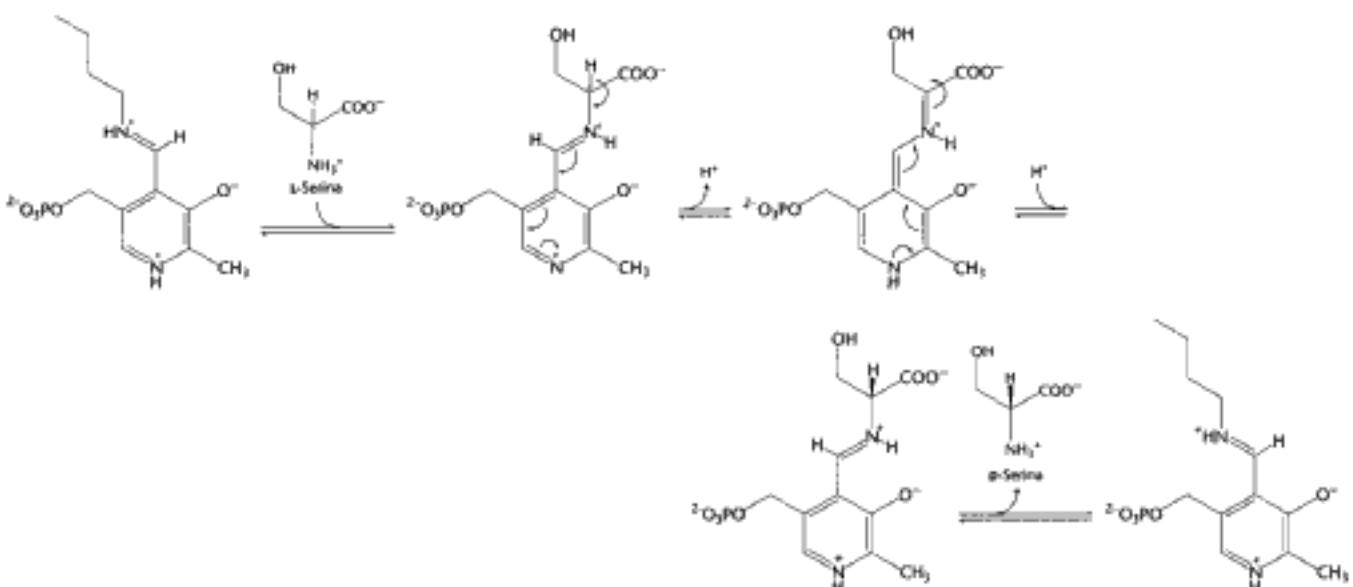
13. El aspartame, un éster dipeptídico (metiléster de aspartilfenilalanina) se hidroliza a L-aspartato y L-fenilalanina. Los niveles elevados de fenilalanina son perjudiciales para los fenilcetonúricos.

14. El N-acetilglutamato se sintetiza a partir de acetil-CoA y glutamato. Una vez más el acetil-CoA sirve como donador de acetilos activados. Esta reacción está catalizada por la N-acetilglutamato sintasa.

15. Véase la ecuación de abajo.



16.



La constante de equilibrio para la interconversión de L-serina y D-serina es exactamente la unidad.

17. La exposición de ese dominio sugeriría que un componente de un complejo multiproteico no ha conseguido su forma adecuada o que ese componente ha sido sintetizado en exceso. Esto conduciría a la degradación rápida y a la recuperación de la estequiometría apropiada.

18. (a) El vaciamiento de los depósitos de glucógeno. Cuando desaparece se deben degradar las proteínas para satisfacer las necesidades de glucosa del cerebro. Los aminoácidos así obtenidos se desaminan y el nitrógeno se elimina como urea.

(b) El cerebro se ha adaptado a la utilización de los cuerpos cetónicos, derivados del catabolismo de los ácidos grasos. En otras palabras, el cerebro funciona gracias a la degradación de los ácidos grasos.

(c) Cuando se han agotado los almacenes de glucógeno y grasas la única fuente disponible de energía son las proteínas.

19. Desaminación a α -ceto- β -methylvalerianato; descarboxilación oxidativa a α -metilbutiril-CoA; oxidación a tiglil-CoA (2-metil-2-butenoil-CoA); hidratación; oxidación y tiolisis que liberan acetil-CoA y propionil-CoA; el propionil-CoA se convierte en succinil-CoA.

20. (a) Prácticamente, en ausencia de nucleótidos, no hay digestión.

(b) La digestión de las proteínas es fuertemente estimulada por el ATP.

(c) AMP-PNP, un análogo no hidrolizable del ATP, no es más eficaz que el ADP.

(d) El proteasoma no requiere ni ATP ni PAN para digerir los sustratos pequeños.

- (e) El PAN y el ATP pueden ser necesarios para desplegar los péptidos y translocarlos hasta dentro del proteasoma.
 (f) Aunque PAN de *Thermoplasma* no resulta eficaz con otros proteasomas, estimula la digestión en unas tres o cuatro veces.
 (g) A la luz del hecho de que las arqueas y los eucariotas se separaron hace varios miles de millones de años, el que PAN de *Thermoplasma* pueda estimular al endósculo de conejo sugiere que hay homología, no sólo entre proteasomas, sino también entre PAN y la subunidad 19S (más bien las ATPases) del proteasoma 26S de mamífero.

Capítulo 24

- Glucosa + 2 ADP + 2 P_i + 2 NAD⁺ → 2 glutamato → 2 alanina + 2 α-cetoglutarato + 2 ATP + 2 NADPH + 2 H₂O + 2 H⁺
- N₂ → NH₄⁺ → glutamato → serina → glicina → δ-aminolevulinato → porfobilinógeno → hemo
- (a) N^{5,N¹⁰}-Metilentetrahidrofolato; (b) N⁵-metiltetrahidrofolato.
- El γ-glutamilfosfato es un intermediario adecuado de la reacción.
- La administración de glicina conduce a la formación de isovalerilglicina. Este conjugado hidrosoluble, a diferencia del ácido isovalérico, es excretado muy rápidamente por los riñones.
- Realizan la fijación de nitrógeno. La ausencia del fotosistema II proporciona un entorno en el que no se produce oxígeno. Recordemos que la nitrogenasa se inactiva muy rápidamente por el O₂.
- El citoplasma es un entorno reductor, mientras que el medio extracelular es oxidante.
- (a) Ninguno; (b) α-glutamato y oxalacetato.
- El succinil-CoA se forma en la matriz mitocondrial.
- La alanina del piruvato; el aspartato del oxalacetato; el glutamato del α-cetoglutarato.
- Y podría inhibir la etapa C → D; Z la etapa C → F y C podría inhibir A → B. Este esquema es un ejemplo de retroinhibición secuencial. Alternativamente, Y podría inhibir la etapa C → D; Z inhibir C → F y la etapa A → B sólo sería inhibida por la presencia simultánea de Y y Z. Este esquema se llama retroinhibición concertada.
- La velocidad de la etapa A → B en presencia de niveles elevados de Y y A sería 24 s⁻¹ (0.6 × 0.4 × 100 s⁻¹).
- Se forma una aldimina externa con SAM, la cual se desprotona para formar un intermediario quinoidico. El carbono desprotonado ataca al carbono adyacente al átomo de azufre para formar el anillo de ciclopropano y liberar metiltioadenosina, el otro producto.
- Se forma una aldimina externa con la L-serina, que se desprotona para formar un intermediario quinoidico. Este intermediario se reprotoña por la cara opuesta formando una aldimina con D-serina. La constante de equilibrio de esta reacción de racemización debe ser uno, porque el reactante y el producto son exactamente imágenes especulares uno del otro.
- Su síntesis a partir de oxalacetato y α-cetoglutarato vaciaría de integrantes al ciclo del ácido cítrico, por lo que decrecería la producción de ATP. Se necesitarían reacciones anapleróticas para reponer los intermediarios del ciclo.

16. El SAM es el dador de metilos para metilar el DNA y así proteger al hospedador de la digestión por sus propios enzimas de restricción. Una carencia de SAM haría al DNA bacteriano susceptible de ser digerido por esos enzimas de restricción.

17. (a) La asparragina es mucho más abundante en la oscuridad. En la luz se produce más glutamina. Estos aminoácidos son los que presentan las variaciones más espectaculares. La glicina también es más abundante con la luz.

(b) La glutamina es un aminoácido metabólicamente reactivo, utilizado en la síntesis de otros muchos compuestos. En consecuencia, cuando se dispone de energía con la luz, se sintetizará preferentemente glutamina. La asparragina, que transporta mayor cantidad de nitrógeno por átomo de carbono es por ello más eficiente para almacenar nitrógeno cuando escasea la energía, y se sintetiza en la oscuridad. La glicina abunda más con la luz debido a la fotorrespiración.

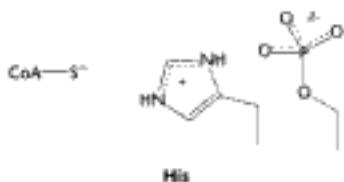
(c) El espárrago blanco posee una concentración especialmente elevada de asparragina, que le proporciona su intenso sabor. Todos los espárragos tienen gran cantidad de asparragina. De hecho, tal como lo sugiere su nombre, la asparragina fue en primer lugar aislada de los espárragos.

Capítulo 25

- Glucosa + 2 ATP + 2 NADP⁺ + H₂O → PRPP + CO₂ + ADP + AMP + 2 NADPH + 3 H⁺
- Glutamina + aspartato + CO₂ + 2 ATP + NAD⁺ → orotato + 2 ADP + 2 P_i + glutamato + NADH + H⁺
- (a, c y d) PRPP; (b) carbamilfosfato.
- PRPP y formilglutamamida ribonucleótido.
- dUMP + serina + NADPH + H⁺ → dTMP + NADP⁺ + glicina.
- Hay un déficit de N¹⁰-formiltetrahidrofolato. La sulfanilamida inhibe la síntesis de folato al actuar como un análogo del p-aminobenzoato, uno de los precursores del folato.
- El PRPP es el intermediario activado de la síntesis de fosforribosilamina en la vía de novo de formación de purinas, nucleótidos púricos a partir de bases libres por la vía de ahorro, orotidilato en la formación de pirimidinas, ribonucleótido de nicotinamida, fosforribosil-ATP en la vía que conduce hasta la histidina y fosforribosil-antranilato en la vía de síntesis de triptófano.
- (a) La célula A no puede crecer en un medio HAT porque no puede sintetizar TMP ni a partir de timidina ni de dUMP. La célula B no puede crecer en este medio porque no puede sintetizar purinas ni por la vía de novo ni por la de ahorro. La célula C sí puede crecer en un medio HAT porque contiene timidina quinasa activa procedente de B (que le permite fosforilar la timidina a TMP) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa procedente de A (que le permite sintetizar purinas a partir de hipoxantina por la vía de ahorro).
- (b) Transformar la célula A con un plásmido que contenga genes ajenos de interés y un gen funcional de timidina quinasa. Las únicas células que crecerán en un medio HAT son las que han adquirido el gen de la timidina quinasa; casi todas las células transformadas también contienen los demás genes del plásmido.
- Los carbonos 4, 5 y 6 del anillo de la citosina resultarán marcados. En la guanina, sólo los átomos de carbono compartidos por los anillos de 5 y 6 miembros aparecerán marcados con ¹³C.

Hidden page

13. El residuo de fosfoserina cargado negativamente interacciona con el residuo de histidina protonado, cargado positivamente, y disminuye la capacidad de transferir un protón al tiolato.



14. Primero se hidroxila el grupo metilo. La hidroximetilamina elimina formaldehido y origina metilamina.

15. (a) No hay efecto. (b) Como la actina no es controlada por el colesterol, la cantidad aislada debe ser la misma en ambos grupos experimentales. Una diferencia delataría un problema en el aislamiento del RNA. (c) La presencia de colesterol en la dieta reduce drásticamente la cantidad de proteína HMG-CoA reductasa. (d) Una manera habitual de regular la cantidad de proteína presente es regular la transcripción, lo que claramente no ocurrió en este caso. (e) Pudo ser inhibida la traducción del mRNA y pudo degradarse rápidamente la proteína.

Capítulo 27

- El hígado y, en menor proporción, los riñones contienen glucosa 6-fosfatasa, mientras que el músculo y el cerebro, no. Por consiguiente, el músculo y el cerebro, a diferencia del hígado, no liberan glucosa. Otra diferencia enzimática clave es que el hígado tiene muy poca transferasa para activar el acetacetato a acetacetyl-CoA. En consecuencia, el hígado exporta acetacetato y 3-hidroxibutirato para su utilización por el músculo cardíaco, el músculo esquelético y el cerebro.
- (a) Las células adiposas normalmente convierten la glucosa en glicerol 3-fosfato para la formación de triacilgliceroles. Una deficiencia de hexoquinasa interferirá con la síntesis de los triacilgliceroles.
(b) Una deficiencia de glucosa 6-fosfatasa bloquearía la exportación de la glucosa hepática producida en la glucogenolisis. Esta anomalía (llamada enfermedad de von Gierke) se caracteriza por un contenido de glucógeno hepático anormalmente elevado y por un bajo nivel de glucosa en sangre.
(c) Una deficiencia de carnitina aciltransferasa I desequilibra la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. En estos individuos el ayuno y el ejercicio desencadenan calambres musculares.
(d) La glucoquinasa permite al hígado fosforilar la glucosa aun en presencia de niveles altos de glucosa 6-fosfatasa. Una deficiencia de glucoquinasa interferirá con la síntesis del glucógeno.
(e) La tiolasa cataliza la formación de dos moléculas de acetil-CoA a partir de acetaceil-CoA y CoA. Una deficiencia de tiolasa interferirá con la utilización del acetacetato como combustible cuando el nivel de glucosa en sangre es bajo.
(f) La fosfofructoquinasa sería menos activa de lo normal debido al menor nivel de F-2,6-BP. Por consiguiente, la glicolisis sería mucho más lenta de lo normal.
- (a) Una elevada proporción de ácidos grasos de la sangre está unida a la albúmina. El líquido cefalorraquídeo tiene un bajo contenido en ácidos grasos porque tiene poca albúmina.
(b) La glucosa es muy hidrofílica y soluble en medios acuosos, a diferencia de los ácidos grasos que han de ser transportados por proteínas tales como la albúmina. Las micelas de ácidos grasos romperían la estructura de la membrana.

- (c) Los ácidos grasos, y no la glucosa, son el principal combustible del músculo en reposo.

4. (a) Un vatio (W) es igual a un julio (J) por segundo (0,239 calorías por segundo). Por consiguiente 70 vatios equivalen a $0,07 \text{ kJ s}^{-1}$ o $0,017 \text{ kcal s}^{-1}$.

- (b) Un vatio es una corriente de un amperio (A) a través de un potencial un voltio (V). Para simplificar, aceptamos que todo el flujo de electrones va del NADH al O_2 (una caída de potencial de 1,14 V). Por consiguiente, la corriente es de 61,4 amperios, que corresponde a $3,86 \times 10^{20}$ electrones por segundo (1 amperio = 1 coulombio s^{-1} = $6,28 \times 10^{18}$ cargas s^{-1}).

- (c) Por cada NADH oxidado (2 electrones) se forman tres ATPs. Por consiguiente, se forma un ATP por cada 0,67 electrones transferidos. Un flujo de $3,86 \times 10^{20}$ electrones por segundo producirá $5,8 \times 10^{20}$ moléculas de ATP s^{-1} , o bien, 0,96 milímoles s^{-1} .

- (d) El peso molecular del ATP es 507. El contenido total de ATP en el cuerpo es de 50 gramos, que equivalen a 0,099 moles. Así pues, cuando el cuerpo está en reposo el ATP se renueva una vez cada 125 segundos.

5. (a) La estequiometría de la oxidación completa de la glucosa es



y la del tripalmitilglicerol es



Por consiguiente los cocientes respiratorios respectivos (CR) son 1,0 y 0,703.

- (b) El valor del CR revela la utilización relativa de carbohidratos y de grasas como combustibles. El CR típico de un corredor de maratón disminuye durante la carrera desde 0,97 hasta 0,77. El descenso del CR revela el cambio de combustible de carbohidratos a grasas.

6. Un gramo de glucosa (peso molecular = 180,2) equivale a 5,55 milímoles y un gramo de tripalmitilglicerol (peso molecular = 807,3) a 1,24 milímoles. Las estequiometrías de las reacciones (véase el problema 5) indican que se producen 6 moles de agua por mol de glucosa oxidada y 49 moles de agua por mol de triacilglicerol oxidado. Por consiguiente, el agua liberada por cada gramo de combustible oxidado es 33,3 milímoles (0,6 g) en el caso de la glucosa y 60,8 milímoles (1,09 g) en el caso del tripalmitilglicerol. Así pues, la oxidación completa de esta grasa produce 1,82 veces más agua que en el caso de la glucosa. Otra ventaja de los triacilgliceroles es que se pueden almacenar en forma prácticamente anhidra, mientras que la glucosa se almacena como glucógeno, un polímero muy hidratado. Una joroba compuesta principalmente de glucógeno sería una carga intolerable, mucho más que si fuese de paja, y rompería la espalda del camello.

7. Una nuez de macadamia típica tiene una masa de unos 2 g. Debido a que consta principalmente de grasas $\sim 37 \text{ kJ g}^{-1}$ ($\sim 9 \text{ kcal g}^{-1}$), una nuez tiene el valor de 75 kJ (18 kcal). La ingestión de 10 nueces supone la incorporación de unas 753 kJ (180 kcal). Tal como se ha comentado en el problema 4, el consumo de 1 W de potencia corresponde a 1 J s^{-1} ($0,239 \text{ cal s}^{-1}$), y así para gastar 400 W corriendo se requieren $0,4 \text{ kJ s}^{-1}$ ($0,0956 \text{ kcal s}^{-1}$). Por consiguiente, se tendrían que correr 1882 s, alrededor de 31 min, para consumir las calorías aportadas por 10 nueces.

8. Un elevado nivel de glucosa en sangre desencadenaría la secreción de insulina, la cual estimularía la síntesis de glucógeno y triacilgliceroles. Un nivel elevado de insulina impediría la movilización de las reservas de combustible durante el maratón.

*image
not
available*

Hidden page

- Fuerza protón-motriz (continuación)
 en la fosforilación oxidativa, [503, 521-522](#)
[521f, 522f](#)
 en la fotosíntesis, [542, 554](#)
- Fumarasa, [488](#)
- Fumarato, [488](#), [663](#), [663f](#)
 a partir de fesialalanina, [672](#), [672f](#)
 en el ciclo de la urea, [663](#)
 en el ciclo del ácido cítrico, [488](#)
 en la síntesis de purina, [716](#), [716f](#)
- 4-Fumarilacetacetato, [672](#), [672](#)
- Función renal. Véase Ránión
- Funciones efectoras, [949](#)
- Furana, [306-308](#), [307f](#)
 formas de sobre, [308](#), [308f](#)
- Fusión, de la doble hélice, [114-115](#), [115f](#), [797](#), [797f](#)
- G**
- G_{DP} , [923](#), [924](#)
- G6PD. Véase Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)
- Galactitol, [452](#)
- Galactolípidos, en membrana tilacoidal, [543](#)
- Galactoquinasa, [449](#), [450](#)
- Galactosa
 en grupos sanguíneos, [315](#)
 en la glicólisis, [449-450](#), [449f](#)
 estructura, [395](#)
 trastornos de la, [451](#)
- Galactosa 1-fosfato uridiltransferasa, [450](#)
- Galactosa 1-fosfato, [449](#), [449-450](#), [450f](#)
- Galactosa 6-fosfato, [449-450](#)
- Galactosemia, [451](#)
- β -Galactosidasa, [311](#), [896](#), [898](#)
 en el metabolismo de lactosa, [896-897](#)
- Galactosídido permeasa, [397](#)
- Gangliósidos, [331](#)
 estructura, [738](#), [738f](#)
 síntesis, [738](#)
 trastornos, [738-739](#)
- GAP. Véase Gliceraldehído 3-fosfato
- GAPs (proteínas activadoras de GTPasa), [309](#)
- Garrod, Archibald, [673](#)
- Gases nerviosos, [229](#)
- GDP (guanosina difosfato)
 en el ciclo del ácido cítrico, [486](#)
 en el olfato, [923](#), [924](#)
 en la traducción, [876-877](#), [880](#)
 en la transducción de señales, [384-385](#), [398](#), [398f](#)
 en la tubulina, [990](#)
 en la visión, [934](#), [934f](#)
 hidrólisis, [413](#)
- GEF (factor de intercambio nucleótido-guanina), [307](#)
- Gellert, Martin, [290](#)
- Gen agitador, [364](#)
- Gen de β -globina. Véase también Hemoglobina
 transcripción y procesado, [127-128](#), [128f](#)
- Gen de hemoglobina, intrones, [122](#), [127f](#), [128f](#)
- Gen lacZ, [144](#)
- Gen(es)
 análisis comparativo, [151](#), [151f](#)
 codificación de proteínas, [19](#)
 continuos, [122](#), [128](#)
- definición, [19](#)
 discontinuos, [127-129](#), [128f](#), [129f](#)
 diseño, [148](#), [148f](#)
 identificación en la secuenciación genómica, [17-18](#)
 número en el genoma, [150](#)
 sintéticos, [148](#), [148f](#)
 supresores de tumores, [400](#)
 transferencia horizontal, [266](#), [266f](#)
- Genes C, [956](#)
 en comunicación de anticuerpos, [960-961](#)
- Genes conectores (J), [956-957](#)
 en cambio de tipo, [960-961](#)
- Genes constantes (C), [956](#)
 en cambio de tipo, [960-961](#)
- Genes continuos, [127](#), [128](#)
- Genes D, [956-957](#)
 en cambio de anticuerpo, [960-961](#)
- Genes de diseño, [148](#), [148f](#)
- Genes de diversidad (D), [957-958](#)
 en cambio de tipo, [960-961](#)
- Genes de fractura, [127-129](#), [128f](#), [129f](#)
 ventajas evolutivas, [129](#)
- Genes de globina, [197-198](#)
- Genes desactivados o nequados (knockout), [145-156](#)
- Genes discontinuos, [127-129](#), [128f](#), [129f](#)
 ventajas evolutivas, [129](#)
- Genes J, [956-957](#)
 en cambios de anticuerpo, [960-961](#)
- Genes supresores de tumores, [400](#), [810](#)
- Genes V, [956-958](#)
 en el cambio de anticuerpo, [960-961](#)
- Genes variables (V), [956-958](#)
 en el cambio de tipo, [960-961](#)
- Genoma, [149-157](#), [150f](#)
 análisis, [150-152](#)
 comparativa, [151](#), [151f](#)
 de *Caenorhabditis elegans*, [149](#)
 de cloroplasto, [544](#)
 de *Escherichia coli*, [110](#), [110f](#), [901](#)
 de *Haemophilus influenzae*, [149](#), [149f](#), [171](#)
 de muntjak indio, [111](#), [111f](#)
 de *Reclinomonas americana*, [505](#)
 de *Rickettsia prowazekii*, [505](#)
 de *Saccharomyces cerevisiae*, [149](#), [901](#)
 definición, [66](#)
 del pez soplador, [151](#), [151f](#)
 DNA no codificador, [150](#)
 mitocondrial, [504-505](#), [504f](#), [505f](#)
 número de genes, [150](#)
 proteoma, [66](#)
 secuenciación, [17-18](#), [149-150](#), [149f](#), [150f](#)
 tamaño, [110-111](#)
- Genética
 comparativa, [151](#), [151f](#)
 en desarrollo de fármacos, [1017-1020](#)
- Genómica comparativa, [151](#), [151f](#)
- Genotecas
 cDNA, [146-147](#), [146f](#)
 genómico, [146-147](#), [146f](#)
 rastreo, en el desarrollo de fármacos, [1011](#), [1014](#), [1014f](#)
- Genotecas, [146-147](#), [146f](#)
- Geranilpirofosfato, [741](#), [741](#)
- Geraniltransferasa, [741](#), [741](#)
- Geraniol, [923](#), [923](#)
- Gerhart, John, [277](#), [278](#)
- Gibbs, Josiah Willard, [12](#)
- Gigantismo, [155](#)
- Gigasellado, [363](#)
- Giros, en el DNA, [788f](#), [789](#)
- Giros β , [44](#), [44f](#)
 en los residuos de los aminoácidos, [52](#), [53](#)
- Giros inversos, [44](#), [44f](#)
 residuos aminoácidos, [52f](#), [53](#)
- Gleticos (STI-571), [401](#)
- Gliceraldehído, [304](#), [304](#), [305f](#)
 en glicólisis, [441-442](#), [442f](#), [449](#)
- Gliceraldehído 3-fosfato (GAP), [210](#), [310](#), [310f](#), [379](#)
 en el ciclo de Calvin, [570](#), [571](#)
 en glicólisis, [210](#), [436f](#), [438-439](#), [438f](#), [440](#), [440f](#), [442](#)
 en la ruta de las pentosas fosfato, [578f](#), [579](#), [579f](#), [580](#), [580f](#)
 en la síntesis de sacarosa, [573](#), [573](#)
- en lipólisis, [622](#)
- Isomerización a dihidroxiacetona fosfato, [210](#), [438-439](#), [438f](#), [440f](#)
 oxidación, energía, [418](#)
- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, [441](#)
 centros de unión NAD⁺, [448-449](#), [449f](#)
 en el ciclo de Calvin, [570](#)
 en la glicólisis, [441-442](#), [441f](#), [443f](#), [444](#)
- Glicerol 3-fosfato, en síntesis de lípidos de membrana, [733](#)
- Glicerol fosfato aciltransferasa, [733](#)
- Glicerol fosfato deshidrogenasa, [528](#)
 en la fosforilación oxidativa, [512](#)
- Glicerol, [622](#)
 en fosfolípidos, [330](#)
 en la gluconeogénesis, [460](#)
 metabolismo, [419f](#), [621-622](#), [622](#)
- Glicina
 a partir de porfirinas, [202-204](#), [203f](#)
 con marcaje bemo, [202](#), [202f](#)
 en colígeno, [43-46](#), [46f](#)
 en el ciclo de Calvin, [570](#)
 estructura, [28](#), [28f](#)
 formación de serina, [668](#)
 síntesis, [689](#), [690](#)
- Glicina sintasa, [690](#)
- Glicinamida ribonucleótido, [715](#), [716](#)
- Glicolaldehído, en la ruta de las pentosas fosfato, [581](#), [581f](#)
- Glicocolato, [620](#), [620](#)
 síntesis, [749](#), [749f](#)
- Glicoformas, [320](#)
- Glicogenasa, [606](#)
- Glicolatasas, en la reparación del DNA, [808](#), [809](#)
- Glicolato, en el ciclo de Calvin, [568](#), [569](#)
- Glicolato oxidasa, [570](#)
- Glicolípidos, [331](#), [331](#)
- Glicolisis, [426](#), [433-438](#)
 1,3-bisfosfoglicerato, [443-444](#)
 captación de glucosa, [435-437](#), [436f](#)
 centro de control, [762](#)
 centros, [767-770](#)
 ciclo del ácido cítrico, [477-481](#), [477f](#)
 definición, [433](#)

- Glicólisis (continuación)
- dihidroxiacetona fosfato, [220](#), [436f](#), [438-439](#), [438f](#), [440f](#), [449](#)
 - durante el ejercicio, [458](#), [775-777](#)
 - en ayunas, [772](#), [772f](#)
 - en el cerebro, [762](#)
 - en el cáncer, [457-458](#)
 - en el hígado, [455-456](#), [465-467](#)
 - en el músculo, [452-454](#), [454f](#), [767-768](#)
 - en la diabetes mellitus, [774](#)
 - en la homeostasis de glucosa, [770-773](#)
 - en los ciclos ayuno/alimentación, [770-773](#)
 - enolasa, [445](#)
 - estados, [436f](#)
 - estimulación mediante postalimentación, [435](#)
 - evolución, [469-470](#)
 - factor de transcripción inducible por hipoxia, [458](#), [458f](#), [458t](#)
 - fermentación, [446-448](#)
 - formación de ATP, [443-446](#)
 - rendimiento, [531](#), [531t](#) - formación de piruvato, [444-446](#), [444f-446f](#)
 - fosfoenolpiruvato, [444f](#), [445-446](#)
 - fosfofructoquinasa, [763](#), [763f](#)
 - en el hígado, [455](#), [455f](#), [465](#), [466](#)
 - en el músculo, [452-453](#), [453f](#) - fosfoglicerato mutasa, [444](#), [444f](#)
 - fosfoglicerato quinasa, [443-444](#)
 - fructosa 1,6-bisfosfato, [436f](#), [437-438](#), [438f](#), [440](#)
 - fructosa 6-fosfato, [436f](#), [438](#), [438f](#), [439](#)
 - fructosa, [449](#), [449f](#)
 - funciones, [762](#)
 - galactosa, [449-450](#), [449f](#)
 - gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, [441](#), [441-442](#), [441f](#), [443f](#)
 - gliceraldehido 3-fosfato, [210](#), [436f](#), [438-439](#), [438f](#), [440](#), [440f](#), [441-442](#), [441f](#)
 - gluconeogénesis, [460-461](#), [464-470](#), [764](#)
 - glucosa 6-fosfato, [436f](#), [437-438](#), [437f](#), [439](#), [770-771](#)
 - hepática, [778](#)
 - hexoquimasa, [435-437](#), [436f](#)
 - en el hígado, [456](#)
 - en el músculo, [453-454](#) - intermediario tioéster, [442](#), [442f](#)
 - inversa, estequiométrica, [644](#)
 - isomerización de azúcares fosforilados de tres carbonos, [436f](#), [438-440](#), [438f](#)
 - NADH, [446-448](#)
 - oxidación de aldehído, [441-442](#), [442f](#)
 - paso limitante, [454](#)
 - perspectivas históricas, [434](#)
 - piruvato quinasa, [446](#), [263](#)
 - en el hígado, [456](#), [456f](#)
 - en el músculo, [454](#) - reacciones, [427](#), [436f](#), [444f-445f](#)
 - regulación, [452-458](#), [464-469](#), [763](#), [763f](#)
 - transaldolasa, [579-581](#), [582f](#)
 - transferencia del grupo fosforilo, [426](#), [426f](#)
 - transportadores de glucosa, [456-457](#), [457f](#)
 - transnscetolasa, [579-581](#), [581f](#)
 - trioxa fosfato isomerasa, [436f](#), [438-440](#), [439f](#)
 - vía de las pentosas fosfato, [579-585](#)
 - visión global, [762](#)
- Glicopéptido transpeptidasa, inhibición por penicilina, [233-234](#), [234f](#)
- Glicoproteína P, [358](#)
- Glicoproteínas, [58](#), [316-320](#)
- secuenciación, [319-320](#)
- Glicosaminoglicanos, [312-313](#), [313](#)
- Glicósidos, [309](#)
- Glicosilación, [316-320](#)
- centros, [316](#), [317-318](#), [320](#)
 - proteasas, [320](#)
 - trastornos congénitos, [318-319](#)
- Glicosilfosfatidilinositol, [340](#), [340](#)
- Glicosiltransferasas, [314](#), [314-315](#)
- en grupos sanguíneos, [315](#)
- Glifosato, [694](#)
- Glicolato, en el ciclo de Calvin, [560-570](#)
- Glicoisosas, [306](#)
- Globina(s). Véase también Hemoglobina; Mioglobina
- estructura, [50](#), [50f](#), [173-174](#), [174](#)
 - evolución, [177](#), [177f](#)
 - tipos, [197-198](#)
- Gliomérulo. Véase también Rribón
- metabolismo de fármacos, [1007](#)
- Glucagón, [466](#), [467](#)
- en el metabolismo del glucógeno, [601-603](#), [770](#), [771](#)
 - en el metabolismo de ácidos grasos, [621](#), [641-642](#), [771](#)
 - en homeostasis de glucosa, [770](#), [771](#)
- Glucocorticoides. Véase también Hormonas esteroides
- síntesis, [749](#), [749f](#), [752](#)
- Glucogéno, [311-312](#), [311f](#), [592](#)
- almacenamiento de glucosa, [311-312](#), [311f](#), [592](#), [602](#)
 - centros de almacenamiento, [767t](#)
 - como homopolímero, [311](#)
 - estructura, [311-312](#), [311f](#), [592](#), [592f](#), [606f](#)
 - ramificación, [592](#), [592f](#), [606](#)
- Glucógeno fosforilasa, [594-601](#), [595f](#), [610-611](#), [611f](#)
- a*, [599](#), [599-600](#), [599f](#)
 - b*, [599](#), [599](#), [599f](#)
 - centro de unión al glucógeno, [596-598](#), [597f](#)
 - dominio amino terminal, [596-598](#), [597f](#)
 - dominio carboxilo terminal, [596-598](#), [597f](#)
 - estados T y R, [598-600](#)
 - estructura, [596-597](#), [597f](#)
 - evolución, [604](#)
 - mecanismo catalítico, [596-598](#)
 - regulación, [598-601](#)
- Glucógeno sintasa, [605-607](#), [610](#), [611f](#)
- Glucógeno sintasa quinasa, [607](#), [608](#), [608f](#), [610](#), [610f](#)
- Glucógeno transferasa, [594-595](#), [595f](#)
- Gluconeogénesis, [458-471](#), [764](#)
- carboxilbótona, [462](#)
 - centros, [460](#), [767-770](#)
 - ciclo de la urea, [663](#)
 - definición, [458](#)
 - en ayunas, [772](#)
 - en ciclo ayuno/alimentación, [770-773](#)
 - en diabetes mellitus, [774](#)
 - en hígado, [460](#), [769](#)
 - en la homeostasis de glucosa, [770-773](#)
 - en riñón, [460](#), [769](#)
 - equivocometría, [464](#)
- evolución, [469-470](#)
 - fosfoenolpiruvato, [459f](#), [460](#), [461](#), [462-463](#)
 - fosforilación, [464](#)
 - fructosa 1,6-bisfosfato, [459f](#), [461](#), [463](#)
 - fructosa 6-fosfato, [459f](#), [463](#), [464f](#)
 - glucosa 6-fosfato, [459f](#), [463](#), [464f](#)
 - glucosa 6-fosfato, [459f](#), [463](#), [464f](#)
 - hepática, [460](#)
 - ortodifosfataza, [463](#)
 - oxalacetoato, [459f](#), [460](#), [461-463](#)
 - perspectiva histórica sobre, [434](#)
 - reacciones, [458-460](#), [459f](#), [460-464](#)
 - acopladas, [464](#)
 - regulación, [464-469](#), [764](#)
 - renal, [460](#)

Glucopiranosa, [307](#), [307f](#)

 - forma de bote, [308](#), [308f](#)
 - forma de silla, [308](#), [308f](#)

Glucokinasa, [770](#)

Glucosa

 - centros de almacenamiento, [767t](#)
 - como combustible celular, [435](#)
 - en el ciclo de Cori, [468](#), [468f](#)
 - en glucógeno, [311-312](#), [311f](#), [592](#), [602](#)
 - estructura, [305](#), [305f](#)
 - forma cíclica, [307](#), [307f](#)
 - forma de cadena abierta, [307](#), [307f](#)
 - formas de almacenamiento, [311-312](#), [311f](#), [592](#), [602](#)
 - liberación regulada, [593](#). Véase también Metabolismo del glucógeno
 - metabolismo, [419f](#). Véase también Gluconeogénesis; Glicolisis
 - ciclo ayuno/alimentación, [770-772](#)
 - combustibles carbonados, [221](#)
 - en ayunas, [772](#)
 - en cerebro, [767](#)
 - en hígado, [769-772](#)
 - en la diabetes mellitus, [773-774](#)
 - en músculo, [767-768](#)
 - evolución, [469-470](#)
 - mejoramiento homeostático, [770-772](#). Véase también Homeostasis de glucosa
 - perspectivas históricas sobre, [434](#)
 - reacciones, [410f](#), [434f](#)
 - propiedades, [435](#)
 - requerimientos y almacenes corporales, [458](#), [767t](#)
 - sabor, [927](#), [929-930](#)
 - sinthesis de
 - a partir de carbohidratos de la dieta, [434](#)
 - a partir de precursores no carbohidratos, [433-434](#), [434f](#), [458-471](#). Véase también Gluconeogénesis
 - visión global, [433-434](#)

Glucosa 1-fosfato, [594](#)

 - en el metabolismo del glucógeno, [594](#)

Glucosa 6-fosfatasa, [434](#)

 - en el metabolismo del glucógeno, [596](#)
 - en la glicólisis, [435-437](#), [436f](#)
 - en la gluconeogénesis, [463](#), [464f](#)

Glucosa 6-fosfato, [310](#), [310f](#), [437](#)

 - deficiencia, [611](#)
 - destinos metabólicos, [593f](#), [765](#), [765f](#)
 - en la glicólisis, [463f](#), [437-438](#), [583-585](#), [770-771](#)

- Glucosa 6-fosfato (continuación)
 en la gluconeogénesis, 463, 464E, 770-771
 en la ruta de las pentosa fosfato, 577, 583-585
 especies reactivas del oxígeno, 586
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)
 deficiencia, 586-587
 en la ruta de las pentosa fosfato, 577, 579f
 propiedades antioxidantes, 586
- α -Glucosidasa, 434
- α -1,6-Glucosidasa, 594-595, 595f
- Glutamato
 conversión a amonio, 656-657
 desaminación oxidativa, 656-657
 en degeneración de aminoácidos, 656-657
 en el transporte del nitrógeno, 661, 662f
 en la fijación del nitrógeno, 683
 estructura, 32, 33f, 224, 656
 quiralidad, 683, 684f
 sabor, 927, 927f, 930
 síntesis de arginina, 688, 688f
 síntesis de glutamina, 683-684, 684f
 síntesis de prolina, 688, 688f
 síntesis, 661, 683, 683f, 686
- Glutamato deshidrogenasa, 684
 en la degradación de aminoácidos, 656-657
 en la fijación del nitrógeno, 683
 en la síntesis de glutamato, 683
- Glutamato γ -semialdehido, 688
 en la síntesis de arginina, 688
 en la síntesis de prolina, 688
- Glutamato sintasa, 684
- Glutamato sintetasa, en la fijación del nitrógeno, 683-684
- Glutamina
 en el transporte del nitrógeno, 661
 en la fijación del nitrógeno, 683
 en la formación de amonio, 687-688
 en la síntesis de pirimidina, 711
 estructura, 30, 31f
 síntesis, 683-684, 684f, 699-700
- Glutamina fosforibosil
 aminotransferasa, 714-715, 724
- Glutamina sintetasa, 683-684
 estructura, 699
 regulación, 699-700, 699f
- Glutatión peroxidasa, 518, 587, 701, 701
- Glutatión redoxtasa, 586, 701
- Glutatión, 701, 701
 conjugación, 1006, 1006, 1007
 propiedades antioxidantes, 586
- GLUTs. Véase Transportadores de glucosa (GLUTs)
- GMP (guanosina monofosfato), síntesis, 714, 717-718, 717f, 724, 724f
- GMP sintasa, 718
- Goldstein, Joseph, 739b, 745, 747
- Gota, 725
- Gradiente de concentración, 353
 en la síntesis de ATP, 418-419, 419f, 420
- Gradiente de protones, 419
 en la fosforilación oxidativa, 508-509, 520-527, 535, 535f
 en la fotosíntesis, 546-547, 553-557
 energía libre, 535, 535f
- Gradientes iónicos, 353
 en la síntesis de ATP, 418-419, 419f, 420
- Grana, 543
- Gránulos de glucógeno, 761, 764f
- Gramíneas, 965
- Grasa
 corporal, almacenamiento de energía, 619-620, 767, 767f
 fecal, 620
 neutra. Véase Triacilgliceroles
 parda, 533
- Grasa neutral. Véase Triacilgliceroles
- Grasa parda, 533
- Grib-2, 397, 397
- Greider, Carol, 304
- GRK2 (receptor de proteína G quinasa 2), 387
- Grupo de cabeza polar, 332, 333
- Grupos catalíticos, 214
- Grupos funcionales, de proteínas, 25-26
- Grupos hidroxilo, 30, 31f, 46, 57-58
- Grupos prostéticos, 207
- Grupos R. Véase Cadenas laterales de aminoácidos
- Grupos sanguíneos, glicosiltransferasa, 315
- Grupos sanguíneos ABO, en glicosiltransferasas, 315
- GTP (guanosina trifosfato)
 en el olfato, 923, 924
 en la síntesis de AMP, 717, 717f, 224
 en la traducción, 876-877, 880, 887
 en la transducción de señales, 384-385, 384-386, 387, 387f, 398, 398f
 en la visión, 934, 934f
 en tubulina, 990
 envío de proteínas al lugar de destino, 882
 hidrólisis, 413
 en la traducción, 877-878, 878f
- GTPasa(s)
 en señales de transcripción, 387, 387f
 envío de proteínas al lugar de destino, 882
- Guanimidino, 31, 31
- Guanilato. Véase GMP (guanosina monofosfato)
- Guanilato ciclasa, en la visión, 934-935
- Guanilato quinasa, estructura, 267, 267-268
- Guanina, 4, 4, 109, 109
 degradación, 725, 725f
 desaminación, 806
- Guanosina, 109
- Guanosina difosfato. Véase GDP (guanosina difosfato)
- Guanosina monofosfato. Véase GMP (guanosina monofosfato)
- Guanosina trifosfato. Véase GTP (guanosina trifosfato)
- Guerlina, 775
- Gustodicina, 926, 928f
- Gusano, 926-931. Véase también Sabor
 estructuras anatómicas, 927, 927f
 moléculas detectadas, 927, 927
- H
- Haber, Fritz, 681
- Haemophilus influenzae*, genoma, 149, 149f, 171
- Haldane, John, 218
- Haptienos, 960
- HAT (histona acetiltransferasa), 911, 911
- Hatch, Marshall Davidson, 575
- HDLs (lipoproteínas de alta densidad), 744, 744f, 745, 747
- Hebra codificadora, 825
- Helicasas, 115, 797-798, 797f
 conservación de la secuencia, 79, 798f
 en el corte y empalme, 846
 en la replicación del DNA, 115, 797-798, 797f, 799
 estructura, 797, 797, 797f, 798
- Hélice
 alfa, 40-41, 41f, 42, 42f
 de α -queratina, 45, 45, 45f
 de miosina, 979-980, 979-981, 980f, 981f
 de proteínas de membrana, 337, 338-339, 339f, 340-341, 341f, 341f, 342f
 de quinesina, 981-982, 982f
 residuos aminoácidos, 52, 52f
 de colágeno, 45-46, 46f
 doble. Véase Doble hélice
 reconocimiento, 894
 sentido de giro, 40, 41f
 transmisora, 981-982, 981f
- Hélice A-DNA, 784-785, 787, 787f
- Hélice B del DNA, 784-785, 787, 787f
- Hélice de reconocimiento, 894
- Hélice transmisora, 981-982, 981f
- Hélice triple, del colágeno, 45-46, 46f
- α -Hélice, 40-41, 41f, 42, 42f
 de α -queratina, 45, 45, 45f
 de miosina, 979-980, 980f
 de proteínas de membrana, 337, 338-339, 339f, 340-341, 341f, 341f, 342f
 residuos de aminoácidos, 52, 52f
- Hélice-huile-hélice, en mano EF, 391, 391f
- Hemaglutinina, 321, 322f
- Hemáties. Véase también Hemoglobina
 2,3-bisfosfoglicerato, afinidad del oxígeno por la hemoglobina, 190-192
- carbohidratos, 315
- cuerpos de Heinz, 387, 587f
- trastornos, 194-196
- indicadores de enfermedad, 194-196, 194f
- tiempo de vida, 704
- Hemicáceras, 306
- cíclico, 307
- Hemicetales, 306-307
- Hemicuentes, 374, 374f
- Hemo, 47, 184, 184-185
 degradación, 704, 704f
 en citocromo c oxidasa, 515-516, 516f
 en la Q-cholesterol y oxidoreductasa, 512-513, 513f
- marcaje, 702, 702h, 702f
 síntesis, 702-704, 703f
- Hemocianina de la lapa de Barbados, 260
- Hemofilia, 296
- Hemoglobina, 183-201
 A, 187
 afinidad por el oxígeno, 190-192, 191f
 pH, 192-193, 192f
 cadenas α , 186-187, 186f, 197, 197
 cadenas β , 186-187, 186f, 197
 curva de unión del oxígeno, 187-188, 187f, 188f
 con modelo concertado, 201, 201f
 para coeficientes de Hill, 200, 200f

- Hemoglobina (continuación)
 dímeros $\alpha\beta$, 186-187, 186f, 188, 189f
 en el transporte de oxígeno, 187-188, 193-194, 194f
 estado R, 188-191, 190f
 estado T, 188-191, 190f, 192-193, 193f
 estructura, 50, 50f, 186-187
 cambios inducidos por la unión del oxígeno, 188-189, 189, 190, 190f
 cuaternaria, 188-189, 189
 terciaria, 173-174, 173f
 evolución, 166-171, 177, 177f
 fetal, afinidad por el oxígeno, 192, 192f
 gen de β -globina, transcripción y procesamiento, 127-128, 128f
H, 196
 homología de secuencia con la mioglobina, 166-171, 166f-172f, 186
 leghemoglobina, 170-171, 170f, 171f. Véase también Leghemoglobina
 liberación del oxígeno, 187-188, 188f, 192-194
 dióxido de carbono, 193-194, 193f, 194f
 efecto Bohr, 192-194, 193f
 representación de Hill, 189-200, 200f
 S, 198, 195-196, 195f, 196f
 unión del oxígeno, 183-192
 cambios estructurales, 188-189, 189, 190, 190f
 efectores allostéricos, 192
 modelo concertado (MWC), 189-190, 189f, 200-201, 201f
 modelo secuencial, 189-190, 190f, 201
 modelos cuantitativos, 199-201, 200f, 201f
 naturaleza cooperativa, 187-188, 188f, 189f
 visión global, 183-184
 vs. mioglobina, 183-184
 α -Hemoglobina, 186-187, 186f, 197, 197. Véase también Hemoglobina
 β -Hemoglobina, 186-187, 186f, 197. Véase también Hemoglobina
 Hendidura sináptica, 370, 370f
 Henseleit, Kurt, 661
 Heparina, 297, 313, 313
 Hepatitis alcohólica, 228
 Hepatotoxicidad del acetaminofeno, 1008, 1009f
 Heptosas, 304-305, 305f
 Herbicidas, mecanismo de acción, 560, 560, 694
 Heterótrofos, 566
 Heteroquinasa
 ajuste inducido, 437, 437f
 en el metabolismo del glucogénico, 593
 en la glicólisis, 435-437, 436f, 437f
 en el hígado, 456
 en el músculo, 433-434
 Hexosas, 304-305, 305f, 306-308
 HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa), 714
 Hialuronato, 313, 313
 Hibridación, DNA, 115
 Hidrolasas, 237f. Véase también Enzima(s)
 Hidrólisis
 de enlaces peptídicos. Véase Enlaces peptídicos, escisión
 en el metabolismo, 427
 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Véase HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA)
- 1,3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 625
 3-Hidroxiantranilato, 672, 672
 α -3-Hidroxibutirato, 631, 631-633. Véase también Cuerpos cetónicos
 α -3-Hidroxibutirato ACP, 636, 636f, 637
 Hidroxietil-TBP
 en el ciclo del ácido cítrico, 478, 478
 en la síntesis de aminoácidos, 697-698, 697f
 Hidroxifenilpiruvato, 672
 en la degradación de aminoácidos, 671, 672f
 en la síntesis de aminoácidos, 694, 695f
 Hidroxifenilpiruvato hidroxilasa, 671
 Hidroxilación
 citocromo P450, 751-752, 751f
 esteroide, 750-751
 proteína, 30, 31f, 57-58
 p -Hidroximercúricobenzoato, 277, 277, 279
 17 α -Hidroxiprogesterona, 753, 753
 Hidroxipentolina, 46, 47
 síntesis, 779, 779f
 Hierro
 en el grupo hemo, 204. Véase también Hemo
 unión del oxígeno, 184-185, 185f
 metabolismo, 914-916
 Hígado
 cirrosis, 778
 combustible, 770
 en el metabolismo de aminoácidos, 656, 769-770
 expresión génica, 892, 893f
 graso, 777
 lesión alcohólica, 228
 lesión relacionada con acetaminofeno, 1008
 metabolismo de ácidos grasos, 734, 768, 769
 metabolismo de fármacos, 1007-1008, 1008f
 metabolismo de glucosa, 596, 610-611, 611f, 769-772
 glicólisis, 455-456, 465-466, 769, 770
 gluconeogénesis, 468, 468f, 769
 metabolismo del etanol, 777-778
 metabolismo en
 ayunas, 773, 773f
 intercambios con el músculo, 468, 468f, 661, 767, 768f
 síntesis de cuerpos cetónicos, 632-633, 632f, 773, 773f, 773f
 síntesis de triacilglicerol, 734, 742, 744f, 768
 síntesis del colesterol, 742, 744f
 Hill, Archibald, 199
 Hipercolesterolémia, 732, 745
 familiar, 732, 747-748
 Hipertensinemia, 674f
 Hipernicetina, 725
 Hipoxeromismo, 115, 115f
 Hipometilacidi, 907
 Hipótesis del balanceo, 874-876
 Hipótesis químicosmética, 521-522, 521f, 522f
 Hipoxantina, 806, 806
 degradación, 725, 725f
 en la síntesis de purina, 714
 Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), 714
 deficiencia, 726-727
 Hipoxia, tumor, 457-458
 Histamina, síntesis, 700, 700f
- Histidina
 conversión a glutámato, 668, 668f
 desde histamina, 700, 700f
 histidil, 186, 186
 en la hidratación del dióxido de carbono, 258, 258f
 en la liberación de oxígeno desde hemoglobina, 192-193, 193f
 en triadas catalíticas, 246-248. Véase también Triadas catalíticas
 estructura, 31, 32f
 proximal, 185
 Hisidina distal, 186, 186
 Histidina proximal, 185
 Histona acetiltransferasa (HAT), 911, 911
 Histona desacetilasa, 912-913
 Histonas, 903-905, 904f
 acetilación, 284f, 910-912, 911f
 coleas aminoterminales, modificación por el coactivador, 910-912, 911f
 en la regulación de genes, 903-905, 904f, 910-912, 911f
 estructura, 904-905, 904f
 homología de secuencia, 904-905, 904f
 HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), 631, 631, 632
 destinos metabólicos, 740f
 en la síntesis del colesterol, 739, 742-743
 regulación, 742-743
 HMG-CoA reduktasa, en la síntesis del colesterol, 739-740
 Hodgkin, Alan, 362
 Hoja B, 42-44, 42f, 44f
 en residuos de aminoácidos, 52-53, 52f
 Holley, Robert, 859
 Holliday, Robin, 813
 Holozima DNA polimerasa III, 799-800, 799f, 800f, 801
 Holozimas, 202
 Homeodomínios, 895, 895f
 Homeostasis calórica, 774
 Homeostasis de glucosa, 770-774. Véase también Glucosa, metabolismo de
 ciclo ayuno/alimentación, 770-772
 en ayunas, 773-773f
 en la diabetes mellitus, 773-774
 Homocisteína
 en el ciclo metilo activado, 692, 692f
 en la degradación de aminoácidos, 560, 560
 en la enfermedad vascular, 693
 en la síntesis de aminoácidos, 692-693
 en la síntesis de cisteína, 693
 síntesis, 691
 Homocisteína metiltransferasa, 691
 Homocistinuria, 674f
 Homogenizado, centrifugación, 67, 75f
 Homogentisato, 671, 672
 Homogentisato oxidasa, 672
 en alcaptonuria, 673
 Homología, 165-172, 166f
 secuencia, 166-171, 166f-172f
 Homologías de secuencia. Véase también Evolución
 análisis, 166-171, 166f-172f
 árboles evolutivos, 177, 177f
 de citocromo c, 520, 520f

- Homologías de secuencia (continuación)
- de conductos iónicos, [164-165](#), [364f](#), [366-367](#)
 - de enzimas del ciclo de la urea, [664](#)
 - de histonas, [904-905](#), [904f](#)
 - de mioglobina y hemoglobina, [166-171](#), [166f-172f](#), [186](#)
 - de tubulina, [990](#)
 - estructura secundaria del DNA, [176-177](#), [176f](#)
 - estructura tridimensional, [174](#)
 - identificación de
 - alineamiento de secuencias, [166-168](#), [166f-168f](#)
 - análisis estadístico, [166-168](#)
 - barajando, [168](#), [168f](#)
 - bases de datos, [171](#), [172f](#)
 - matrices de sustitución, [166-168](#)
 - motivos repetitivos, [174](#), [175](#)
- Homeopolímeros, [311](#)
- Hood, Leroy, [956](#)
- Hormona antiadiártica, [90](#), [91](#)
- Hormona del crecimiento, recombinante, [155](#), [155f](#)
- Hormona(s). Véase también hormonas específicas
- ecosanoide, [643-644](#), [643f](#), [644](#)
 - en el metabolismo de ácidos grasos, [621](#), [641-642](#)
 - en el metabolismo de la glucosa, [467](#)
 - en el metabolismo del glucógeno, [601-604](#), [610](#), [610f](#)
 - en la expresión de genes, [908-909](#)
 - en la gluconeogénesis, [466](#), [467](#)
 - en la regulación del ciclo del ácido cítrico, [492](#)
 - en la transducción de señales, [384-385](#). Véase también Transducción de señales
 - funciones metabólicas, [428](#)
 - local, [644](#)
- Hormonas esteroides
- anabólica, [754](#), [910](#)
 - cardiotónica, [357](#), [357f](#)
 - estructura, [750](#), [750](#)
 - hidroxilación, [750-751](#)
 - síntesis, [749](#), [749f](#), [752](#)
- Hormonas locales, [644](#)
- Hormonas sexuales
- regulación, [908-909](#)
 - síntesis, [749](#), [749f](#), [753](#), [753f](#)
- Horquilla de bases emparejadas. Véase Vuelta en horquilla
- Horquilla de replicación, [796](#), [796f](#), [799-801](#), [799f](#), [800f](#)
- Huecos revestidos, [746](#), [746f](#)
- Huella de DNA, [136](#)
- Huntington, [805](#)
- Huxley, Andrew, [362](#)
- I
- Ibuprofeno, [330](#)
 - Idosa, [305f](#)
 - Ig. Véase Inmunoglobulina(s)
 - Ig- α -Ig- β , [958](#), [958f](#)
 - Imágenes por resonancia magnética funcional, [185](#)
 - en estudios sensoriales, [926](#), [926f](#)
 - Imatinib mesilato, [401](#)
 - Imidazol, [31](#), [31](#)
- 4-imidazolona 5-propionato, [668](#), [668](#)
- IMP. Véase Inosina monofosfato (IMP)
- Impresión genética, [21](#)
- Impulso nervioso, propagación, [362](#), [362f](#)
- Inactivación por inserción, [144](#)
- Índice terapéutico, [1008](#)
- Indinavir, [253](#), [253-254](#), [254f](#)
- desarrollo, [1015-1016](#), [1015f](#)
- Indol, condeudido del susano, [696-697](#)
- Indol-3-glicerol fosfato, [698](#), [698](#)
- Inestabilidad dinámica, [990](#)
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana
- aspartilproteasa, [252](#), [252f](#)
 - células T auxiliares, [966](#)
 - inhibidores de proteasa, [253](#), [253-254](#), [254f](#)
 - desarrollo, [1015-1016](#), [1015f](#), [1016f](#)
 - resistencia, [1022](#)
 - sistema inmune, [969](#), [969f](#)
 - vacuna, [954](#), [962](#)
- Infecciones víricas, carbohidratos, [321-322](#)
- Información genética, flujo, [107-108](#), [107f](#)
- Ingeniería genética. Véase Tecnología del DNA recombinante
- Ingesta de alimentos. Véase también Dieta; Ayuno
- cielo ayuno-alimentación, [770-772](#)
- Inhibición basada en el mecanismo, [230](#)
- Inhibición competitiva, [225-228](#), [225f](#), [226f](#), [228f](#)
- Inhibición no competitiva, [225f](#), [226](#), [227](#), [227f](#), [228f](#)
- Inhibición por producto final, [277](#)
- Inhibición suicida, [230](#), [722](#), [726](#)
- Inhibidor de elastasa, [292](#)
- Inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), [296](#)
- Inhibidor de quimotripsina, estructura, [56f](#)
- Inhibidor de tripsina, [291-292](#), [292f](#)
- Inhibidor pancreático de tripsina, [291](#)
- Inhibidores alostéricos, [277](#), [428](#)
- Inhibidores COX2, [1016](#)
- desarrollo, [1016](#)
- Inhibidores de ciclooxigenasa, desarrollo, [1016](#)
- Inhibidores de girsas, [792](#)
- Inhibidores de la ácido graso sintasa, [640](#)
- Inhibidores de la HMG-CoA reductasa, [748](#), [748-749](#), [1012](#), [1012-1012](#), [1013](#)
- Inhibidores de prostaglandinas, [339](#), [644](#), [1012](#)
- aspirina, [339](#), [644](#), [1012](#)
- Inhibidores de proteasas, [291-292](#), [292](#)
- α_1 -antitripsina, [292](#)
 - farmacéuticos, [253](#), [253-254](#), [339](#), [644](#)
 - desarrollo, [1015-1016](#), [1015f](#)
 - resistencia, [1022](#)
 - inhibidor pancreático de tripsina, [291-292](#)
- Inhibidores de proteína quinasa para el cáncer, [401](#)
- Inhibidores de timidilato para el cáncer, [722-723](#)
- Inhibidores de xantina oxidasa, [726](#)
- Inmunidad
- adaptativa, [945](#), [946-947](#)
 - innata, [946](#)-[947](#)
 - mediada por células, [945](#), [961](#)
- Inmunización. Véase Vacuna(s)
- Inmunodeficiencia combinada grave, [725-726](#)
- terapia génica, [159](#)
- Inmunodeficiencia, terapia génica, [159](#)
- Inmunógenos, [948](#)
- Inmunoglobulina A (IgA), [950f](#), [951](#)
- Inmunoglobulina α , [958](#)
- Inmunoglobulina β , [958](#)
- Inmunoglobulina D (IgD), [950](#), [951](#), [951f](#)
- Inmunoglobulina E (IgE), [950](#), [951](#), [951f](#)
- Inmunoglobulina G (IgG), [949-951](#), [949f-951f](#), [950](#), [950f](#), [951f](#)
- Inmunoglobulina M (IgM), [950](#), [951](#), [951f](#)
- células B, [958](#), [958f](#)
- Inmunoglobulina(s). Véase también Anticuerpos
- cadenas ligeras, [949-950](#), [949f](#), [956-958](#), [956f](#), [957f](#)
 - en cambio de tipo, [960](#)
 - cadenas pesadas, [949-950](#), [949f](#), [957-958](#), [957f](#)
 - en cambio de tipo, [960](#)
 - formación de [960-961](#)
 - definición, [84](#)
 - diversidad de secuencia, [951-952](#), [951f](#)
 - escisión, [950](#), [950f](#)
 - flexibilidad en los segmentos, [950](#), [950f](#)
 - propiedades, [950](#)
 - regiones constantes, [952](#), [952f](#)
 - regiones variables, [952](#), [952f](#)
- Immunoprecipitación de cromatina (ChIP), [906](#)
- Imunosupresores, [959-960](#)
- Imunotoxinas, por ingeniería genética, [148](#), [148f](#)
- Inosina
- degradación, [725](#), [725f](#)
 - en anticodones, [875](#)
- Inosina monofosfato (IMP)
- AMP, [717](#), [717f](#)
 - GMP, [717-718](#), [717f](#)
 - síntesis, [716-717](#), [716f](#)
- Inosinato, [716](#)
- síntesis, [714](#), [716-717](#), [716f](#), [717f](#), [724](#)
- Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), [383](#), [388-389](#), [389f](#)
- Inositol, en fosfolípidos, [330](#)
- Inserciones, producción, [148](#)
- Insuficiencia cardíaca digital, [357](#)
- Insuficiencia cardíaca congestiva, digital, [357](#)
- Insulina
- en el metabolismo de glucosa, [467](#), [770-771](#)
 - en el metabolismo del glucógeno, [610](#), [610f](#)
 - en la diabetes mellitus, [773-774](#). Véase también Diabetes mellitus
 - en la obesidad, [775](#)
 - en la síntesis de ácidos grasos, [642](#)
 - en la transducción de señales, [391-395](#), [392f](#), [395f](#)
 - espectrometría de masas, [93-94](#), [94f](#)
 - estructura, [36](#), [36f](#), [392](#), [392f](#)
 - secreción, [770f](#)
 - secuencia de aminoácidos, [36](#), [36f](#)
- Interacción antígeno-anticuerpo, [84-85](#), [84f](#), [85f](#), [949-956](#), [954f](#), [955f](#)
- Interacciones allostéricas, [277](#), [428](#), [762](#)
- Interacciones de Van der Waals, [8](#), [8f](#), [11](#), [48](#)
- Véase también Enlaces
- en el complejo enzima-sustrato, [215](#), [215f](#)
- en el modelo espacial compacto, [61](#), [61f](#)
- en la doble hélice, [10](#), [10f](#)
- en la unión antígeno-anticuerpo, [953](#), [954f](#), [955](#)
- Interacciones hidrofóbicas, [8](#), [8f](#), [9-10](#), [9f](#)
- Intercalado, [832](#)

- Intermediario enodiol, en la glicolisis, 439, 440f
 Intermediario tioéster, en la miosina, 442, 442f
 Interrupción de genes, 155-157, 156f
 Intestinos, digestión proteica y absorción, 650, 650f
 Intolerancia a la lactosa, 451
 Intrones, 106, 127, 128f, 839
 evolución, 129
 grupo L, 849
 separación, 128, 128f. Véase también Corte y empalme
 Investigación BLAST, 171, 172f
 Ion bicarbonato, en el transporte de oxígeno, 193-194, 194f
 Ion calcio
 en la activación de la calmodulina, 390-391
 en la activación de la fosforilasa quinasa, 600-601, 601f
 en la activación del complejo de la piruvato deshidrogenasa, 492
 en la transducción de señales, 389-391, 389f-391f
 en la visión, 934-935
 estructura, 383
 unión de protrombina, 296
 Ion dipolar, 27-28, 27f
 Ion hidrógeno. Véase también Ácido(s)
 afinidad del oxígeno por la hemoglobina, 192-193, 192f
 en disoluciones acuosas, 14-17
 pH, 14. Véase también pH
 sabor amargo, 927, 927f, 931
 Ion hidroxido, pH, 14
 Ion magnesio
 en el ciclo de Calvin, 568-569, 574, 574f
 en la escisión del DNA, 262-263, 264-265
 en la transferencia del grupo fosforilo catalizada por NMP quinasa, 268-269, 269f
 quininas, 268-269, 269f, 437
 Ion potasio, en la bomba Na⁺-K⁺, 354, 357-360.
 Véase también Bombas de iones
 Ion sodio, sabor salado, 927, 930-931
 Ion superóxido, 518, 518f
 Iones metálicos, 207, 207f, 242. Véase también metales específicos
 en la escisión del DNA, 262-263, 264-265
 en la hidrólisis del dióxido de carbono, 207, 207f, 255-256, 255f-257f
 en la replicación del DNA, 794, 794f
 en la transferencia del grupo fosforilo catalizada por NMP quinasa, 268-269, 269f
 Ionización por electro-aerosol, 2-8. Véase también Enlaces
 ATP, 415
 en la unión antígeno-anticuerpo, 953, 954f
 IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato), 388, 388-389, 389f
 IPGT (isopropiltiogalactósido), 898, 898
 IRE (elemento de respuesta al hierro), 915, 915f
 IRP (proteína de unión al elemento de respuesta al hierro), 915-916, 916f
 Islas de CpG, 907
 Isocitrato, en el ciclo del ácido cítrico, 484-485, 485f
 Isocitrato deshidrogenasa, en el ciclo del ácido cítrico, 484-485, 487, 492f
 Isocitrato liasa, en el ciclo del glicoxilato, 495, 496f
 Isoelectrofoque, 73, 73f
 con SDS-PAGE, 73, 73f
 Isoenzimas, 275-276, 283, 283f
 Isoleucina
 degradación, 670-671
 en la enfermedad del jarabe de arce en la orina, 673
 estructura, 28, 29f
 síntesis, 697-698
 Isomerasas, 237f. Véase también Enzima(s)
 Isomerización, en el metabolismo, 425t, 426
 Isómeros L, 304
 3-Isopentenilpirofosfato, 740, 740, 741f
 Isopropiltiogalactósido (IPTG), 898, 898
 Isovaleril-CoA, 670, 670
 Isozima H, 283, 283f
 Isozima M, 283, 283f
 Isozimas, 275-276, 283, 283f
 ITAM (motivo de activación basado en la tirosina del immunorreceptor), 958
 J
 Jacob, François, 897
 Jagendorf, André, 553
 Jorge III (Rey de Inglaterra), porfiria, 705
 Julio (J), 7, 209, 209b
 K
 k_{cat} (número de recambio), 221, 221f
 k_{cat}/K_m , 221
 K_d (constante de disociación)
 aparente, 1003
 del complejo enzima-sustrato, 221
 para la unión del ligando, 1002-1003, 1002f, 1003f
 Kendrew, John, 184
 Kennedy, Eugene, 622
 Khorana, Har Gobind, 124
 K_i (constante de inhibición), 1003
 Kilobase, 120b
 Kilocaloría (kcal), 7, 209b
 Kilojulio (kJ), 209, 209b
 Kirschner, Marc, 990
 Klug, Aaron, 861, 904
 K_m (constante de Michaelis), 218-221
 cálculo, 220
 de enzimas seleccionadas, 220f
 definiciones, 219, 221
 Köhler, Georges, 86
 Kornberg, Arthur, 117
 Koshland, Daniel E., Jr., 215
 Krebs, Hans, 419, 495b, 661
 L
 L-aminoácidos, 27, 27f
 Laborit, Henri, 1010
 Lac
 centro regulador, secuencia nucleotídica, 893f
 operador, 898
 operón, 897-899, 897f-899f, 900
 represor, 894, 894f, 897-899, 898f, 899f, 900
 Lactasa, 311, 434
 deficiencia, 451
 Lactato, 223
 en el ciclo de Cori, 468, 468f
 en la contracción muscular, 223
 en la glicolisis, 433
 en la gluconeogénesis, 433, 458
 formación, 223, 468, 468f
 desde piruvato, 447, 447f
 Lactato deshidrogenasa, 223
 en la glicolisis, 447-448
 en la gluconeogénesis, 458
 evolución, 469
 isozimas, 283, 283f, 469
 Lactobacillus, 451f
 β-Lactoglobulina, espectrometría de masas, 93-94, 94f
 Lactosa, 311, 311f
 metabolismo, 896-897
 Lactosa permeasa, en transporte a través de membranas, 360-361, 361f
 Lanosprazol, 1018, 1018
 Lanosterol, 741, 742
 Lanzadera de glicerol 3-fosfato, 527-528, 527f, 528f
 Lanzadera de protones, en la hidratación del dióxido de carbono, 258, 258f
 Lanzadera del aspartato-malato, 528, 529f
 Lazo DHU, del tRNA, 860, 860f
 Lazo intermedio, en el corte y empalme, 844, 844f
 LDLs. Véase Lipoproteínas de baja densidad
 Lectinas, 320-322, 321
 Leder, Philip, 956
 Lederberg, Joshua, 232
 Leghemoglobina, 120-121, 171f, 681, 170f.
 Véase también Hemoglobina
 estructura terciaria, 173-174, 173f
 evolución, 177, 177f
 Lehninger, Albert, 622
 Lejía, orina, 663b
 Leloir, Luis, 604
 Lengua, botones gustativos, 927, 927f, 928
 Leptina, 774-775
 Leucemia mielógena crónica, tratamiento, 401
 Leucina
 degradación, 670
 en la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, 673
 estructura, 28, 29f
 síntesis, 697-698
 Leucotrienos, 643-644, 643f, 644
 Levadura, genoma, 149, 901
 Levinthal, Cyrus, 53
 Ley de Coulomb, 7-8
 Leyes de la termodinámica, 11-13. Véase también Termodinámica
 Lissas, 638b. Véase también Enzima(s)
 Ligando, definición, 382
 Ligasa, 237f, 796, 809. Véase también Enzima(s)
 Línea Z, 982, 983f
 LINES, 150
 Linfocitos. Véase Célula B; Células T
 Linoleato, 643, 643
 oxidación, 626-627, 627f
 Linoleil-CoA, 626-627, 627
 Linolenato, 643, 643

- Lipasas, [619-620](#), 620f, [621](#)
 Lipasas pancreaticas, [619-620](#), 620f, [621](#)
 Lipido A, [946](#), 946f
Lípidos
 ácidos grasos, [327-329](#), [328f](#), 328t. Véase también Ácidos grasos
 almacen de energía, [619-620](#), 767f
 dieta, solubilización, [249](#)
 hidrólisis, [621-622](#), 621f
 membrana. Véase Membranas; Lípidos de membrana
 metabolismo de. Véase Metabolismo de ácidos grasos
 movilización, [621-622](#), 621f
 transporte, 620, 620f
Lípidos de membrana. Véase también Membranas; bicapa lipídica de ácidos grasos, [327-329](#), 328f, 328t
 anfipatidicidad, [332](#), [333](#)
 colesterol, [331](#), [331](#)
 de arqueobacterias, [331-332](#), 332f
 difusión lateral, [342-345](#), 342f, 343f
 difusión transversal, [343](#)
 distribución asimétrica, [343](#), [345](#)
 en membranas tilacoidales, [343](#)
 esfingolípidos, síntesis, 736-739
 flip-flop, [343](#), 343f
 fosfolípidos, [329](#), [329-331](#), [333-335](#)
 síntesis, 733-739, 733f
 glicolípidos, [331](#)
 grupo de cabeza polar, [332](#), [333](#)
 hidrofilicidad, [332](#), [333](#), [334](#)
 hidrofobicidad, [332](#), [333-334](#)
 síntesis, [733-736](#)
 tipos, [329-332](#)
 triacilgliceroles, síntesis, 733-739, 733f
Lipoamida, en el ciclo del ácido cítrico, [479](#), [480](#), [481](#)
Lipólisis, [621-622](#), 622f. Véase también Metabolismo de ácidos grasos
 en ayunas, [772](#), 772f, [773](#)
 en diabetes mellitus, [774](#)
Lipoxygenasa, 644
Lipopolisacárido (LPS), [946-947](#), 946f
Lipoproteína lipasas, 744
Lipoproteínas
 clasificación, 744, 744t
 de alta densidad, 744, 744t, [745](#), [747](#)
 de baja densidad, [346](#), 346f, 744-748, 744f, 744t
 en hipercolesterolemia familiar, [747-748](#)
 endocitosis mediada por receptor, [745-746](#), 746f
 de densidad intermedia, 744, 744t
 de muy baja densidad, 744, 744t
 funciones de transporte, [243-244](#)
 metabolismo, 745f
Lipoproteínas de baja densidad, [346](#), 346f, 744-748, 744f, 744t. Véase también Lipoproteínas
 Lipoproteínas
 en la hipercolesterolemia familiar, [747-748](#)
 endocitosis mediada por receptor, [745-746](#), 744t. Véase también Lipoproteínas
Lipoproteínas de alta densidad, 744, 744t, [745](#), [747](#). Véase también Lipoproteínas
Lipoproteínas de densidad intermedia, 744, 744t. Véase también Lipoproteínas
 Lipoproteínas de muy baja densidad, 744, 744t.
 Véase también Lipoproteínas
- Lipoproteínas de muy alta densidad, 744, 744t.
 Véase también Lipoproteínas
- Liposomas, [334-335](#), 334f
 Lipscomb, William, [278](#)
- Lisina
 estructura, [31](#), 32f
 síntesis, [698](#), 698f
- Lisofosfatidato, en la síntesis de lípidos de membrana, 733, 733
- Lisoscitas, [346](#)
 definición, [318](#)
 en la endocitosis mediada por receptor, [746](#)
 en la enfermedad por células T, [318-319](#)
 función, [318](#)
- Lisozima, [214](#)
 modelos moleculares, [61-62](#), 61f, 62f
 unión a anticuerpo, [944-956](#), 955f
- Lixosa, 305f
- Locus oriC, [801](#), 801f
- Longitud de los fragmentos de restricción polimorfismos, 137b
- Lovastatina, [748](#), [748](#), 1012, 1012-1013
- Luz, espectro electromagnético, 931, 931f
- M**
- Mackinnon, Roderik, [365](#), [368](#)
- Macromoléculas biológicas, 2
- Maduración de la afinidad, 958
- Malaria
 deficiencia en G6PD, [587](#)
 rasgo de células falciformes, [195-196](#), 196f
- Malato, [488](#)
 en el ciclo de Calvin, 575-576, 575f
 en el ciclo del ácido cítrico, [488](#)
- Malato deshidrogenasa, [488](#)
- Malato sintasa, en el ciclo del glicoxilato, [496](#), 496f
- MALDI (desorción-ionización en matriz inducida por láser), [93-94](#), 94f
- 4-Maleilacetacetato, 672
- Malonil-ACP, 636, 636, 636f
- Malonil-CoA, 635, [641](#), 769
- Maltasa, [311](#), [314](#)
- Maltosa, [310](#), [311](#), [311f](#)
- Manganese
 en el fotosistema II, [549-550](#), 550f
 en la transferencia del grupo fosforilo catalizado por NMP quinasa, [268-269](#), 269f
- Mano EF, [390-391](#), [391f](#)
- Manosa, estructura, [305](#), 305f
- Manosa 6-fosfato, [319](#), [319](#)
- Mapas
 centro activo, [228-230](#)
 densidad electrónica, [97](#), [97f](#)
- Mapas de densidad electrónica, [97](#), [97f](#)
- Marcadores de afinidad, [229-230](#)
- Marcos de lectura, [126](#)
- Margoliash, Emanuel, [520](#)
- Mastocitos, heparina, [297](#), 297f
- Matrices de sustitución, [169-171](#), 169f-171f
- Mecanismo concertado, en unión del sustrato, [281](#)
- Mecanismo de cambio de unión, [524-525](#), 524f
- Mediadores, [901](#), 903f
- Medicina forense, reacción de la polimerasa en cadena, [142](#), 142f
- Megabase, 901b
- Melatina, síntesis, 700
- Membrana bícapa plana, [335](#), 335f
- Membrana tilacoidal, [543](#), 543f, [550-551](#)
 gradiente de protones a través, 553-554
 regiones apiladas vs. no apiladas, 559-560, 559f
- Membranas, [326-348](#)
 ácidos grasos, [343-344](#), 344f
 asimetría, [343](#), [345](#), 345f
 bícapa lipídica, [333-335](#)
 como barreras de permeabilidad, [343](#)
 como disolventes para proteínas de membrana, [343](#)
 formación, [333-334](#)
 fuerzas no covalentes, [334](#)
 funciones, [343](#)
 bícapa plana, [335](#), 335f
 biosíntesis, [345](#)
 características clave, [327](#)
 cloroplasto, [543](#), 543f
 colesterol, [344-345](#)
 difusión a través de. Véase Difusión a través de la membrana
 en arqueobacterias, [331-332](#), 332f
 en bacterias, [344](#), [345](#)
 en eucariotas, [344](#), [345-347](#), 345f, 346f
 flip-flop, [343](#), 343f
 fluides, [342-345](#), 342f, 343f
 formación de vesículas, [346](#)
 fosfolípido, [333-335](#), 333f-335f
 fusión de vesículas, [347](#), 347f
 glicolípido, [335](#)
 mitocondrial, [503-504](#), 504f
 permeabilidad, [335](#), 335f, [351](#)
 evaluación liposómica, [334-335](#), 334f
 sintética, [335](#), 335f
 temperatura de fusión, [343-344](#), 343f, 344f
 tilacoidal, [543](#), 543f, [550-551](#)
 a través del gradiente protones, 553-554
 regiones apiladas vs. no apiladas, 559-560, 559f
 visión global, [326-327](#)
- Mensajeros primarios, [382](#)
- Menten, Maud, [217](#)
- B-Mercaptotetanol, en la desnaturización de ribonucleasa, [50](#), [50](#), [51-52](#), [51f](#)
- 6-Mercaptopurina, [1019](#), [1020](#)
- Meromiosina ligera, 979-980, 979f
- Meromiosina pesada, 979, 979f
- Merrifield, R. Bruce, [91](#)
- Meselson, Matthew, [113](#)
- Metahalcones, [491](#)
- Metabolismo, [409-430](#)
 adición de grupo funcional, [427](#)
 bioenergética, [411-420](#)
 carga energética, [428-429](#), 428f
 ciclos de sustrato, [467-468](#), 468f
 compartimentación, 762
 de carbohidratos, [434](#)
 definición, [409](#)
 energía libre, [411-412](#)
 especialización de órgano, 762
 evolución, [428-429](#)
 fármaco, [1006-1008](#)
 hidrólisis, [427](#)

- Metabolismo (continuación)
- interacciones alóstéricas, [277](#), [428](#), 762
 - isomerización, 425f, [426](#)
 - modificación covalente, 762, 762f
 - motivos comunes, [420](#)-[427](#)
 - motivos recurrentes, [761](#)
 - primer paso, 1007
 - reacciones anabólicas, [411](#)
 - reacciones catabólicas, [411](#), [417](#)-[420](#)
 - transportadores electrónicos, [420](#)-[421](#)
 - reacciones catalizadas por liasa, [427](#)
 - reacciones de oxidación-reducción, [425](#), 425t
 - reacciones de transferencia de grupo, [418](#), 425t, [426](#)
 - reacciones interconectadas, [410](#)-[412](#), 410f
 - reacciones ligadas, [425](#)-[426](#)
 - regulación, [428](#)-[429](#)
 - vía actividad catalítica, [428](#)-[429](#)
 - vía cantidad de enzima, [428](#)
 - vía disponibilidad del sustrato, [429](#)
 - regulación enzimática, 762
 - termodinámica, [411](#)-[412](#). Véase también Energía; Termodinámica
 - transportadores electrónicos, [420](#)-[425](#), 422t
 - visión global, [409](#)-[410](#)
- Metabolismo ácido de las erasulfíceas, [577](#), 577f
- Metabolismo de ácidos grasos, 419f, [617](#)-[646](#), [764](#)-[765](#), 768
- acetil-CoA carboxilasa, 635, 636f, 640-641, 640f, 641f
 - acetil-CoA, 624-625, 635
 - acilcarnitina, [623](#)-[624](#), 623f
 - activación, 622-623
 - citoplasmático, 634
 - citrato, 638-639, 639f, [641](#), [641f](#)
 - coenzima A, 622-623
 - coenzima B₁₂, 629
 - cuerpos cetónicos, [631](#)-[634](#)
 - de ácidos grasos insaturados, [626](#)-[627](#), 626f, 627f, 642-644
 - degradación, 618, 618f, 624-634
 - reacciones, 625f, 625t
 - vs. síntesis, 635, 636t
 - dieta, 642
 - durante el ejercicio, 776-777
 - en animales, 634
 - en ayunas, [722](#), 772f, [723](#)
 - en el cerebro, [262](#)
 - en el hígado, 768, 769
 - en el músculo, [267](#)-[268](#)
 - en el retículo endoplasmático, 642-644
 - en el tejido adiposo, 768, 768f
 - en la homeostasis de glucosa, [771](#)-[772](#)
 - en los peroxisomas, [630](#), [631](#)f
 - epinefrina, [621](#), [641](#)-[642](#)
 - etanol, [277](#)
 - glucagón, [621](#), [641](#)-[642](#)
 - hidratación de enoil-CoA, 624-625, 625f, 625t
 - hidrólisis de triacilgliceroles, [621](#)-[622](#), 621f
 - hormonas, [621](#), [641](#)-[642](#)
 - insaturación de ácidos grasos, 642-644
 - lipasas, [619](#)-[620](#), 620f, [621](#)
 - lipasas pancreáticas, [619](#)-[620](#), 620f
 - lipólisis, [621](#)-[622](#), 622f
 - malonil-CoA, 635, 636, 636f, [641](#)
 - movilización y transporte de lípidos, 620-622, 620f, 621f
 - oxidación, 622-634, 625f, 625t
 - palmitil-CoA, 625-626, [641](#)
 - proteínas transportadoras de acilo, 635, 635-637, 636f, 636t
 - quilomicrones, 620, 620f
 - reacciones, 618-619, 618f
 - regulación, 640-642, [764](#)-[765](#), 765f
 - rendimiento energético, [619](#), 625-626
 - ruta de la β-oxidación, 624-625
 - síntesis de ácidos grasos, 636-638, 637f, 640
 - síntesis, 618, 618f, [621](#)-[622](#), 621f, 622f, 634-640
 - características clave, 634
 - condensación, 636, 636f, 636t
 - de ácidos grasos insaturados, 642-644, 643f
 - deshidratación en 636f, 636t, [637](#)
 - elongación, 636, 636f, 636t, 642-644
 - en animales, [637](#)-[638](#)
 - fuentes de NADPH, [639](#)
 - insulina, 642
 - reacciones, 636, 636f, 636t
 - reducción, 636-637, 636f, 636t
 - rutas metabólicas coordinadas, 632f, [639](#), 640f
 - transportador de citrato, 638, 639f
 - vs. degradación, 635, 636t
 - tiolisis, 625-626, 625f, 625t
- Metabolismo del glucógeno, [592](#)-[614](#), [764](#)
- como liberación regulada de glucosa, [528](#)
 - degradación, 593-604, [607](#)-[608](#), cAMP, 603
 - cascada reguladora, 601-603, 602f
 - iniciación, 601-603
 - terminación, 603-604
 - enzima ramificante, 606
 - epinefrina, 601-603
 - evolución, [604](#)
 - fosfato de piridoxal, [596](#)-[598](#), 597f
 - fosfoglicerato mutasa, [596](#)
 - fosfoglucomutasa, [595](#)-[596](#), 596f
 - fosforilasa, [594](#)-[601](#). Véase también Glucógeno fosforilasa
 - fosforilasa quinasa, 600-601, 601f, [607](#), 608f
 - fosforilisis, [594](#)-[598](#)
 - glicogenina, 606
 - glucagón, 601-603
 - glucógeno fosforilasa, [594](#)-[598](#), [594](#)-[601](#), 595f, 597, 610-611, 611f. Véase también Glucógeno fosforilasa
 - glucógeno sintasa, 605-607, 610, [611](#)f
 - glucógeno sintasa quinasa, [607](#), 608, 608f, 610, 610f
 - α-1,6-glucosidasa, [594](#)-[595](#), 595f
 - hidrólisis de pirofosfato, [604](#)-[605](#)
 - hormonas, 601-604, 610, 610f
 - insulina, 610, 610f
 - ión carbonio intermediario, 597
 - proteína fosfatasa L, 603-604, 608-610, 609f
 - proteína quinasa A, [607](#), 608f
 - proteínas G, 601-603
 - regulación, [607](#)-[611](#)
 - en el hígado, [596](#), 610-611, [611](#)f
 - en el músculo, 608-610
 - señalización, 601-604
- simbiosis, 593, [604](#)-[612](#)
 - transferasa, [594](#)-[595](#), 595f
 - trastornos, [611](#)-[612](#), 612t
 - uridina difosfato glucosa, [604](#)-[607](#)
 - visión global, [597](#)-[593](#)
- Metabolitos, 2
- Metales, coenzima, [207](#), 207t
- Metaloproteasas, en la escisión del enlace peptídico, [251](#), 252f, [253](#)
- Metationeína, síntesis, [155](#), 155f
- Metandrostenolona, [910](#)
- Metarrondopina II (R⁴), [933](#)-[934](#), 934f
- Metilación
- del DNA, 692, 692f, 907
 - en la escisión, [260](#), 260f, [265](#)-[266](#)
 - en la síntesis de aminoácidos, 691-692, 691f, 692f
 - del tRNA, 860
 - en la regulación génica, 907, [912](#)
 - en la síntesis de aminoácidos, 691-692, 691f, 692f
 - hipometilación, 907
- Metilasa, en la escisión del DNA, [260](#)
- 3-Metilbutano-1-tiol, [922](#), [922](#)
- 5-Metilcitidina (mC), [860](#)
- 5-Metilcitosina, 907, [907](#)
- Metilcobalamina, 691-692
- Metilcrotonil-CoA, 670, [670](#)
- Metil-D-glucopiranósido, [309](#), 309f
- N⁵,N¹⁰-Métilentetrahidrofolato, 689, [689](#)
- Metilglutaconil-CoA, 670, [670](#)
- Metilmalonil-CoA, [627](#), [628](#), [668](#)-[669](#)
- Metilmalonil-CoA mutasa, [628](#)-[630](#), [630](#), [668](#)-[669](#)
- N⁵-Metiltetrahidrofolato, 689, [689](#), 691, [721](#)
 - en la síntesis del timidilato, 720-721, 721f
- Metionil-tRNA, [871](#), 871f
- Metionina, [669](#)
 - conversión a succinil-CoA, [669](#), 669f
 - en el ciclo metilo activado, 692, 692f
 - en el enifema, [292](#)
 - estructura, [28](#), 29f
 - síntesis, [628](#), 690, 691-692, [698](#), 698f
- Metionina sintasa, 691
- Metionina sulfóxido, 691
- Metmioglobina, [185](#)
- Método de extremos cohesivos, [143](#), 143f
- Método dideoxi, [138](#)-[139](#), 138f
- Método dideoxi de Sanger, [138](#)-[139](#), 138f
- Metoprolol, [1019](#), [1019](#)
- Metotrexato, [223](#)
- Mevalonato, en la síntesis del colesterol, 739
- Meyerhof, Otto, [434](#)
- MHC. Véase Complejo de histocompatibilidad principal (MHC)
- Micela, [333](#), 333f
- Michaelis, Leonor, [217](#)
- Micro RNA (miRNA), [120](#)
- β₂-Microglobulina, [962](#), 962f
- Microinyección, de DNA recombinante, [153](#), 153f, [155](#)
- Microorganismos diazotróficos, 681
- Microscopía
- defluorescencia, [89](#)-[90](#), 89f
 - immunoeléctronica, [90](#), 90f
- Microtúbulos, [980](#)-[993](#)
 - en cilios, 990

- Microtúbulos (continuación)
 en flagelos, 990
 estructura, 989-990, 989f, 990f
 funciones, 990
 inestabilidad dinámica, 990
 movimiento de quinesina a lo largo, 991-993,
 991f, 992f
- Microvellosidades**
 en papillas gustativas, 927, 927f
 intestinales, 311, 311f
- Mielina**, contenido proteico, 336
- Mieloma, 86**
- Mieloma múltiple, 86**
- Milstein, César, 86**
- Mineralcorticoides**. Véase también Hormonas esteroideas
 síntesis, 749, 749f
- Minoxidil sulfato, 1006, 1006**
- Miofibrillas, 982**
 sarcómero, 982-984, 983f
- Mioglobina**
 curva para la unión del oxígeno, 187-188,
 187f, 188f
 estructura, 47, 47-48, 47f, 184, 184
 terciaria, 173-174, 173f
 evolución, 177, 177f
 formas, 184
 homología de secuencia con hemoglobina,
 166-171, 166f-172f, 186
 mapa de densidad electrónica, 97f
 representación de Hill, 199-200, 200f
 unión del oxígeno, 184-186, 185f-187f, 187
 visión global, 183-184
 vs. hemoglobina, 183-184
- Miopatía**, relacionada con fármacos, 1012
- Miosina, 977-989**
 brazo elevador, 981, 981f, 988-989, 988f
 en filamentos finos, 982-983, 983f
 en filamentos gruesos, 982-984, 983f, 984f
 en la sordera, 984
 estructura, 978-980, 979f, 980f
 funciones, 984
 hélice transmisora, 981, 981f
 movimiento a través de la actina, 982-989.
 Véase también Filamentos actina/actina
 observación directa, 986-987
 transmisión de la potencia, 987-988
 velocidad, 988-989, 988f
 quinesina, 978. Véase también Quinesina S1, 978-981, 979f, 981f
 S2, 978-980, 979f
 trastornos, 984
 unión de ATP, 980-982, 980f-982f
- Miristilación, 284t**
- miRNA (micro RNA), 120**
- Michell, Peter, 521-522**
- Mitchison, Tim, 990**
- Mitocondria**
 ATP sintasa, 503, 521-527, 534
 en el ciclo del ácido cítrico, 476, 476f
 en la apoptosis, 535
 estructura, 503-504, 504f
 fosforilación oxidativa, 503-505
 genoma, 504-505, 504f, 505f
 metabolismo de ácidos grasos, 630
 origen endosimbiótico, 505
- propiedades, 404-505
- Modelo concertado (MWC)**
 de la cinética de enzimas alostéricas, 282, 282f
 de la unión del oxígeno a la hemoglobina,
 189-190, 189f, 200-201, 201f
- Modelo de esfera-cadena, de inactivación de conductos iónicos, 369-370, 369f**
- Modelo de llave y cerradura, del complejo enzima-sustrato, 215, 215f**
- Modelo de nucleación-condensación, 56-57**
- Modelo de Watson-Crick, 5, 111-112, 112f.**
 Véase también Bases/pares de bases; DNA; Doble hélice
- Modelo del ajuste inducido, del complejo enzima-sustrato, 215, 215f, 242, 269-270,
 437, 437f**
- Modelo del filamento deslizante, 983, 983f**
- Modelo del mosaico fluido, 343**
- Modelo molecular asociado a patógenos (PAMP), 946-947, 947f**
- Modelo molecular espacial compacto, 22, 23f,
 61, 61f**
- Modelo MWC (concertado)**
 de la cinética de enzimas alostéricas, 282,
 282f
 de unión del oxígeno a la hemoglobina, 189-
 190, 189f, 200-201, 201f
- Modelo secuencial**
 de la unión del oxígeno a la hemoglobina,
 189-190, 190f, 201
 de unión del sustrato, 281
- Modelo trombín, de la replicación del DNA, 800, 800f**
- Modelos de esferas y varillas, 22, 23f, 61, 61f**
- Modelos de esqueleto, 62, 62f**
- Modelos moleculares, 61-62, 61f, 62f**
 de esferas y varillas, 22, 23f, 61, 61f
 espacial compacto, 22, 23f
- Modificación covalente, de proteínas, 57-58, 57f,
 283-285, 284f, 762**
 mecanismos, 284f. Véase también
 Fosforilación
- Modificación covalente reversible, 428, 699-700,
 699f**
- Moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs), 910**
- Molde**
 en la replicación, 117, 118f, 793
 en la traducción, 119
 en la transcripción, 121-122, 121f, 122f
 secuencia, 10, 825, 825f
 secuencia, 174
- Moléculas**
 estructura tridimensional, 22
 homólogas, 165-172, 166f
- Moléculas antípaticas, 332**
- Moléculas lipofílicas, 352**
- Moléculas no polares, 2**
- Monoacilglicerol, 620**
- Monoamino oxidasa, inhibición suicida, 230,
 231f**
- Monod, Jacques, 189, 897**
- Monooxigenasas, 671, 750**
- Monosacáridos, 304-310. Véase también
 Carbohidratos**
 abreviaturas, 316b
- aldosas, 304, 305, 305f
 azúcares no reductores, 309-310
 azúcares reductores, 309-310
 cetosas, 304, 305-306, 306f
 con alcoholes, 309-310
 con aminas, 309-310
 definición, 304
 estereoisómeros, 304, 304f
 estructura, 304, 304f
 forma bote, 308, 308f
 forma silla, 308, 308f
 formas anillo, 306-308, 307f, 308f
 formas sobre, 308, 308f
 fosforilado, 310
 furanosa, 306-308, 307f
 hexosas, 306-308
 isómeros n, 304-305, 305f, 306f
 isómeros L, 304
 modificado, 309-310, 309f
 nomenclatura, 307-308
 pentosas, 306-308
 piranosa, 306-308, 307f
- Monóxido de carbono, en la inhibición de la fosforilación oxidativa, 533**
- Montagnier, Luc, 969**
- Morfina, biodisponibilidad oral, 1004, 1004f**
- Morfina glucuronidato, 1006, 1006**
- Motivo horquilla, 116f**
- Motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), 958**
- Motivo hélice-giro-hélice, 49, 49f, 894-895,
 894f**
- Motivos repetitivos, 82-83, 83f**
 homología de secuencia, 174, 175f
- Motor remodelador de la cromatina, 912,
 912f**
- Motores moleculares, 977-998. Véase también Proteínas motoras**
- Moudriamakis, Evangelos, 904**
- MreB, 986**
- mRNA (RNA mensajero), 107, 119-120, 119f.**
 Véase también RNA
 cola 3'poly(A), 841-842, 841f
 complementariedad con el DNA, 121-122,
 122f
- corte y empalme, 839
 elementos del respuesta al hierro, 916
 en la atenuación, 913-914
 en la síntesis de proteínas, 119, 126, 126f, 869-870.
 Véase también Traducción
 translocación, 873
 estructura en eucariotas, 879-880
- extremo 5', 840, 841f
- funciones, 119
- giros horquilla, 44, 44f, 123, 123f
 en la terminación de la transcripción, 829,
 829f
- policistrónico, 870
- precursor, procesamiento, 840-842, 840-843
- receptor de transferrina, 915, 915f
- traducción, 126, 126f
- mRNA policistrónico, 870**
- mRNA reductasa, en la regulación del colesterol, 742, 743**
- Mucopolisacáridosis, 313**

- Muerte celular programada
célula T, 970, 970f
mitocondrias, 535
zimógenos, 289
- Muller, Hermann, 807
- Mullis, Kary, 140
- Munjejak indio, genoma, 111, 111f
- Músculo
almacenamiento de energía, 619, 7767, 767t
cardíaco
 isozimas H y M, 283, 283f
metabolismo, 768
degradación de aminoácidos, 660-661
glicólisis, 452-454, 454f, 468
lesiones relacionadas con fármacos, 1012
metabolismo, 267-268
 en ayunas, 272-273
 intercambios con el hígado, 468, 468f, 661, 767, 768f
 triacilgliceroles, 619, 767t
- Mutación del agitador, 984
- Mutaciones
cambios en el marco de lectura, pruebas, 811
deleción, producción, 147
en la tecnología del DNA recombinante, 147-148
inserción, producción, 148
producción, 147-148, 147f, 148f
puntoales, producción, 148
somaticas, diversidad de anticuerpos, 953
sustitución de un par de bases, ensayo, 811
sustitución, producción, 147-148, 147f
- Mutaciones por cambios en el marco de lectura, pruebas, 811
- Mutagénesis
dirigido a un punto, en investigación de la catálisis, 251
en la tecnología del DNA recombinante, 147-148, 147f, 148f
- Mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, 147-148, 147f
- Mutagénesis dirigida a un centro, en investigación de la catálisis, 251
- Mutagénesis por crossover, 148, 148f
- Mutígenos, 805-806
- Mutanas, 444
- N**
- Na^+ , 927, 930-931
- NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido)
centros de unión en las deshidrogenasas, 448-449, 449f
en el catabolismo, 420, 420f
en el ciclo del ácido cítrico, 479-480, 490
en el metabolismo de ácidos grasos, 624, 625, 625f
en la glicólisis, 448-449
- NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido)
en el ciclo del ácido cítrico, 476, 476f, 479, 481-490, 492f
en el metabolismo de ácidos grasos, 624-625, 625f, 642-643
en la fosforilación oxidativa, 502
potencial de reducción, 506-508
- potencial de transferencia electrónica, 508-509
transporte, 527-528, 527f, 529f
en la glicólisis, 446-448
en la gluconeogénesis, 462
en la síntesis de ATP, 421, 565
etanol, 272
unidades ADP, 429, 429f
vs. NADPH, 585
- $\text{NADH-citocromo b}_1$ reductasa, 642-643, 643f
- NADH -deshidrogenasa, en la cadena respiratoria, 509-512, 509f-512f
- NADH-Q oxidoreductasa, en la cadena respiratoria, 509-512, 509f-512f
- NADP^+ (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido), 420, 421
como transportador de electrones, 421
en la biosíntesis reductora, 421
en la fotosíntesis, 552-553
en la ruta de las pentosas fosfato, 577, 578f, 583
- NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido), 420, 421
como dador de electrones, 261
como transportador de electrones, 421
en el ciclo de Calvin, 565-566, 566f, 572f, 575
en la biosíntesis reductora, 421, 565
en la fotosíntesis, 541, 542, 552-553, 554-557, 565-566, 575
en la hidroxilación de esteroides, 750-751
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 577-579, 580f, 583-587
vías requeridas, 577f
- Nariz. Véase también Olfato
anatomía, 923, 923f
electrónica, 926, 926f
- Nathans, Daniel, 136
- Neandertals, secuenciación del DNA, 178, 178f
- Neher, Erwin, 163
- Neuberg, Carl, 434
- Neuraminidasa, 322, 322f
- Neuroglobina, 197-198
- Neuropatía óptica hereditaria de Leber 534
- Neurotransmisores
conductos iónicos, 370-371
definición, 370
liberación, 347f
- Nexus (gap junction), 352, 373-374, 373f, 374f
- Niacina, 423, 423f
- Nicolson, Garth, 343
- Nicotinamida, síntesis, 700f, 701
- Nicotinamida adenina dinucleótido. Véase NAD^+ ; NADH
- Ninhidrina, 28, 28f
- Nirenberg, Marshall, 124
- Nitrogenasa, 681
 cofactor de hierro-molibdeno, en la fijación del nitrógeno, 681-683
- Nitrógeno, en amonio, 680. Véase también Amonio
- NMP quinasas. Véase Nucleótido monofosfato quinasas
- Nociceptores, 940
- NOESY (espectroscopía de intensificación nuclear Overhauser), 99-101, 100f, 101f
- NompC, 939
- Notación de Cleland, 223, 224
- Novobiocina, 292
- NTP. Véase Nucleótido trifosfato (NTP)
- NTPasas con bucle P, 220
 en proteínas G, 384, 385f
 en proteínas motoras, 978-982, 979f
 en microtúbulos, 990, 990f
 proteínas ABC, 358
- Nucleósido difosfato (NDP), 213
 fosforilación, 413
- Nucleósido difosfato quinasas, 413, 713
- Nucleósido difosfoquinasa, en el ciclo del ácido cítrico, 486
- Nucleósido fosforilasas, 725
- Nucleósido monofosfato (NMP), 213
 fosforilación, 413
- Nucleósido monofosfato quinasas, 236, 413, 713
 actividad catalítica, 267-270, 267f-270f
 estructura, 267, 267-268, 268f
 bucle P, 267-270, 267-270. Véase también Bucle P
- Nucleósido trifosfato (NTP), 213. Véase también NTPasas con bucle P
 hidrólisis, energía, 413
 NMP quinasas, 267-270, 267f
- Nucleósids, 109, 109
 nomenclatura, 710t
- Nucleosomas, 903-905, 903f, 904f
- Nucleotidasas, 725
- Nucleótidos, 108, 109-110, 110. Véase también Pares bases/base; Deoxirribonucleótidos; Nucleótidos de purina; Nucleótidos de pirimidina
azúcar, 314-315
definición, 209
funciones, 209
nomenclatura, 710t
síntesis, 209-228
 canalización del sustrato, 712, 716
 desoxirribonucleótido, 718-723, 724-725, 724f
 inosinato, 714, 716-717, 716f
 pirimidina, 710-714, 710f, 723
 purina, 714-717, 723-724, 724f
 regulación, 723-725
 rutas de novo, 710-714, 710f
 rutas salvajes, 710, 710f, 714-718
 trastornos, 725-727
transformación a aminoácidos. Véase Traducción
trastornos, 725-727
- Nucleótidos azucarados, 314-315
- Nucleótidos de purina, 109, 109
 degradación, 725-726, 725f
 derivados, 109, 109
 síntesis, 700-701, 714-718, 714f, 723-724
 Véase también Nucleótidos, síntesis de fosforilación, 715-717, 715f, 716f
 pasos, 714-717, 715f, 716f
- Número de enlace, 788f, 289
- Número de recambio (k_{ex}), 221, 221f
- NusA, en la terminación de la transcripción, 830-831
- Nutrición, 20-21, 21f. Véase también Dieta; Alimentación; Ayuno
 ciclo ayuno-alimentación, 770-772

O

Obesidad, 774-775

diabetes tipo 2, 774, 775

Óctano, células ciliadas, 937-939, 937f, 938f

Okazaki, Reiji, 796, 796f

Oleato, 328, 328, 643, 643

Olfato, 922-926, 929, 929f

deteriorado, 922

estructuras anatómicas, 923, 923f

evolución, 923-924, 923f, 924f

mecanismos combinatorios, 924-926

por ruido eléctrico, 926, 926f

receptores de TRPA, 923

receptores del olor, 923-926, 924f, 925f

transducción de señales, 923, 924-925, 924f

Oligomerización, en la activación de células B, 958-960

Oligopeptídos, 35. Véase también Péptidos

Oligosacáridos, 310. Véase también Disacáridos; Monosacáridos

abreviaturas, 316b

en gangliósidos, 738, 738f

en glicoproteínas, 316-320

enlace N-, 316, 316f, 318, 319

enlace O-, 316, 316f, 318

formación, glicosiltransferasas, 314, 314-315
secuenciación, 319-320

Oligosacáridos conectados por N-, 316, 316f, 318, 319

Oligosacáridos enlazados por O-, 316, 316f, 318

Olor, 922-926. Véase también Olfato

Onoprazol, 1018, 1018

Onogenes, 400

Operón fenilalanina, 914, 914f

Operón histidina, 914, 914f

Operón lac, 897-899, 897-899f, 900.
Véase también lacOperón lactosa, 897-899, 897-899f, 900.
Véase también lac

Operón treonina, 914, 914f

Operón triptófano, 913-914

Operón trp, 913-914

Operón(es), 897-900

estructura, 897, 897f

Opsina, 932-933

Organismos ureotílicos, 661, 666

Organismos uricotílicos, 666

Origen de la replicación

en bacterias, 801, 801f

en eucariotas, 802-803

Orina

como agente blanqueante, 663b

producción, 768-769

Ornitina, 662, 662

Ornitina transcarbamilasa, 662

deficiencia, 665

Ornato, 712, 712

Orotidilato, 712-713, 713

Orotidilato descarboxilasa, 713

Ornifosfato

en la gluconeogénesis, 463

estructuras resonantes, 415, 415f

Orotílogos, 165, 166f

Osteoartritis, 313

Osteomalacia, 755

Oster, George, 525

Oxalacuato, 124

en el ciclo de Calvin, 575-576, 575f

en el ciclo de la urea, 663, 663f

en el ciclo del ácido cítrico, 476, 476f, 477,

482, 483, 483f, 487-488, 492-493, 493f,

631

en el ciclo del glucosílico, 496, 496f

en la degradación de aminoácidos, 668

en la gluconeogénesis, 458, 451, 452-453, 463f

en la síntesis de aminoácidos, 668

síntesis, 425-426, 426

transferencia desde la mitocondria al

cito plasma, 638-639

Oxidación, de compuestos xenobióticos, 1006-1007**Oxido nítrico**

en la señalización, 202

síntesis, 702, 702f

Oxido nítrico sintasa, 202**Oxidoescualeno ciclaza, 742****Oxidoereductasas, 237****Oxigenación, en la degradación de aminoácidos, 671-672****Oxigenasas**

en la degradación de aminoácidos, 671-672

función mixta, 672, 750

Oxigenasas de función mixta, 671, 750**Oxígeno**

afinidad de la hemoglobina, 190-192, 191f

en la hidroxilación de esteroides, 750-751

liberación de la hemoglobina, 187-188, 188f,

192-194, 193f

dióxido de carbono, 193-194, 193f, 194f

presión parcial, 187

producción fotosintética, 548-550, 550f

reactivo. Véase Especies reactivas del oxígeno (ROS)

saturación fraccional, 187-188

unión de la hemoglobina, 183-192. Véase

también Hemoglobina, unión del oxígeno

por

unión de la mioglobina al, 184-186, 185f-187f, 187

Oximioglobina, 184, 185. Véase también**Mioglobina****S-Oxoguanina, mutagenicidad, 805-806, 806f****P**

p53, 810

P680, 549-550, 549f

P700, 552

P960, 546

PALA (*N*-fosfatocetil-L-aspartato), 277, 277, 278-280

Palmitato, 328, 328

oxidación, 625-626, 626f

síntesis, 638

Palmitoil-CoA, 625-626, 641

en la síntesis de esfingolípidos, 736, 737

Palmitoleato, 643, 643

oxidación, 626, 626f

Palmitoleilcisteína, 340, 340

Palmitoleil-CoA, 626, 626

Pamaquina, anemia hemolítica, 586

PAMP (modelo molecular asociado a patógenos), 946-947, 947f

Páncreas

expresión de genes, 892, 893f

respuesta autoinmune, 921f

trasmisos de. Véase Diabetes mellitus

Papaína, 206-212

Papilas gustativas, 927

Par especial, 546

Par redox,

potencial redox, 506, 507f

Paradeja de Levinthal, 35-36

Parálogos, 165, 166f

Paracuat, 560

Pardee, Arthur, 277

Pares de bases de Watson-Crick. Véase

Bases/pares de bases

Pares MotA-MotB, 994, 994f, 995f

Park, James, 233, 1010

Parnas, Jacob, 434

Partícula básica del nucleosoma, 904

Partícula de reconocimiento de señal (SRP), 120, 881-882, 881f, 882f

receptor, 881-882

Partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNPs), 822, 844-845, 845f, 845t

en el corte y empalme, 844-845, 845f, 845t

Paso comprometido, 454, 697

Pasteur, Louis, 434

Pauling, Linus, 40, 185, 194, 212b, 231

PCR. Véase Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

PerA helicasa, 797, 797, 797f

Pectina, 312, 312f

Penicilina

descubrimiento y desarrollo, 1009-1010

estructura, 1009, 1009

mecanismo de acción, 233-234, 233f-234f, 1009f, 1010

resistencia, 1022

Penosas, 304-305, 305f, 306-308

Pepsina, 650

Péptidos. Véase también Proteínas)

definición, 35

sintético, 90-91, 91f-93f

solapamiento, 81, 81f

Peptidoglicanos, 233, 233f

Péptidos solapados, 81, 81f

Percepción de la luz. Véase Visión

Percepción de la temperatura, 940

Perfección cintética, 222

Perforina, 965, 965f

Perlipina A, 621

Periplasma, 346

Peroxisomas, en el metabolismo de los ácidos

grasos, 620, 631f

Perutz, Max, 186

Peso corporal, regulación, 274-275

Peso, regulación, 274-275

Pez soprador, genoma, 1151, 1151f

pH

afinidad por el oxígeno de la hemoglobina, 192-193, 192f

cálculo, 14-15

definición, 14

fisiológico, 17

tiempos, 16-17

Pigmentos

- Pigmentos (continuación)
 accesorios, en la fotosíntesis, 557, 557f, 559f
 visuales, 936, 936f. Véase también Visión del color
 en los bastones, 932
 en los conos, 935
- Pinopsina, 936, 936f
- PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfósforo), en la transducción de señales, 394, 394
- PIP₃ (fosfatidil-3,4,5-trifósforo), en la transducción de señales, 394, 394
- Pirámide de alimentación, 21f
- Piranosa, 306-308, 307f
- Piridoxal fosfato (PLP), 650
 en el metabolismo del glucógeno, 596-598, 597f
 en la degradación de aminoácidos, 657, 657-658, 657f
 en la síntesis de aminoácidos, 686-687, 686f
- Piridoxamina fosfato, 658, 658, 687
- Piridoxina (vitamina B₆), 423, 423f, 657
- Pirimidina fosforribosiltransferasa, 713
- Pirimidina nucleótidos, 109, 109
 síntesis, 710-714, 710f, 723. Véase también Nucleótidos, síntesis de
- Pirimidina(s), 109, 109
 derivados, 109, 109
 síntesis, 700-701
 -aspartato transcarbamiloasa, 706-707, 712
- Pirofosfato, hidrólisis, 604-605, 623
 en el metabolismo de ácidos grasos, 623
- 5-Pirofoscármelato, 740, 740
- Δ₁-Piroolina 5-carboxilato, en la síntesis de prolina, 688
- Piruvato, 223
 conversión a acetil-coenzima A, 478-481, 478f
 destino metabólico, 446-448, 446f, 766, 766f
 en el ciclo de Cori, 468, 468f, 661
 en el ciclo del ácido cítrico, 478-481
 en el ciclo glucosa-alanina, 661, 661f
 en el transporte de nitrógeno, 661-662, 662f
 en la degradación de aminoácidos, 661, 661f, 666-668
 en la formación del etanol, 446-447, 446f
 en la glicolisis, 433, 444-446, 444f-446f
 en la gluconeogénesis, 433, 458-461
 en la síntesis de aminoácidos, 686
 formación, 666-667, 667f
 síntesis del oxalacetato, 425-426, 426
- Piruvato-carboxilasa
 en el ciclo del ácido cítrico, 493-494
 en la gluconeogénesis, 460
- Piruvato descarboxilasa, 446
- Piruvato quinasa, en la glicólisis, 446, 763
 en el hígado, 456, 456f
 en el músculo, 454
- Piruvato-P_i quinasa, en la ruta de las C₄, 576
- Pistola de genes, 158
- pK_a valores, A2
- PKF. Véase Fosfofructoquinasa (PFK)
- Placa aterosclerótica, 747, 747f
- Placas, en la investigación de genotipos, 146, 146f
- Placas amiloides, en la enfermedad de Alzheimer, 54
- Plantas
 almidón, 573
- C₃, 576
- C₄, 575-576, 575f
- ciclo del glicoxilato, 495-497, 496f
- fijación del nitrógeno, 680-684
- fotosíntesis. Véase Fotosíntesis
- ingeniería genética, 157-158, 158f
- lectinas, 321, 321f
- metabolismo ácido en las erasuláceas, 577, 577f
- síntesis de sacarosa, 573, 573f
- tropicales, fotosíntesis, 575-576
- Plásmido pBR322, 143-144, 144f
- Plásmido pUC18, 144, 144f
- Plásmido(s)
 en resistencia a fármacos, 1022
 inductor de tumores, 157-158, 157f
 pBR322, 143-144, 144f
 pUC18, 144, 144f
- Plásmidos T₁, 157-158, 158f
- Plusmina, 292
- Plasmodium falciparum*, genoma mitocondrial, 504
- Plastocianina, 551, 560
- Plastoquinol, 548, 548, 551
- Plastoquinona, 548, 548, 549, 550f, 559-560
- Plegamiento, proteína. Véase Proteína(s).
 plegamiento de
- Plegamiento de globina, 186
- Pliegue de Rossmann, 449, 449f, 487, 487f
- Pliegue del soporte al ATP, 711
- Pliegues en inmunoglobulinas, 952-953, 952f
- PLP. Véase Piridoxal fosfato (PLP)
- Polarización de membrana, potencial de acción, 362
- Polianfolitos, en isoelectroforesis, 23
- Polygonactinasa, 158
- Polimorfismo, definición, 137b
- Poliribosomas, 870, 870f
- Polisacáridos, 311-313, 311f-314f
 alhucelaturos, 316b
 almidón, 311-312, 312f
 celulosa, 312
 glucógeno, 311-312, 312f
- Polisomas, 870, 870f
- Porfiria citropoyética congénita, 704-705
- Porfiria intermitente aguda, 705
- Porfirias, 704-705
- Porfirinas
 síntesis, 702-704, 703f
 trastornos, 704-705
- Porfobilindígeno, 703, 703
- Porfobilindígeno desaminasa, 703
- Porinas mitocondriales, 504
- Porinas, 481-492, 488, 117-138, 338f
 mitocondrial, 504
- Poros, del núcleo, 346
- Poros nucleares, 346
- Potencia del movimiento, en la miosina, 987-988
- Potencial de fosforilación, 478-479
- Potencial de membrana, 353, 362
 acción, 362, 362f, 372-373, 372f
 generación, 373, 373f
- ecuación de Nernst, 372
- electroquímico, 353
- generador de corriente, 373
- Potencial de oxidación-reducción, 506-508, 507f
- Potencial de reducción
 en la fosforilación oxidativa, 506-509
 medida, 506, 506f
- Potencial de transferencia del grupo fosforilo, 415-416, 416f, 416f
- Potencial de transferencia electrónica, 506
 en la fosforilación oxidativa, 506-508
- Potencial del equilibrio, 372-373, 372f
- Potencial electroquímico. Véase Potencial de membrana
- Potencial redox. Véase Potencial de reducción
- Potenciales de acción, 362, 362f, 372-373, 372f
 conductos iónicos, 362, 362f, 372-373, 372f
 equilibrio, 372-373, 372f
 generación, 373, 373f
- pppA, 827, 827
- pppG, 827, 827
- Precipitación salina, 68, 75, 75f
- Prefenato, 694, 695
- Pregnenolesa
 corticosteroides, 252
 estructura, 753
 progesterona, 752
 síntesis, 752
- Pre-mRNA, procesado, 840-846, 841f
 corte y empalme, 843-848, 844f-846f. Véase también Corte y empalme
- Pre-rRNA, procesado de
 en bacterias, 832
 en eucariotas, 839-840, 840f
- Presión, sensación, 939
- Pre-tRNA, procesado de
 en bacterias, 840, 841f
 en eucariotas, 840, 841f
- Primaria, 795, 795f
- Primera ley de la termodinámica, 11. Véase también Termodinámica
- Principio de conformación específica de secuencia, 51
- Priones, 53-54, 54f
- Procariontes, 3. Véase también Bacterias
- Procedimiento analítico de alto rendimiento, 1013
- Procesado del RNA, 128. Véase también Transcripción
 en bacterias, 832
 en eucariotas, 839-848
 del pre-rRNA, 839-840, 840f
 del tRNA, 840, 841f
 RNA polimerasa I, 839-840, 840f
- Proceso auditivo, 917-919
- Procolagenasa, 289
- Procolágeno, 289
- Proenzimas. Véase Zimógenos
- Progesterona, síntesis, 749, 749f
- Progesterona
 aldosterona, 752
 cortisol, 752, 753f
 síntesis, 752, 753
- Proinsulina, síntesis de bacterias, 152-153, 153f
- Prallhidroxilasa, 779
- Prolina
 estructura, 28-29, 29f
 grupos hidroxilo, 46, 52, 52-53
 síntesis, 688, 688f

Prolina racemasa, inhibición, [331-333](#), [331f](#)
 Promotor de falta de nitrógeno, [826](#), [826f](#)
 Promotor de la base, [825](#)
 Promotor del choque térmico, [826](#), [826f](#)
 Promotores, [122](#), [122f](#), [823](#)
 bacterianos, [823](#), [824-825](#), [825f](#)
 de choque térmico, [826](#), [826f](#)
 de privación del nitrógeno, [826](#), [826f](#)
 eucarióticos, [835-839](#), [835f](#)
 para la RNA polimerasa I, [835](#), [835f](#)
 para la RNA polimerasa II, [835](#), [835f](#),
 [836-839](#)
 para la RNA polimerasa III, [835-836](#), [835f](#)
 secuencias de reconocimiento, [902](#)
 PROP (6-*w*-propil-2-tiouracilo), [928](#)
 Propiedades ADME, de fármacos, [1003-1008](#),
 1004f
 6-*n*-Propil-2-tiouracilo (PROP), [928](#)
 Propionil-CoA, [627](#), [627-628](#)
 conversión a succinil-CoA, [627-628](#), [627f](#)
 Propionil-CoA, [669](#), [669](#), [670](#)
 Propulsor de giros, [786](#), [786f](#)
 Prostaciclinas, [643-644](#), [643f](#), [644](#)
 Prostaglandinas, [643-644](#), [643f](#), [644](#)
 Prostaglandina E₂, [643](#), [644](#)
 Prostaglandina H₂ sintasa-1, [338](#), [339](#), [339f](#)
 Prostaglandina H₂, [337](#), [337f](#), [338](#), [338f](#), [643](#),
 643f
 Proteasas
 centros activos, [175](#), [175f](#), [246](#)
 evolución convergente, [175](#), [175](#)
 de aspártico, en la escisión del enlace
 peptídico, [251](#), [252](#), [252f](#)
 de cisteína, en la escisión del enlace peptídico,
 [251](#), [251-252](#), [252f](#)
 de ion metálico, en la escisión del enlace
 peptídico, [251](#), [252f](#), [253](#)
 de serina, en la escisión del enlace peptídico,
 [243-251](#)
 en la escisión del enlace peptídico, [243-251](#)
 Véase también Enlaces peptídicos.
 ruptura
 en los carbohidratos, [320](#)
 especificidad, [248](#), [248f](#)
 mutagénesis dirigida a un centro, [250-251](#), [250f](#)
 Proteasas de zinc, [251](#), [252f](#), [253](#)
 Proteasoma 20S, [653](#), [653f](#)
 Proteasomas, [653-655](#), [653f](#), [654f](#), [961-962](#).
 Véase también Degradación de
 aminoácidos
 eucariótico, [653-655](#), [655f](#)
 evolución, [655](#), [655f](#)
 procariótico, [655](#), [655f](#)
 Protein Data Bank, [61](#), [101](#)
 Proteína A de replicación, [802](#)
 Proteína activada por canabinol (CAP), [900-901](#),
 900f, [901f](#)
 Proteína activadora de la escisión de SREBP
 (SCAP), [742](#), [743f](#)
 Proteína con Fe, en la fijación del nitrógeno, [681](#),
 681-683
 Proteína de hierro, en la fijación del nitrógeno,
 681, [681-683](#)
 Proteína de molibdeno-hierro, [682](#), [682-683](#)
 Proteína de resistencia a multifármacos (MDR),
 [358](#), [358f](#)

Proteína de respuesta a CAMP (CRP), [900-901](#),
 900f
 Proteína de unión al elemento de respuesta al
 hierro (IRP), [915-916](#), [916f](#)
 Proteína del choque térmico, [70](#), [173-174](#), [174](#)
 α-Proteína estabilizante de α-hemoglobina, [197](#),
 197f
 Proteína fluorescente verde, [58](#), [58f](#), [59](#)
 Proteína fosfatasa 1, en el metabolismo del
 glucógeno, [603-604](#), [608-610](#), [609f](#)
 Proteína fosfatases, [285](#)
 Proteína MDR (resistencia a multifármacos), [348](#),
 358f
 Proteína que enlaza una sola cadena, [290](#)
 Proteína que une al elemento regulador del
 esterol (SREBP), [742-743](#), [743f](#)
 Proteína quinasa A
 en la transducción de señales, [386](#), [389](#)
 en el metabolismo del glucógeno, [601](#), [602f](#),
 603
 estructura, [288](#), [288f](#)
 regulación, [287](#), [287f](#)
 unión del sustrato, [288](#), [288f](#)
 Proteína quinasa C, en la transducción de
 señales, [388-389](#), [389f](#)
 Proteína quinasa dependiente de AMP, [640-641](#),
 743
 Proteína quinasa dependientes de calmodulina,
 391
 Proteína quinasa(s)
 dedicadas, [286](#)
 dependientes de calmodulina, [391](#)
 dependientes de ciclina, [303](#)
 en la fosforilación, [284-287](#)
 en regulación de enzimas, [284-289](#)
 en señales de transducción, [284-285](#), [285f](#),
 [386](#), [388-389](#), [389f](#), [390](#)
 especificidad, [286-287](#)
 multifuncional, [286](#)
 regulación, cAMP, [287](#), [287f](#)
 serina, [284-285](#), [285f](#), [285t](#)
 timosina, [284-285](#), [285f](#)
 en el cáncer, [400](#)
 treonina, [284-285](#), [285f](#), [285t](#)
 Proteína quinases dependientes de ciclina, [303](#)
 Proteína tirosina quinasa, [284-285](#), [285f](#), [392](#)
 en el cáncer, [400](#)
 receptor, [392](#)
 Proteína(s). Véase también Péptidos
 acetilación de [32](#)
 adaptadoras, [394](#)
 en la transducción de señales, [394](#), [397](#)
 agregada, en enfermedades neurológicas, [53](#)-
 [55](#), [54f](#)
 alotérmicas, [275](#), [276-282](#). Véase también
 Enzimas alotérmicas
 aminoácidos de. Véase Aminoácido(s)
 buclees omega, [44](#), [44f](#)
 cadenas polipeptídicas, [34-36](#), [35f](#), [36f](#), [37-40](#)
 clasificación, en el complejo de Golgi, [318](#), [318f](#)
 codificación de genes, [19](#)
 como polímeros lineales, [34-36](#)
 conformación helice al azar, [50-51](#), [51f](#)
 definición, [35](#)
 degradación, [649-676](#). Véase también
 Degradación de aminoácidos
 desnaturalizada, [51](#), [51f](#), [55](#), [55f](#)
 despliegamiento, [51](#), [51f](#), [55](#), [55f](#)
 dieta, digestión y absorción, [243-248](#), [289-292](#),
 289f, [289f](#), [650](#), [650f](#). Véase también
 Degradación de aminoácidos
 enlaces peptídicos, [34](#), [34f](#), [37-38](#), [37f-39f](#)
 escisión, [50](#), [59](#), [80-82](#), [80f-82f](#), [81f](#)
 estructura, [26](#), [3](#)
 cuaternaria, [49-50](#), [49f](#), [50f](#)
 modelos, [22](#), [23f](#), [61-62](#), [61f](#), [62f](#)
 primaria, [34-40](#). Véase también Secuencias
 de aminoácidos
 secuencias de aminoácidos, [25](#), [26f](#), [47-50](#)
 secundaria, [40-46](#), [40f](#)
 supersecundaria, [49](#), [49f](#)
 terciaria, [46-49](#), [47f-49f](#), [173-174](#). Véase
 también Proteína(s), plegamiento de
 estudios experimentales de. Véase Estudios de
 proteínas
 etiquetado de anticuerpos, [82](#)
 evolución, [129](#)
 flexibilidad, [26](#), [26f](#)
 función, correlación estructural, [25](#), [26f](#), [47-50](#)
 giros inversos, [44](#), [44f](#)
 glicosilación, [316-320](#)
 centros, [317-318](#), [320](#)
 trastornos congénitos, [318-319](#)
 grupos funcionales, [25-26](#)
 hélice α, [40-42](#), [41](#), [41f](#), [42](#), [42f](#)
 hemoglobina como modelo, [183-201](#). Véase
 también Hemoglobina
 hidroxilación, [30](#), [31f](#), [57-58](#)
 hoja β, [42-44](#), [42f-44f](#)
 identificación, [66](#)
 métodos inmunológicos, [84](#)
 ingeniería genética, [148](#), [148f](#)
 lisosómica, [880](#)
 masa, [35](#)
 medida de
 electroforesis, [21](#), [73f](#)
 espectrometría de masas, [92-93](#), [94f](#), [95f](#)
 membrana. Véase Proteínas de membrana
 metabolismo, [419f](#)
 modelos moleculares, [22](#), [23f](#), [61-62](#), [61f](#), [62f](#)
 modificacón covalente, [57-58](#), [57f](#), [283-284](#),
 283-288, [284f](#), [762](#), [762f](#). Véase también
 Fosforilación
 modificación postraducción, [57-59](#), [58f](#)
 naciente, [83](#)
 peso molecular, [35](#)
 plegamiento, [18-19](#), [19f](#), [39-40](#), [47-49](#), [53-57](#)
 desnaturalización, [51](#), [51f](#), [55](#), [55f](#)
 en estructuras regulares, [40-46](#)
 errores, en enfermedades neurológicas, [53](#)-
 54
 hidrofobicidad, [48](#), [48f](#)
 intermediarios, [55-57](#), [56f](#)
 modelo de nucleación-condensación, [56-57](#)
 paradoja de Levinthal, [55-56](#)
 pasos, [56-57](#), [56f](#)
 predicción, [57](#)
 protein [20](#) de choque térmico, [173-174](#),
 174f
 selección acumulativa, [53-56](#)
 transición cooperativa, [55](#)
 propiedades, [25-26](#)

- Proteína(s) (continuación)
- que atraviesan la membrana, 880
 - regulación de
 - fosforilación, 284-287. Véase también Fosforilación
 - modificación covalente, 284t
 - ribosómica. Véase también Ribosoma(s) en la traducción, 869
 - rígidez, 26, 26f
 - secretora, 880
 - secuencias señal, 83
 - semejanza entre, 23, 2f
 - síntesis de. Véase Traducción iniciación, 126
 - mRNA, 119, 126, 126f
 - sintética, 90-93, 91f-93f, 148, 148f
 - subunidades, 49-50, 49f
 - superhelicoides, 45, 45f
 - translocación, 880-883
 - unidades carbohidrato, 38, 316-320. Véase también Glicoproteínas
 - vida media, 651, 651t
- Proteína(s) G, 384-391
- activacifén, 384-388, 388f
 - ATP sintasa, 527
 - definición, 923
 - en el cólera, 401-402
 - en el gusto, 927-930
 - de amargura, 927-929
 - de dulzura, 929-930
 - en el metabolismo del glucógeno, 601-603
 - en el olfato, 923
 - en la fosferina, 401-402
 - en la traducción, 876-877
 - en la transducción de señales, 384-391. Véase también Transducción de señales
 - en la visión, 932-934, 934, 934f
 - estructura, 384, 385
 - heterotrimérica 384-391
 - NTPasas con bucle P, 384, 385f
 - pequeña, 398-399, 398t
 - reajuste, 387
 - subunidades, 385
- Proteínas activadoras de GTPasa (GAPs), 399
- Proteínas adaptadoras, en la transducción de señales, 394, 397
- Proteínas de hierro-azufre, 484
- en la fijación del nitrógeno, 681-683
 - en la fosforilación oxidativa, 511, 513
- Proteínas de membrana
- alfa hélice, 337, 338-339, 339f, 340-341, 341f, 341t, 342f
 - anclaje en membrana, 340f
 - bacteriorrodopsina, 337, 337f, 338f
 - bomba. Véase Bombas de iones
 - cadenas beta, 337-338, 338f
 - cantidades, 336
 - conducto. Véase Conductos de membrana
 - electroforesis en gel de SDS-poliacrilansida, 336, 336f
 - estructura, 336-337, 337f
 - funciones, 336
 - hidrofobicidad, 48-49, 48f
 - integral, 336, 336f
 - interacción con membrana, 338-340
 - periférica, 336, 336f
 - prostaglandina H₂, 337, 337f, 338f
 - representaciones hidrográficas, 341, 342f
 - solubilidad, 336
 - transportador. Véase Transporte en membrana; Transportadores
- Proteínas de unión a cajas TATA (TBP), 837-838, 838f, 911-912
- motivos repetitivos, 174, 175
- Proteínas de unión al DNA, 893-901. Véase también Factores de transcripción
- cremallera básica de leucina, 895, 895f
 - dominios de mano de zinc, 895-896, 895f
 - emparejamiento con centro regulador, 893-894, 894f
 - en eucariotas, 895-896, 895f, 896f
 - en procariotas, 893-895, 894f, 896-901
 - homeodomelos, 895, 895f
 - inhibición de la transcripción, 897-900
 - represor de metionina, 895, 895f
- Proteínas del complejo de histocompatibilidad principal, 961-970
- clase I, 961-965, 962f, 968
 - clase II, 966-969, 966f
 - diversidad, 968-969
 - en rechazo de trasplantes, 968
 - estructura, 967, 964f
 - presentación peptídica, 961-963, 961f, 962f
 - receptores de células T, 963-967, 964f. Véase también Receptores de células T
- Proteínas desacoplantes, 531, 533f
- Proteínas desnaturadas, 51, 51f
- Proteínas enrolladas en espiral, 45, 45f
- Proteínas G pequeñas. Véase también Proteínas G en la transducción de señales, 398-399, 398f
- Proteínas integrales de membrana, 336, 336f
- Proteínas lisosómicas, 880
- Proteínas MHC clase I, 961-965, 962f, 968. Véase también Proteínas del complejo de histocompatibilidad principal
- Proteínas MHC clase II, 966-969, 966f
- Proteínas motoras, 977-998
- dineína, 978, 980, 980f
 - estructura, 979-982, 979f-982f
 - miosina, 977-989. Véase también Miosina
 - quinesina, 978, 980-982, 991, 993
 - superfamilia NTPasa con bucle P, 977-982
 - unión de ATP, 980-982, 980f-982f
 - visión global, 977-978
- Proteínas nacientes, 83
- Proteínas periféricas de membrana, 336, 336f
- Proteínas que atraviesan la membrana, 880
- Proteínas que forman capas, 883
- Proteínas secretoras, 880
- Proteínas SNARE, 347, 383
- Proteínas TIR, como receptores del sabor dulce, 929-930, 930f
- Proteínas T2R, como receptores del sabor amargo, 928-929
- Proteínas transportadoras de aceite (ACPs), en el metabolismo de ácidos grasos, 635, 635-637
- Protenglicanos, 312-313, 313f
- Proteomas, definición, 66
- Protones químicos, 517f
- Protooncogenes, 400
- Protoplastos, 158, 232-233
- Protoporfirina, 184, 184-185
- Protoporfirina IX, 703, 704
- Protrombina, 294f, 295, 295f
- unión del calcio, 296
- Provitamina D, 754, 754
- Proyecciones de Fisher, 22, 22f, 23f, 304, 304f
- Proyecciones de Haworth, 307
- PRPP. Véase 5-Fosforibosil-1-pirofósforato (PRPP)
- Pruebas con animales, en el desarrollo de fármacos, 1008-1009
- Pruebas de DNA, 83, 137, 139-140
- aproximación en fase sólida, 139-140, 139f
 - generación de 139, 146-147
 - para la genoteca, 146-147, 147f
- Prusiner, Stanley, 53
- Pseudogenes, 150
- Pseudouridilato, 832, 832
- Psicosis, 305, 306f
- Psoraleno, 843
- Puente peróxido, en citocromo c oxidasa, 516, 516f
- Puentes salinos, liberación del oxígeno a partir de la hemoglobina, 192-193, 193f
- Palmones, transporte de oxígeno, 187-188, 193-194, 194f
- Punto isoeléctrico, 23
- Purificación de proteínas, 65, 66-78
- análisis cuantitativo, 74-75, 75f, 75t
 - anticuerpos monoclonales, 87
 - anorradiografía, 72
 - centrifugación diferencial, 67-68, 68f
 - centrifugación en gradiente, 77, 77f
 - concentración de proteínas, 67
 - chromatografía de afinidad, 70, 70f
 - chromatografía de filtración en gel, 69, 69f
 - chromatografía de intercambio iónico, 69-70, 69f, 78, 78f
 - cromatografía líquida de alta resolución, 71, 71f
 - diálisis, 69, 69f
 - electroforesis bidimensional, 47f, 74
 - electroforesis en gel, 71-73, 71f-73f
 - ensayos, 67
 - fraccionamiento, 67-68, 68f
 - homogenización, 67, 75t
 - isoelectrofoque, 73, 73f
 - con SDS-PAGE, 47f, 74
 - precipitación salina, 68, 75, 75f
 - SDS-PAGE, 73, 73f, 75, 75f
 - con isoelectrofoque, 74, 74f
 - técnica de sedimentación en el equilibrio, 77-78
- Paromicina, 884, 884, 884f
- Q**
- Q (coenzima Q), 509, 510, 510f
- Q_A, 546-547, 547f, 549
- Q_B, 546-547, 547f, 549
- Q-citocromo c oxidoreductasa, 509, 509f, 509t, 512-513, 513f
- QH₂, 546-547
- Queratansulfato, 313, 313
- α-Queratina, hélices α, 45, 45f, 45f
- Quilomicrones, 620, 620f, 744, 744f

- Química combinatoria, en estudios de evolución, [178-179](#)
en el desarrollo de fármacos, [1013](#). Véase también Desarrollo de fármacos
- Quimioatrayentes, [995](#)
Quimiorrepelentes, [995](#)
Quimiotaxis, [995-996](#), [996f](#)
Quimioterapia, cáncer, resistencia, [1022-1023](#)
- Quimiotrófos, [410](#)
Quinotripsina, [175](#), [176](#), [243-248](#)
catalisis covalente, [241-248](#)
intermediarios acileñizina, [245](#), [247f](#)
isómeros tetraédricos, [246-247](#), [247f](#)
proceso en dos etapas, [244-245](#), [245f](#), [147f](#)
centros activos, [175](#), [175f](#), [246](#)
en la escisión del enlace peptídico, [247f](#)
especificidad, [244](#), [248](#), [248f](#)
estructura, [244](#), [245](#), [246](#), [248](#), [249f](#)
homólogos, [248-249](#), [249f](#)
inhibición, [56f](#), [209-230](#), [230f](#)
preferencias de sustrato, [222](#), [223](#)
residuo de serina, [243-244](#), [244f](#)
tríada catalítica, [245-248](#)
triptamina, [248](#), [249f](#)
- Quintotriptosinógeno, [245-246](#), [289-290](#)
- Quinasa, [2](#) del receptor de proteína G (GαK_i), [387](#)
Quinasa del receptor β-adrenérgico, [387-388](#)
Quinasa que regula señales extracelulares (ERK), [404](#)
- Quinasa(s). Véase también tipos específicos
ajuste inducido, [437](#), [437f](#)
cierre de la hendidura inducida por el sustrato, [437](#), [437f](#)
definición, [437](#)
en la fosforilación, [437](#)
magnesio, [268-269](#), [269f](#), [437](#)
propiedades y actividad, [437](#)
- Quiminas lípidicas, en la señalización de insulina, [304](#)
- Quinesina, [978](#)
convencional, [980](#)
trastornos, [982](#)
estructura, [980](#), [980f](#)
hélice transitoria, [981-982](#), [982f](#)
mitocondria, [978](#)
movimiento a lo largo de los microtúbulos, [991-993](#), [991f](#), [992f](#)
unión del ATP, [981-982](#), [982f](#), [992](#), [992f](#)
- Quinina, [927](#)
sabor, [927-928](#)
- Quinonas
en la fosforilación oxidativa, [509](#), [510](#), [510f](#)
en la fotosíntesis, [545-546](#)
- Quinureno, [672](#), [672](#)
- Quiralidad, [27](#)
de aminoácidos, [28](#), [28f](#), [686-687](#)
- R
R⁺ (metarrodopsina II), [933-934](#), [934f](#)
- Radiación, mutagenicidad, [807](#)
- Radical 4'-desoxiadenosilo, [628-629](#), [629f](#)
- Radical tirosilo, [718-720](#)
- Radicales libres. Véase Especies reactivas del oxígeno (ROS)
- Raloxifeno, [910](#), [910](#)
- Ramachandran, Gopalasamudram, [39](#)
- Ranitidina, [1017](#), [1017](#)
- Raquítismo, [254-255](#)
- Ras
en la transducción de señales, [397-399](#), [398f](#)
farnesilación, [284](#), [284f](#)
- Rasgo falciforme, [195-196](#), [196f](#)
- Ratón, transgénico, [155](#), [155f](#)
- Reacción de la polimerasa en cadena (PCR), [140-142](#), [140f-142f](#)
en la amplificación del DNA antiguo, [147](#), [178](#), [178f](#)
- procedimiento, [140-141](#), [140f](#)
- usos, [141-142](#)
- Recetor(es)
acoplada, termodinámica, [411-412](#), [413-415](#)
acopladas, [425-426](#)
anabólica, [411](#)
anaplerótica, [494](#)
bimolecular, [216-217](#)
bisustrato, [223](#)
cambio de energía libre, [12](#), [208-210](#)
catabólica, [411](#), [417-420](#)
transportadores electrónicos, [420-421](#)
- catalísis de. Véase Catálisis; Enzima(s) catalizada por enzima. Véase Catálisis;
Enzima(s)
catalizada por liasa, [422](#)
doble desplazamiento (ping-pong), [224](#)
electrocíclica, [694](#)
endergónica, [208](#)
energía de activación, [12](#), [208](#), [212](#)
estado de transición, enzimas, [211-212](#), [212f](#), [214](#)
exergónica, [208](#)
interconectadas, [410-412](#), [410f](#)
metabólica, [410-412](#). Véase también
Metabolismo
modificación química, [244](#)
notación de Cleland, [223](#), [224](#)
oxidación-reducción, [425](#), [425f](#)
cambio de energía libre, [507-508](#)
en el metabolismo, [425](#), [425f](#)
potencial de reducción, [506-508](#), [507f](#)
- primer orden, [216-217](#)
- secuencial, [223-224](#)
- segundo orden, [216-217](#)
- sustrato múltiple, [223-224](#)
- termodinámica, [208-211](#)
transferencia de grupo, [418](#), [425f](#), [426](#)
- Reacciones ácido-base, [14-17](#)
interrupción de la doble hélice, [15-16](#)
- tampones, [16-17](#), [16f](#), [17f](#)
- Reacciones acopladas, en el metabolismo, [425-426](#), [425f](#)
- Reacciones anapleróticas, [494](#)
- Reacciones bisustrato, [223](#)
- Reacciones catalizadas por liasa, [422](#)
- Reacciones de doble desplazamiento, [224](#)
- Reacciones de modificación química, [244](#)
- Reacciones de oxidación-reducción
cambio de energía libre, [507-508](#)
en el metabolismo, [425](#), [425f](#)
potencial de reducción, [506-508](#), [507f](#)
- Reacciones de primer orden, velocidad, [216-217](#)
- Reacciones de pseudo primer orden, [217](#)
- Reacciones de segundo orden, [216-217](#)
velocidad, [212](#)
- Reacciones de transferencia de grupo, [426](#). Véase también Transferencias del grupo fosforilo
- transportadores activos, [420-425](#), [420f](#), [421f](#)
- Reacciones electrocíclicas, [694](#)
- Reacciones endergónicas, [208](#)
- Reacciones exergónicas, [208](#)
- Reacciones lumínicas, [541](#), [542](#), [542f](#), [548-561](#).
Véase también Fotosíntesis
en el fotosistema I, [542](#), [548](#), [548f-551f](#), [551-553](#)
- en el fotosistema II, [542](#), [548-551](#), [548f](#), [551f](#), [552](#)
- Reacciones oscuras, de la fotosíntesis, [541](#), [542](#), [565-577](#). Véase también Ciclo de Calvin; Fotosíntesis
- Reacciones Ping-Pong, [224](#)
- Reacciones químicas. Véase Reacciones)
- Reacciones redox. Véase Reacciones de oxidación-reducción
- Reacciones secuenciales, [223-224](#)
- Reactivos específicos de grupo, [229](#)
- Reactivos, grupos específicos, [229](#)
- RecA, [812-813](#), [813f](#)
- Recambio de proteínas, [241](#), [649](#). Véase también
Degradación de aminoácidos; Síntesis de aminoácidos
- Receptor β-adrenérgico, [383-384](#), [384f](#)
- Receptor de acetilcolina
como conductos iónicos activados por ligando, [370-371](#), [371f](#)
estructura, [370-371](#), [371f](#)
generación, [373](#), [373f](#)
- Receptor de célula B, [938](#), [938f](#)
- Receptor de insulina, [392-395](#), [392f-394f](#)
- Receptor de lipoproteínas de baja densidad, [746-748](#), [747f](#)
- Receptor de SRP, [881-883](#), [882f](#)
- Receptor de transferina, [914](#), [915](#)
- Receptor del factor de crecimiento epidérmico, [396-397](#), [396f-398f](#)
en el cáncer, [401](#)
- Receptor Her2, [397](#), [401](#)
- Receptor(es) hormonal(es), [908-909](#), [908-910](#), [909f](#)
dominios de unión al DNA, [908](#), [908f](#)
dominios de unión al ligando, [908](#), [908f](#)
localización nuclear de. Véase también
Receptores nucleares de hormonas
unión del fármaco, [920](#), [920f](#)
- Receptor(es). Véase también tipos específicos
en la transducción de señales, [382](#)
7TM, [383-385](#), [383f](#)
insulina, [392-393](#)
proteína G acoplada, [382](#)
serpentina, [384](#)
unión del ligando, [898-899](#), [900f](#)
- Receptores acoplados a proteínas G, [385](#)
- Receptores de carga, [883](#)
- Receptores de células T, [948-949](#), [963-967](#)
CD3, [964-965](#), [965f](#)
CD4, [948](#)
CD8, [964-965](#), [964f](#)
células T ayudantes, [948](#), [966-968](#)

- Receptores de células T (continuación)
 células T citotóxicas, [948](#), [964](#)-[965](#), [967](#)
 dominios, [963](#), [963f](#)
 en la activación de células T, [965](#), [965f](#)
 estructura, [962E](#), [963](#)-[964](#), [963f](#)
 genes, [963](#)-[964](#)
 número, [948](#)
 proteínas del complejo MHC, [963](#)-[967](#), [964f](#)
- Receptores de esteroídeos, localización nuclear, [892](#), [89f](#). Véase también Receptores nucleares de hormonas
- Receptores de estrógenos, [907](#)-[908](#)
 unión de fármacos, [910](#), [910f](#)
- Receptores de serpentina, [384](#)
- Receptores de tipo Toll, [946](#)-[947](#), [946f](#), [947f](#)
- Receptores del olor, [923](#)-[926](#), [924f](#), [925f](#)
- Receptores nucleares de hormonas, [908](#)-[910](#), [908f](#), [909f](#), [912](#)
 dominios de unión a ligando, [908](#), [908f](#)
 dominios de unión al DNA, [908](#), [908f](#)
 unión de fármacos, [910](#), [910f](#)
- Receptores tirosina quinasas, en la transducción de señales, [392](#)
 en el cáncer, [401](#)
- Receptores Toll, [946](#)
- Rechazo de injerto, [968](#)
- Rechazo de trasplante, [968](#)
- Refinonotus americana*, genoma, [505](#)
- Recombinación
 DNA. Véase Recombinación del DNA en anticuerpos, [956](#)-[958](#), [957f](#)
- Recombinación del DNA, [812](#)-[814](#)
 conexiones Holliday, [813](#)-[814](#), [813f](#)
 definición, [812](#)
 funciones, [812](#)
 iniciación, [812](#)-[813](#)
 mecanismos, [813](#)-[814](#), [813f](#), [814f](#)
RecA, [812](#)-[813](#), [813f](#)
 recombinasas, [813](#)-[814](#)
- Recombinante homólogo, [936b](#)
 en genes alterados, [156](#)
 en la ceguera al color, [936](#)-[937](#), [937f](#)
- Recombinación V(D)J, [957](#)-[958](#), [957f](#)
- Recombinación VJ, [957](#), [957f](#)
- Recombinasa Cre, [813](#)-[814](#), [814](#)
- Recombinasas, [813](#)-[814](#)
- Reductasa, en el complejo de la nitrogenasa, [681](#)-[683](#)
- Reed, Randall, [923](#)
- Restructuración o barajado de exones, [129](#), [129f](#)
- Región -25, [122](#), [122f](#)
- Regiones constantes, [952](#), [952f](#)
- Regiones invertidas, [520](#)
- Regiones que determinan complementariedad (CDRs), [952](#), [952f](#), [953](#)-[954](#)
- Regiones variables, [953](#), [952f](#)
- Regla del N-terminal, [652](#)
- Reglas de Lipinski, [1004](#), [1004f](#)
- Regulación de proteínas
 fosforilación, [284](#)-[287](#). Véase también Fosforilación
 modificación covalente, [284t](#)
- Regulación enzimática, [275](#)-[299](#)
 activación proteolítica, [276](#), [288](#)-[297](#)
 allostérica, [275](#), [276](#)-[287](#)
 desfosforilación, [284](#)-[286](#)
- fosforilación, [284](#)-[287](#)
 isozimas, [275](#)-[276](#), [283](#), [283f](#)
 modificación covalente reversible, [276](#), [283](#)-[288](#)
 proteína quinasas, [284](#)-[289](#)
 zimógenos, [288](#)-[297](#)
- Regulación génica. Véase Expresión/regulación génica
- Rendimiento fotosintético, [542b](#)
- Reparación de errores, [808](#), [808f](#)
- Reparación de errores del DNA, [808](#), [808f](#). Véase también Reparación del DNA
- Replicación de nucleótidos por escisión, [808](#)-[809](#), [809f](#)
- Replicación del DNA, [118](#), [784](#), [784f](#), [804](#)-[812](#)
 complejos de enzimas, [808](#), [808f](#)
 corrección, [807](#)
 defectuosa, en el cáncer, [810](#)
 directa, [808](#)
 doble hebra, [809](#)
 ensamblaje de extremos no homólogos, [810](#)
 errores, [808](#), [808f](#)
 genes supresores de tumores, [810](#)
 glicolasas, [808](#), [809](#)
 hebra simple, [807](#)-[809](#)
 ligasa, [796](#), [809](#)
 supresión de base, [808](#)
 supresión de nucleótido, [808](#)-[810](#), [809f](#)
 uracil DNA glicolasas, [809](#), [809f](#)
- Reparación por supresión de bases, [808](#)
- Repeticiones de aniquirina, [939](#), [939f](#)
- Repeticiones de héptadas, en proteínas superhelicoidales, [44](#), [45f](#)
- Repeticiones de trimucleótido, [805](#), [805f](#)
- Repeticiones internas
 en secuencias de aminoácidos, [82](#)-[83](#), [83f](#)
 homología de secuencia, [174](#), [175f](#)
- Repeticiones invertidas, como centros de reconocimiento, [263](#)
- Repeticiones ricas en leucina, [946](#), [946f](#)
- Replicación del DNA, [56](#)-[66](#), [113](#)-[14](#), [783](#), [784f](#), [793](#)-[804](#)
- abrazadera de DNA deslizante, [798](#)-[799](#), [798f](#)
- cadena retardada, [798](#), [798f](#)
 síntesis, [796](#), [799](#)-[801](#), [799f](#)
- cargadores de abrazadera, [799](#)
- cebador, [117](#)-[118](#), [140](#), [793](#), [793b](#), [795](#), [795f](#)
- centros de
 en bacterias, [801](#), [801f](#)
 en eucariotas, [802](#)-[803](#)
- ciclo celular, [803](#), [803f](#)
- complejos precebadores, [801](#)
- complementariedad de bases, [794](#)-[795](#), [794f](#), [795f](#)
- corrección de errores, [807](#), [807f](#)
- definición, [111](#)
- direccionalidad, [110](#), [118](#), [796](#), [798](#)
- DNA polimerasas, [117](#)-[118](#), [117f](#), [793](#)-[795](#), [802](#)-[803](#), [802f](#). Véase también DNA polimerasas
- DnaA*, [801](#), [801f](#)
- en bacterias, [798](#)-[801](#)
- en *E. Coli*, [798](#)-[801](#)
- en eucariotas, [802](#)-[803](#)
- ensamblaje de las hebras, [796](#), [796f](#)
- entrecruzamiento, [806](#)-[807](#), [807f](#)
- errores, [804](#)-[805](#)
 reparación, [804](#)-[812](#). Véase también Reparación del DNA
- especificidad, [794](#)-[795](#), [794f](#), [795f](#)
- factores habilitadores, [802](#)
- fragmentos de Okazaki, [796](#), [796f](#), [800](#)
- hebra coductora, [796](#), [796f](#)
- síntesis, [796](#), [796f](#), [799](#), [799f](#)
- helicasas, [115](#), [797](#), [797](#)-[798](#), [797f](#), [798](#), [799](#)
- holoenzima DNA polimerasa III, [798](#)-[800](#), [799f](#), [800f](#), [801](#)
- horquilla de replicación, [796](#), [796f](#), [799](#)-[801](#), [799f](#), [800f](#)
- iniciación, [795](#), [801](#)-[803](#)
 en bacterias, [801](#), [801f](#)
 en eucariotas, [802](#)-[803](#)
- ligasa, [796](#), [796f](#)
- modelo de trombón, [800](#), [800f](#)
- molde, [117](#), [118f](#), [793](#)
- origen, [801](#), [801f](#)
- origen de los complejos de replicación, [802](#)
- procesos coordinados, [798](#)-[804](#)
- progresividad (o procesividad), [798](#)-[799](#), [798f](#)
- pruebas de DNA, [140](#)
- RNA polimerasa, [895](#), [795f](#)
- semiconservativa, [113](#)-[114](#), [114f](#)
- separación de hebra, [114](#)-[115](#), [115f](#), [797](#)-[798](#), [797f](#)
- tecnología del DNA recombinante, [140](#). Véase también Tecnología del DNA recombinante
- telomerasas, [803](#)-[804](#), [803f](#), [804f](#)
- terminación controlada, [138](#)-[139](#), [138f](#)
- Replicaciones semiconservativas, [113](#)-[114](#), [114f](#)
- Replicón, [802](#)
- Representación de Hill, [109](#)-[110](#)
- Representación de Lineweaver-Burk, [220](#), [220f](#)
- Representación doble recíproca, [220](#), [220f](#), [227](#)-[228](#), [228f](#)
- Representación hidrofílica, [341](#), [342f](#)
- Represión por catabolito, [900](#)-[901](#)
- Represor *pew*, [899](#)-[900](#), [900f](#)
- Represores, [802](#)
 lac, [894](#), [894f](#), [897](#)-[899](#), [898f](#), [899](#), [900](#)
par, [899](#)-[900](#), [900f](#)
- Reserva Q (de quinonas)
 en la fosforilación oxidativa, [510](#)
 en la fotosíntesis, [547](#), [547f](#)
- Residuos de aminoácidos, [34](#), [35](#)
 definición, [34](#)
 en estructuras secundarias, [40](#)-[46](#), [52](#)-[53](#), [52f](#)
- Residuos de anclaje, [963](#)-[963f](#)
- Resistina, [274](#)
- Respiración celular, [476](#), [477f](#), [569f](#), [570](#). Véase también Cadena respiratoria
 definición, [503b](#)
 en la fotosíntesis, [569f](#), [570](#)
 regulación, [530](#)-[533](#)
- Respiración celular, [476](#), [477f](#), [569f](#), [570](#)
 definición, [503b](#)
 en la fotosíntesis, [569f](#), [570](#)
 regulación, [530](#)-[533](#)
- Respuesta "huye o pelea", [287](#)
- Respuesta inmune, [945](#)-[973](#). Véase también Anticuerpos; Antígeno(s)

- Respuesta inmune (continuación)
 a antígenos propios, 970-971
 autotolerancia, 970-971
 cambio de tipo, 960-961, 960f
 celular, 948
 células B, 958-960. Véase también Célula B
 células T, 948-949. Véase también Células T en el cáncer, 971
 en enfermedades autoinmunes, 971
 evolución, 946-949
 humoral, 947-948
 selectinas, 321, 321f
 señalización, 958-960, 967
 unión al antígeno, 943-946
 visión global, 945
- Respuesta inmunoinsular, 947-948
- Reticulo endoplasmático, 346, 948f
 destino de proteínas, 881-883
 glicosilación de proteínas, 317-318, 317f
 liso, 880
 rugoso, 880
 síntesis de ácidos grasos, 642-644
 síntesis de proteínas, 880-883
 unión de ribosomas, 880-883, 880f
- 11-cis-Retinal, 932, 932, 933f, 933-934
 todo-trans-Retinal, 933, 933
- Retinitis pigmentosa, 847
- Retinol (vitamina A), 424, 424f, 425
 deficiencia, relacionada con el alcohol, 778
- Retroinhibición, 277, 428
 acumulativa, 699
 en la síntesis de aminoácidos, 697-700
 en la síntesis de nucleótidos, 723-725
 en la síntesis del colesterol, 742
 evolución, 698
 multiplicidad de enzimas, 698
- Retrovirus, 118, 119f, 969
 como vectores, 154
- RFs (factores de liberación), 126, 878, 878f
- Rhizobium, en la fijación del nitrógeno, 680-681
- rho, 121
 en la terminación de la transcripción, 830-831
- Rhodopseudomonas viridis, centro de reacción fotosintético, 545, 546f, 560
- Riboflavina (vitamina B₂), 423, 423t
- Ribonucleasa
 comparación de secuencia, 164, 165
 desnaturación y reducción, 51-52, 51f, 52f
 en la transcripción, 832
 estructura, 50-52, 50f-52f
 revuelta, 51-52, 52f
 secuencias de aminoácidos, 50-52, 50f
- Ribonucleasa III, 832
- Ribonucleasa P, 832
- Ribonucleoproteínas
 nuclear pequeña, 822, 844-845, 845f, 845t
 Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), 839-840, 844
- Ribonucleótido de carboxiaminoimidazol, 715, 716
- Ribonucleótido reductasa, 718, 718-720, 718f, 719, 724-725, 724f
- Ribosa 1-fosfato, 725
- Ribosa 5-fosfato, 571, 725
 en el ciclo de Calvin, 571, 571f
 en la ruta de las pentosas fosfato, 577, 578f, 579, 579f, 583-585
- Ribosa fosfato, en la síntesis de purina, 714-715
- Ribosa, 108, 108, 109, 305, 305f
 desviaciones del plano en el anillo, 785, 785f
 forma del anillo, 307, 307f
- Ribosilación, 284t
- Ribosoma(s), 126, 866-876
 centros de iniciación, 876, 876f
 centros, 871-872, 972f, 873
 como ribozimas, 857
 definición, 857
 en eucariotas vs. bacterias, 879
 en la interacción codón-anticodón, 876
 enlazado al retículo endoplasmático, 880-883
 estructura, 866-867, 867f
 evolución, 869
 funciones, 869
 mecanismo de unión del tRNA al, 872-873, 872f
 polirribosómica, 870, 870f
 subunidades, 866-867, 867f
 formación, 876
- Ribotimidilato, 832, 832
- Ribozimas, 849, 857
- Ribulosa, 305, 306f
- Ribulosa 1,5-bisfosfato, en el ciclo de Calvin, 567-571, 568, 571, 571f, 572, 572f
- Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxygenasa. Véase Rubisco
- Ribulosa 5-fosfato
 en el ciclo de Calvin, 571, 572
 en la ruta de las pentosas fosfato, 578f, 579
- Rich, Alexander, 861
- Ricina, 885
- Rickettsia prowazekii, genoma, 505
- Rifampicina, 831, 831
- Rinón
 funciones, 768-769
 gluconeogénesis, 460
 metabolismo de fármacos, 1007
- Ritmos circadianos, 941
- RNA
 actividad catalítica, 848-851, 869
 autocorte y empalme, 848-850, 849f-851f
 azúcares, 108-109, 108f
 corte y empalme, 128, 128f, 822. Véase también Curte y empalme
 en la expresión génica, 119-123
 esqueleto, 108f, 109
 estructura, 108, 109-111, 116-117, 116f, 176-177, 176f
 evolución, estudios moleculares, 178-179, 179f
 homologías de secuencia, 176-177, 176f
 interferente pequeño, 120
 mensajero. Véase mRNA
 micro, 120
 modificación transcripcional, 123, 123f
 motivos en horquilla, 116f
 nuclear pequeño, 120, 822, 844
 en corte y empalme, 844-845, 845f, 845t
 nucleósidos, 109
 pre-mRNA, 840-846, 841f
 corte y empalme, 843-845, 844f-846f
 pre-tRNA, 839-840, 840f
 en bacterias, 832
 en eucariotas, 839-840, 840f
 pre-tRNA
- en bacterias, 840, 841f
 en eucariotas, 840, 841f
- procesado postranscripcional de
 en bacterias, 832
 en eucariotas, 839-848
- región enlazada a ATP, 179-180, 180f
- ribosómico. Véase rRNA
- síntesis, 120-123, 121f, 122f, 821-839. Véase también Transcripción
- tipos, 119-120
- RNA catalítico, 848-851, 869
- RNA de transferencia. Véase tRNA
- RNA mecanismo de interferencia, 157, 157f
- RNA mensajero (mRNA), 107, 119-120, 119f. Véase mRNA
- RNA pequeño de interferencia (siRNA), 120. Véase también RNA
- RNA polimerasa dirigida al RNA, 118
- RNA polimerasa I, 834, 834f, 835
 procesado de rRNA, 839-840, 840f
- RNA polimerasa II, 834, 834f, 835, 902
 bromodomios, 911, 911f
 en la iniciación de la transcripción, 912, 912f
- RNA polimerasa III, 834, 834f, 835-836
- RNA polimerasa(s), 120-123, 120f, 822, 822-823
 acción catalítica, 823-832
 ADP ribosilación, 284t
 bacteriana, 823-827
 centro activo, 823, 824f
 estructura, 822, 822, 823, 823f
 reconocimiento del promotor, 825-826
 subunidades, 823, 823f, 825-827, 875
 en la replicación del DNA, 794, 795f
- eucariótico, 822, 822, 833-839
 dirigido al RNA, 118
 elementos del promotor, 835-839, 835f
 estructura, 822, 822
- RNA ribosómico. Véase rRNA
- RNAse P, 850
- Roberts, Richard, 127
- Rodopsina, 384, 932-934
 espectro de absorción, 932f
 estructura, 384, 384f
 fotorreceptores de los conos, 935-936, 936f
- Rodopsina quinasa, 934
- Rofecoxib, 1016, 1016, 1021
- Rossmann, Michael, 449, 449f
- Rotación, flagelar, 990, 993-996
- Rotenona, 533
- Roundup, 694
- tRNA (RNA ribosómico), 119. Véase también RNA
 16S, en la traducción, 870-871, 875-876
 bases, 832
 en el emparejamiento de bases, 875
 en la traducción, 867-869, 870-871, 875
 funciones, 120, 869
 plegamiento, 867, 868f
 transcripción, 832
 transcripción y procesado, 832, 839-840, 840f
- tRNA 16S, en la traducción, 870-871, 875-876
- RsrI endonucleasa, 266
- RSS (secuencia señal de recombinación), 938
- Rubisco, 567, 567-571
 activación de la luz, 574
 evolución, 576

- Rubisco activasa, 568
 Ruido electrónico, 926, 926f
 Ruptura heterolítica, 629
 Ruptura homolítica, 629, 629f
 Ruta C₄ en la fotosíntesis, 575-576, 575f
 Ruta de Embden-Meyerhof, 434. Véase también Glicólisis
 Ruta de interconversión galactosa-glucosa, 449
 Ruta de la β-oxidación, en el metabolismo de los ácidos grasos, 624-625
 Ruta de las hexosas monofosfato. Véase Ruta de las pentosas fosfato
 Ruta de las pentosas fosfato, 565-566, 577-587, 763-764
 ciclo de Calvin, 585
 en tejidos seleccionados, 584f
 estequiometría, 583-585, 584f
 fase no oxidativa, 577, 579-583, 579f, 581t, 764
 fase oxidativa, 577-579, 579f, 581t, 763-764
 funciones, 584f
 glicólisis, 578-585
 modos, 583-585, 584f
 transaldolasa, 579-581, 582f
 transacetolasa, 579-581, 581f
 velocidad, 583-587, 763-764, 764f
 visión global, 763-764
 Rutas anfibólicas, 411
 Rutas extrínsecas, coagulación, 293, 293f
 Rutas intrínsecas, coagulación, 293, 293f
 Rutas metabólicas, 410-412, 410f. Véase también Rutas específicas
 acción coordinada, 639, 760-766
 en la síntesis de ácidos grasos, 632f, 639, 640f
 anfibólicas, 411
 centros de control, 762-766
 compartimentación, 762
 de recuperación o rescate
 definición, 714
 en la síntesis de nucleótidos, 710, 710f, 714-718
 degenerativo vs. sintético, 411
 separación, 761
 evolución, 428-429
 funciones anabólicas vs. catabólicas, 761
 paso limitante (comprometido), 454, 697
 ramificadas, regulación, 697
 regulación recíproca, 760-766
- S**
- Sabor amargo, 927-928, 931
 Sabor salado, 927, 930-931
 Sacarasa, 311, 434
 Sacarosa, 310-311, 311f, 434
 síntesis en plantas, 573, 573f
 Saccharomyces cerevisiae, genoma, 149, 901
 Sociedad, regulación, 775
 Sakmann, Bert, 163
 Sales biliares, 620, 620f
 síntesis, 748-749, 749f
 Sanger, Frederick, 36, 138, 140
 Sangre, contenido de combustible, 767f
 Sarcomero, 982-984, 983f
 SARS, terapia de fármacos, 1018, 1019f
 SCAP (proteína activadora de la escisión de SREBP), 742, 743f
 Schachman, Howard, 228
 SDS (sodio dodecil sulfato), en la electroforesis en gel, 72, 77-78
 SDS-PAGE, 73, 73f, 75, 75f
 con isoelectroforesis, 74, 74f
 Secuencias -35, 122, 122f, 825, 825f
 Secuencia alanyl-tRNA, 859, 859f
 Secuencia de replicación anómala, 145-146, 146f
 Secuencia guía interna, 850, 850f
 Secuencia molde, 174
 Secuenciación de proteínas. Véase Secuencias de aminoácidos, determinación de
 Secuenciación del DNA, 138-139, 138f
 detección fluorescente, 138-139, 138f
 en el análisis forense, 142, 142f
 en la secuenciación de aminoácidos, 83-84, 83f
 método de terminación de cadena, 138, 138f
 método dideoxi de Sanger, 138-139, 138f
 para Neandertals, 178, 178f
 Secuencias A/H, 150
 Secuencias consenso, 122b, 122f, 286
 en el corte y empalme, 128, 128f, 843, 843f
 en la fosforilación, 286
 en los promotores, 825, 825f
 Secuencias de aminoácidos, 18-19, 19f, 25, 27-40
 alignamiento, 166-168, 166f-168f
 bases de datos, 65
 en el análisis de la homología de secuencia, 171, 172f
 centros de glicosilación, 316
 conformaciones alternativas, 53, 53f
 de colágeno, 45-46, 46f
 determinación, 78-84
 degradación de Edman, 79-81, 79f
 genética, 36
 ruptura proteica, 80-82, 80f-82f, 81f
 secuenciación del DNA, 83-84, 83f
 utilización, 82-83
 direccionalidad, 34-35, 35f
 DNA derivado, 83-84, 83f
 en el código genético, 124-127, 125f. Véase también Código genético
 en enfermedades, 37
 estructura proteica, 18-19, 19f, 25, 36-37, 50-59
 evolución, 37, 82, 165-171
 homólogo, 166-171. Véase también Homologías de secuencia
 identificación, 65
 mezcla, 168, 168f
 repeticiones internas, 82-83, 83f
 sustituciones, 168-171, 169f-171f
 Secuencias de Shine-Dalgarno, 126, 870, 872
 Secuencias líder, 913, 913f, 914, 914f
 Secuencias palindrómicas, 136, 136b
 Secuencias señal, 83
 de reconocimiento (RSS), 958
 en dianas proteicas, 881, 881f
 señal de localización nuclear, 83
 Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato, en el ciclo de Calvin, 571
 Sedoheptulosa 7-fosfato, 571
 en el ciclo de Calvin, 571f
 en la ruta de las pentosas fosfato, 578f-580f, 579, 580
- Segunda ley de la termodinámica, 11-12. Véase también Termodinámica
 Segundos mensajeros, 382-383, 383f, 388-391, 389f, 399
 Selección de células T, 970, 970f
 Selectinas, 321
 Selenolato, 701, 701f
 Sensación de avería, 939-941
 Sensación táctil, 939-941
 Sentido de giro, en hélice, 40, 41f
 Señal de localización nuclear, 83
 Separación de carga por fotoinducción, 545-547, 545f
 Separación de carga, fotoinducida, 545, 545f
 SERCA, 355-357
 Seres humanos, secuenciación del DNA de los primeros, 178, 178f
 Serina
 a partir de glicina, 668
 en la quimotripsina, 243-244, 244f
 en la síntesis de cisteína, 689, 693
 en la síntesis de esfingolípidos, 736, 737
 en la síntesis de glicina, 689
 en la triada catalítica, 246-248. Véase también Triadas catalíticas
 en las glicoproteínas, 316
 esfingosina, 700, 700f
 estructura, 30, 31f
 formación de piruvato, 667, 667f
 síntesis, 688-689, 688f, 690, 697
 Serina deshidratasa, en la degradación de los aminoácidos, 660, 667
 Serina hidroximetiltransferasa, 689
 Serinproteasas
 centros activos, evolución convergente, 175, 175
 estrategias catalíticas, 241, 243-254. Véase también Proteasas, estrategias catalíticas de
 Serinquinonas, 284-285, 285f, 285f
 SERMs (mimuladores selectivos de receptores de estrógenos), 910
 Seroalbúmina, en la distribución de fármacos, 1005, 1005f
 Serotoninina, síntesis, 700f, 701
 Sharp, Philip, 127
 Shemin, David, 702, 702b
 TTM (receptores de siete hélices transmembrana), 383-385, 383f, 384f, 388, 388-389
 en el olfato, 923
 en el sabor, 927-930
 amargo, 927-929
 dulce, 929-930
 en la cascada de los fosfoénolítidos, 388-389
 en la visión, 932-934, 934f, 935
 para fármacos, 384, 1017
 Sildentafil, 1011
 desubrimiento, 1010-1011
 Simpore, 360-361, 360f
 Sinapsis de recombinación del DNA, 814
 Sinapsis de reconocimiento, 814
 Sinapsis, 370, 370f
 Síndrome alcohólico fetal, 778
 Síndrome de dificultad respiratoria, 738
 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Véase Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Síndrome de la dificultad respiratoria infantil, 738
 Síndrome de Lesch-Nyhan, 726-727
 Síndrome de Li-Fraumeni, 810
 Síndrome de Usher, 984
 Síndrome de Wernicke-Korsakoff, 228
 Síndrome de Zellweger, 630
 Síndrome respiratorio agudo grave (SARS)
 terapia de fármacos, 1018, 1019f
SINES, 150
 Singer, S. Jonathan, 143
 Simónitos, 125, 125f
 Síntesis de aminoácidos, 679-706
 adenilación, 669-700, 699f
 S-adenosilmetionina, 691-693
 amonio, 680-684
 cascadas enzimáticas, 699-700, 699f, 700f
 ciclo del metilo activado, 692, 692f
 corismato, 693-694, 694f
 de aminoácidos esenciales, 685-686, 693-697
 de aminoácidos no esenciales, 686-693
 descripción, 679-678
 dominios reguladores, 698, 698f
 en ayunas, 769-770, 722
 fijación de nitrógeno, 680-684
 fosforilación, 698-699
 hidroxietil-TPP, 697-698, 697f
 hígado, 769-770
 modificación covalente reversible, 699-700,
 699f
 multiplicidad de enzimas, 698, 698f
 mutilación, 691-692, 691f, 692f
 paso limitante, 697
 precursores metabólicos, 685-685f
 regulación, 697-700
 retroinhibición/activación, 697-700, 700f
 rutas ramificadas, 697
 siquínamo, 693-694, 694f
 sustrato formador de conductos, 696, 696f
 tetrahidrofolato, 689, 689-690, 690f
 treonina desaminasa, 697-698, 697f
 unidades de un carbono, 689-690, 689t, 690f
 velocidad, 697
 vitamina B₁₂, 628-630, 628f, 629f, 691-692
 Síntesis de colesterol, 736-748, 739-748
 centro, 744, 744f
 esqualeno, 739, 740-742
 estados, 739
 hepática, 742, 744f
 isopentenil pirofosfato, 740
 mecanismo de condensación, 741, 741f
 mevalonato, 739
 proteína de unión al elemento regulador del
 esterol, 742-743, 743f
 regulación, 742-748
 velocidad, 742
 Síntesis de desoxirribonucleótidos, 718-723
 desoxiluridilato, 720
 dihidrofolato reductasa, 721
 regulación, 724-725, 724f
 ribonucleotido reductasa, 718, 718-720, 718f,
 719, 724-725, 724f
 timidilato, 720-721, 721f
 Síntesis de péptidos en fase sólida, 91-93, 92f
 Síntesis por recolección-separación, 1013, 1014f
 Siquínamo, en la síntesis de aminoácidos, 693-
 694, 694f

Siquínamo 3-fosfato, 694
 siRNA (RNA pequeño de interferencia), 120
 Véase también RNA
 Sistema de análogos sintéticos, 256
 Sistema microsómico de oxidación del etanol
 (MEOS), 221
 Sistemas de modificación-restricción, 260
 Sistemas sensoriales, 921-941
 olor, 927-930
 olor, 922-926
 pendiente de estudio, 941
 sabor, 926-931
 tacto, 939-941
 visión, 931-937
 visión global, 921-922
 Slack, C. Roger, 575
 Smith, Emil, 520
 Smith, Hamilton, 136
 t-SNARE, 347, 383
 snoRNPs (ribonucleoproteínas nucleolares
 pequeñas), 839-840, 844
 snRNA (RNA nuclear pequeño), 120, 822, 844
 en el corte y empalme, 844-845, 845f, 845t
 snRNA U1, 844-845, 845f, 845t
 snRNA U2, 844-845, 845f, 845t
 snRNA U4, 844-845, 845f, 845t
 snRNA U5, 844-845, 845f, 845t
 snRNA U6, 844-845, 845f, 845t
 snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares
 pequeñas), 822, 844-845, 845f
 Sobrenadante, en la centrifugación, 67, 68f
 Sodio dodecil sulfato (SDS). Véase también
 como SDS
 en electroforesis en gel, 72, 77-78
 Somatotropina, recombinante, 155, 155f
 Sonificación, 334
 Sonido, percepción, 937-938
 Sorbosia, 305, 306f
 SOS, en la transducción de señales, 397
 Southern, Edwin, 137
 Spin, 98, 98t
 SR Ca²⁺ ATPasa, 355-357
 Src
 en el cáncer, 400
 morfostimulación, 284, 284f
 SREBP (proteína que enlaza al elemento
 regulador del estero), 742-743, 743f
 SRP (partícula de reconocimiento de señal), 120,
 881, 881f, 882f
 SRP54, 881, 882
 Stadtman, Earl, 699
 Stahl, Franklin, 113
 Staphylococcus aureus, peptidoglicano, 233, 233f
 Steitz, Tom, 793
 Stromata lamellae, 543
 Strominger, Jack, 233, 1010
 Subtilisina, 175, 176, 249, 249f
 centros activos, 175, 175f
 mutagénesis dirigida a un centro, 250, 250f
 Subunidad 30S, del ribosoma, 866-867, 867f,
 875, 876, 876f
 Subunidad 50S del ribosoma, 866-867, 867f
 Subunidad 70S, del ribosoma, 866-867, 867f
 formación, 876, 876f
 Subunidad β₂, de *E. Coli*, en la replicación de
 DNA, 798-799, 798f

Subunidad er. de la RNA polimerasa, 823, 823t,
 825-827, 838
 Subunidades, proteicas, 40-50, 49f
 Succinato deshidrogenasa, en el ciclo del ácido
 cítrico, 487-488
 Succinato tiokinasa, en el ciclo del ácido cítrico,
 486-487, 486f
 Succinato, en la síntesis de 4-hidroxipeolina, 779,
 779f
 Succinato-Q reductasa, 509, 509f-512f, 509f, 512
 Succinil-CoA, 627
 en el ciclo del ácido cítrico, 485-487, 486f,
 492, 492f
 en la degradación de aminoácidos, 668-669
 formación, 627-630, 627f, 629f, 488-489
 porfirinas, 702-704, 703f
 Succinil-CoA sintetasa, en el ciclo del ácido
 cítrico, 486-487, 486f
 Sulfatación, 284f
 Sulfato, conjugación, 1006, 1007
 Sulfolípidos, en membranas tilacoidales, 543
 Sumidero electrónico, 581, 659
 Superfamilia de los principales facilitadores, 457
 Superóxido dismutasa, 518-519, 518f
 Surco mayor, 785-786, 786f
 Surco menor, 785-786, 794, 795f
 Sustitución de pares de bases, test, 811
 Sustituciones
 conservativas, 168
 en secuencias de aminoácidos, 168-171,
 169f-171f
 producción, 147-148, 147f
 Sustrato cromogénico, 244
 Sustrato(s)
 cromogénico, 244
 enzima, 206. Véase también Complejo
 enzima-sustituto
 unión, especificidad enzimática, 263-266
 Sustitutos del receptor de la insulina, 393-395,
 394f
 Syk (tirosina quinasa de baños), 959

T

Tacto, 939-941
 Tagatosa, 305, 306f
 β-Talasemias, 196, 197
 Talosa, 305f
 Tamoxifeno, 910, 910
 Tampones, 16-17, 16f, 17f
 en la hidratación de dióxido de carbono,
 257-258, 258f
 Taprocolato, 620
 Síntesis, 749, 749
 Taxol, 990
 TBP. Véase Proteínas de unión a cajas TATA
 (TBP)

Técnica de la impronta, 824
 Técnica de la velocidad de sedimentación, 77-78
 Técnica de patch-clamp, 351f, 363-364, 363f
 Técnica del equilibrio de sedimentación, 77-78
 Técnicas inmunológicas
 anticuerpos monoclonales, 85-87, 85f-87f
 anticuerpos policlonales, 85, 85f
 células hibridomas, 86, 86f
 para el estudio de proteínas, 84-90
 producción de anticuerpos, 85-87, 86f

- Tecnología del DNA recombinante, 134-160
 análisis de la expresión génica, 151-152, 152f, 154-155
 análisis mediante enzimas de restricción, 135-137
 animales transgénicos, 155, 155f
 aplicaciones médicas, 158-159
 aproximación en fase sólida, 139-140, 139f
 armas genéticas, 158
 autoradiografía, 72, 138
 chips de genes de DNA, 152, 152f
 clonado, 142-144, 144f
 cromosomas artificiales de bacterias, 145
 cromosomas artificiales de levaduras, 145-146, 146f
 detección de la fluorescencia, 138-139, 138f
 diseño de genes, 148, 148f
 DNA complementario, 152-154, 153f, 154f
 electroforesis en gel de campos pulsados, 136-137, 137f
 electroporación, 158, 158f
 en la secuenciación de aminoácidos, 83-84, 83f
 en plantas, 157-158, 157f, 158f
 fago λ, 143, 144-145, 145f
 genotipos, 146-147, 146f
 longitud de los fragmentos de restricción polimorfismos, 137
 manipulación génica, 152-159
 método de extremos cohesivos, 143, 143f
 microinyecciones de DNA, 153, 153f, 155
 mutaciones, 147-148
 pruebas de DNA, 83, 137, 139, 146-147
 reacción en cadena de la polimerasa, 140-142, 140f-142f, 142f
 secuenciación del DNA, 138-139, 138f
 síntesis de DNA, 139-140, 142-143
 transformación por bombardeo, 158
 vectores, 142-145, 144f, 153-154
 vectores de expresión, 153-154
 vectores plasmídicos, 142-144, 144f
 visión global, 134-135
 Telomerasa, 120, 804
 Telómeros, 803-804, 803f, 804f
 Templado, de las cadenas DNA, 115
 Terapia génica, 158-159
 Terminación controlada de la replicación, 138-139, 138f
 Término OCA, de tRNA, 860, 861, 861f
 Termodinámica, 11-13. Véase también Energía de reacciones acopladas, 411-412, 413-415
 en el metabolismo, 411-412
 enzimas, 208-211
 Termogénesis, fosforilación oxidativa, 533
 Termogenina, 433
 Test de Ames, 811, 811f
 Test de *salmonella*, para mutágenos, 811-812
 Testosterona
 degradación, 754
 funciones, 754
 receptores, 908-909
 síntesis, 749, 749f, 753, 753f
 Tetrahidrobiopterina, 671, 671
 Tetrahidrofolato, 689
 en la síntesis de aminoácidos, 689-690, 690f, 691
 en la síntesis de desoxirribonucleótidos, 720-721, 721
Tetrahymena, automaduración, 849, 849f, 850
 Tetrodotoxina, 364, 364
 Tetrosas, 304-305, 305f
 TFII, en la transcripción, 836-838
 TFIPI (inhibidor de la ruta del factor tisular), 296
 The Blind Watchmaker (Dawkins), 56
 ThiF, 655, 655f
 ThiS, 655, 655f
 Tiamina (vitamina B₁), 423f
 biosíntesis, 655, 655f
 deficiencia, 494
 Tiamina pirofosfato (TPP), 478
 deficiencia, 494
 en el ciclo del ácido cítrico, 478, 478f
 en la ruta de las penosas fosfato, 581, 581f
 Tiempo, sentido, 941
 Tilacoides, 543, 543f, 550-551
 Timidilato sintasa, 720-721
 Timidilato, 110, 721
 síntesis, 720-721, 721f
 Timidina trifosfato (TTP), 725
 Timidina, 109
 Timina, 4, 4, 109, 109, 720
 en la reparación del DNA, 809
 síntesis, 690
 Timo, selección de células T, 970, 970f
 Timocitos, 970, 970f
 Tiogalactósido transacetilasa, 897
 6-Tioguanina, 1019, 1020
 Tiolas, 625-626, 625f
 Tiorredoxina, en el ciclo de Calvin, 574, 574-575, 575f
 Tiorredoxina reductasa, 720
 Tirosina
 degradación, 671-672
 epinefrina, 700, 700f
 estructura, 29, 30f, 672
 melanina, 700
 síntesis, 693-694, 694f, 695f
 tirosina, 700, 700f
 Tirosina quinasa del receptor de insulina, 393, 395
 Tirosina quinasa renal (Syk), 959
 Tirosina quinasas, 284-285, 285f, 392
 en el cáncer, 400
 receptor, 392
 Tirosinemas, 674f
 Tiroxina, síntesis, 700, 700f
 Titina, 15
 Titulación o valoración, 16
 α-Tocoferol (vitamina E), 424, 424f, 424
 en la prevención de la peroxidación de lípidos, 510
 Tonegawa, Susumu, 956
 Topoisomerasas, 790-792, 814
 bacterianas, 792
 recombinantes, 814, 814f
 tipo I, 790-791
 en la relajación del DNA superenrollado, 790-791, 791f
 estructura, 790, 790f
 tipo II, 790, 791-792, 792f
 estructura, 791, 791-792
 Topoisomero, 789, 789f
 Torazina (clorpromazina), 1010
 descubrimiento, 1010
 mecanismo de acción, 1010-1011, 1011f
Torpedo marmorata, receptor de acetilcolina, 370, 370f
 Torr, 187b
 Torsiones, en el DNA, 788f, 789
 Tosifera, 402
 Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK), 229, 230
 TPA (activador del plasminógeno tipo tejido), 297, 297f
 TPL. Véase Triasa fosfato isomerasa (TPI)
 TPP. Véase Tiamina pirofosfato (TPP)
 Traducción, 126, 126f. Véase también
 Expresión/regulación génica; Síntesis proteica
 en la iniciación, 820
 en la terminación, 820
 translocación, 873, 877-878, 878f
 adenilación, 862-863
 aminoacil-tRNA sintetasas, 858, 862-866
 activación de aminoácidos, 862-863
 centros de activación, 863, 863-864, 864
 centros de edición, 864, 864-865
 clases, 865-866, 866f
 corrección de errores, 864-865
 especificidad, 863-864
 reconocimiento del tRNA, 865
 anticodones, 859, 873-876, 875f
 atenuación, 913-914
 clasificación/transporte proteico, 880-883
 codones, 859, 873-876, 875f
 coordinación con la transcripción, 833-834, 833f, 869-870
 corrección de errores, 864-865
 definición, 119, 857
 dirección, 858, 869-870
 edición del RNA, 842, 842f
 elongación de la cadena, 872-873, 872f, 873f
 emparejamiento de bases, 821, 873-876
 balanceo, 874-876
 interacciones codón-anticodón, 873-876
 en bacterias
 comparación con eucariotas, 829-830
 transcripción, 833, 833f
 en el metabolismo del hierro, 914-916
 en eucariotas
 comparación con bacterias, 870-880
 transcripción, 833-834, 833f
 en la hélice alfa, 40
 en la regulación génica, 914-916
 energía libre, 862-863
 enzimas activadoras, 862
 exactitud de la, 858-859, 859f, 864-865, 876
 factores de elongación, 876-877, 876f
 en eucariotas, 880
 factores de liberación, 878, 878f
 factores pentáicos, 876-879
 fidelidad, 858-859, 859f, 864-865, 876
 formación del enlace peptídico, 872-873, 873f
 formilmetionil-tRNA, 871, 871f
 inhibición de
 por antibióticos, 884
 por la toxina diférica, 885
 por ricina, 885

- Traducción (continuado)
- iniciación, [126](#), 862-863, [870-871](#), 871f
 - centros, [870-871](#), 871f
 - en eucariotas, [879](#), 879f
 - mechanismos, 872f
 - mRNA, [119](#), [126](#), 126f, 869-870. Véase también mRNA (RNA mensajero)
 - peptidil-tRNA, [872-873](#)
 - proporción del error, [858-859](#), 859f, [864-865](#)
 - ribosoma, 866-876
 - centros de iniciación, 876, 876f
 - rRNA, [867-869](#), [870-871](#), 875
 - secuencias de Shine-Dalgarno, [126](#), [870](#), 872
 - selección de aminoácidos, 873-874
 - señalización, 880-883
 - terminación, [126](#), [878](#), 878f
 - en eucariotas, 880
 - translocación, 873
 - tRNA, [123](#), 859-862, [871-876](#). Véase también tRNA
 - visión global, [857-858](#)
- Trampa óptica, [986-987](#), 987f
- Transaldolasa, en la conexión entre la ruta de las pentosas fosfato y la glicólisis, [579-581](#), 582f
- Transaminación
- en la degradación de aminoácidos, 656-661
 - en la síntesis de aminoácidos, [683-684](#), 686-687, 686f
 - enzimas de piridoxal fosfato, 656-660
 - estereoquímica de la adición de protones, 687, 687f
 - intermediarios base de Schiff, 657-658, [668](#)
 - mechanismos de reacción, 658f, 686f
- Transaminasas
- dependiente de piridoxal fosfato, 686
 - en la degradación de aminoácidos, 656
 - evolución, 687
- Transcetolasa
- en el ciclo de Calvin, [570](#), 571f
 - en la ruta de las pentosas fosfato
 - conectada con la glicólisis, [579-581](#), 581f
- Transcripción, [120-123](#), 121f, 821-839. Véase también Expresión/regulación génica
- centros promotores/promotores, [122](#), 122f, 823
 - coordinación con la traducción, [833-834](#), 833f, 869-870
 - corte y empalme, [128](#), 128f, [822](#), 843-848. Véase también Corte y empalme
 - dirección, [121](#), 827-829, 828f, 869-870
 - DNA molde, [121-122](#), 121f, 122f
 - eliminación de intrones, [128](#), 128f
 - en bacterias, 823-832
 - atenuación, 913-914, 913f, 914f
 - burbuja de transcripción, [828](#), 828f
 - comparación con eucariotas, [833-834](#), 833f
 - complejo del promotor en transición desde la forma abierta a la cerrada, 827
 - corrección de errores, 829
 - de rRNA, 832
 - de tRNA, 832
 - desenrollado de la hélice, 827, 827f
 - elongación de cadena, [828-829](#), 828f
 - enrollado del DNA, 829, 829f
 - iniciación, [824-826](#)
 - procesado del RNA, [128](#), 832. Véase también Procesado del RNA
 - procesado del transcrito, 832
 - promotores, [824-825](#)
 - regulación, 893-901. Véase también Expresión/regulación génica
 - rna, [830](#), 830f
 - ribonucleasas, 832
 - separación del híbrido RNA-DNA, 829, 829f
 - superenrollamiento del DNA, 827, 827f
 - terminación, 829-832, 829f
 - traducción, [833-834](#), 833f, 869-870
- en eucariotas, [833-839](#)
- acetilación de histonas, [910-912](#), [911f](#)
 - amplificadores, [123](#), 838-839, 902, [906-907](#), 906f, 907f
 - caja TATA, [836-837](#), 836f, 837f
 - coactivadores in, 909, 909f, [910-912](#), [911f](#)
 - comparación con bacterias, [833-834](#), 833f
 - corrección de RNA, 842, 842f
 - corte y empalme, [128](#), 128f, [822](#), 843-848. Véase también Corte y empalme
 - dominio carboxilo terminal, [837](#), 846, 846f
 - elongación de la cadena, [837-838](#)
 - factores de transcripción, [836-838](#), 837f. Véase también Factores de transcripción
 - iniciación, [835-839](#), 902-903, [912](#), 912f
 - membrana nuclear, [833-834](#)
 - poliadenilación, 841, 841f
 - procesado de RNA, [128](#), [834](#), 839-848. Véase también Procesado del RNA
 - procesado del pre-mRNA, 840-848, 841f. Véase también Corte y empalme
 - visualización, 840, 840f
 - estados, [822](#)
 - inhibición, por proteínas que enlazan DNA, [897-900](#)
 - iniciación, [122-123](#), 122f
 - de novo, 827
 - elongación en la cadena de RNA, [828-829](#), 828f
 - formación de cadena de RNA, 827
 - modificación del RNA, [123](#), 123f
 - reacción fundamental, 823
 - RNA polimerasa, [120-123](#), 121f, [822-827](#). Véase también RNA polimerasa
 - secuencias amplificadoras, [123](#)
 - terminación, [123](#)
 - visión global, 821-822
- Transcriptasa inversa, [118](#), 118f
- en la producción de DNA complementario, [152-153](#)
- Transducina, rodopsina, [934](#)
- Transducción de setas, [381-383](#)
- anormalidades en
 - en el cáncer, [400-401](#)
 - en el cólera, [401-402](#)
 - en la toxiferina, [401-402](#)
 - calcio, [389-391](#), 389f-391f
 - calmodulina, [390-391](#), 391f
 - cAMP, [386](#)
- caso de los fosfoenolítidos, [388-389](#), 388f
- circuitos moleculares, [380-383](#)
- citoquinas, [967](#)
- complejos hormona-receptor, [384-385](#)
- definición, [381](#)
- dominios de homología Src, [394](#), 394f, [397](#), [399-400](#), 400f
- dominios especializados, [399-400](#)
- en el olfato, [923](#), 924, 924f
- en el sabor, 927-931
- en el tacto, [940](#)
- en la audición, [938](#), 938f
- en la clasificación proteica, 880-883
- en la respuesta inmune, [958-960](#), [967](#)
- en la visión, [934-935](#), 934f
- en quimiotaxis, [996](#), 996f
- entrecrecimiento, [382-383](#)
- epinefrina, 382f, [383-391](#), 386f
- etapas, [387-388](#)
- evolución, [399-400](#)
- factor de crecimiento epidérmico, 382f, [394-399](#), 396f-398f
- fosforilación, [284-285](#), 285f, [386](#), [388-389](#), 389f, [391-395](#), [397-399](#)
- GTPasas, [297-299](#), 298f
- insulina, 382f, [391-395](#)
- ligandos, [382](#)
- mensajeros primarios, [382](#)
- nexus (gap junction), [374](#)
- óxido nítrico, [202](#)
- principios, 382f
- proteína quinasa A, [386](#), [399](#)
- proteína quinasa C, [388-389](#), 389f
- proteínas adaptadoras, [394](#), [397](#)
- proteínas G, [397-399](#), 398f. Véase también Proteínas G
- proteínas quinases, [284-285](#), 285f, [399](#)
- Ras, [397-399](#), 398f
- receptor adrenérgico B, [383-384](#), 384f
- receptores de TTM, [383-385](#), 383f
- receptores, [382](#), [384-385](#)
- receptores proteína quinases, [391](#)
- receptores tirosina quinases, [392](#), [395](#)
- segundos mensajeros, [382-383](#), 383f, [388-391](#), 389f, [399](#)
- terminación, 387f
- visión global, [381-382](#)
- Transesterificación, en el corte y empalme, 844
- Transferasa terminal, [153](#)
- Transferasa(s), 237f. Véase también Enzima(s) en el metabolismo del glucógeno, [594-595](#), 595f
- Transferencia de electrones. Véase también Cadena de transporte electrónico
- en la fosforilación oxidativa, [506-509](#). Véase también Cadena respiratoria
 - fuerza conductora, [519-520](#), 520f
 - velocidad, [519-520](#), 519f
 - en la fotosíntesis, [544-548](#), 545f, 547f, [551-553](#)
- Transferencia de proteínas, [88](#), [137](#)
- Transferencia de RNA, [137](#), 137f
- Transferencia del DNA. Véase también Tecnología del DNA recombinante
- disparo de genes, [158](#)
 - por electroporación, [158](#), 158f
 - por microinyección, [153](#), 153f, [154](#)
 - vectores, [142-145](#), 144f, [153-154](#)

- Transferencia del grupo fosforilo, [414-416, 426](#)
 ATP, [415-416, 416f, 416t, 418-419, 419f](#)
 en la glicolisis, [426, 426f](#)
 transportadores activos, [420-425, 420f, 421f](#)
- Transferencia horizontal de genes, [266, 266f](#)
- Transferencia Northern, [137, 137f](#)
- Transferencia Southern, [137, 137f](#)
- Transferencia Western, [88-89, 88f, 137](#)
- Transferencias de DNA, [137, 137f](#)
- Transferrina, [204, 914, 915](#)
- Transformaciones en fase I en la oxidación, [1006](#)
- Transformaciones en fase II, en la conjugación, [1006-1007](#)
- Transformaciones mediadas por bombardeo, [158](#)
- Transformada de Fourier, [97-98](#)
- Transglutaminasa, [294](#)
- Transición cooperativa, en el plegamiento de proteínas, [55](#)
- Translocasa, [877-878, 878f](#)
- Translocasa ATP-ADP, [529-530, 529f, 530f](#)
 inhibición, [534](#)
- Translochin, [881-882](#)
- Transpeptidasa, inhibición de penicilina, [233-234, 234f](#)
- Transportador ABC, [358-360, 358f, 359f](#)
- Transportador de dicarboxilato, [530, 530f](#)
- Transportador de la glucosa 6-fosfato, [61](#)
- Transportador de piruvato, [530, 530f](#)
- Transportador del tricarboxilato, [530, 530f](#)
- Transportadores, [351-352](#)
 ABC, [358-360, 358f, 359f](#)
 antitransportadores, [360-361, 360f](#)
 ATP-ADP translocasa, [529-530, 529f, 530f](#)
 dicarboxilato, [530, 530f](#)
 en el metabolismo, [420-425, 420f, 421f](#)
 en la fosforilación oxidativa, [420-425, 420f, 421f, 509-520, 509f, 527-530, 527f-530f](#)
 en la fotosíntesis, [530, 530f](#)
 fosfato, [530, 530f](#)
 glucosa, [351-352, 392, 456-457, 457f, 767](#)
 glucosa 6-fosfato, [611](#)
 inhibidores, [533-534, 533f](#)
 permeante de lactosa, [360-361, 361f](#)
 piruvato, [530, 530f](#)
 secundaria, [360-361, 360f](#)
 simpone, [360-361, 360f](#)
 tricarboxilato, [530, 530f](#)
 transporte, [360-361, 360f](#)
- Transportadores activados, en el metabolismo, [420-425, 420f, 421f](#)
- Transportadores de electrones. Véase también Transportadores
 en el metabolismo, [420-425, 420f, 421f](#)
 en la fosforilación oxidativa, [420-425, 420f, 421f, 509-520, 509f, 527-530, 529f, 530f](#)
 Véase también Cadena respiratoria
 en la fotosíntesis, [544-548, 545f, 547f](#)
- Transportadores de glucosa (GLUTs), [351-352, 392, 456-457, 457f, 463, 767](#)
 en el cáncer, [458](#)
 en el metabolismo de glucosa cerebral, [267](#)
- Transportadores mitocondriales, en la fosforilación oxidativa, [527-530, 527f-530f](#)
- Transportadores secundarios, [360-361, 360f](#)
- Transporte activo, [351](#). Véase también Transporte a través de membrana
 Transporte de fosfato, [530, 530f](#)
- Transporte de oxígeno, [187-188, 193-194, 194f](#)
- Transporte de proteínas, 880-883. Véase también Transporte en membranas
 Transporte en membranas a través del retículo endoplasmático, 880-882 activo, [351](#)
 bombas de iones, [351, 353, 354-360](#). Véase también Bombas de iones
 conductos acuosos, [374-375](#)
 conductos iónicos, [351, 362-371](#). Véase también Conductos iónicos
 energía libre, [353, 353f, 354](#)
 gradiente de concentración, [353](#)
 hidrólisis de ATP, [354-360](#)
 nexus (gap junction), [373-374, 373f, 374f](#)
 pasiva, [351, 353](#)
 potenciales de membrana, [353, 362, 362f, 371](#). Véase también Potencial de membrana
 señalización, 880-883
 transportadores ABC, [358-360, 358f, 359f, 359f](#)
 transportadores, [351-352, 360-361](#). Véase también Transportadores
 velocidad, [362, 362](#)
 vesículas de transporte, [882-883, 883f](#)
- Transporte inverso de colesterol, [744](#)
- Transporte pasivo, [351, 353](#). Véase también Transporte en membrana
 Trastornos sanguíneos, [296, 297](#)
- Tratamiento de los dolores asociados, capsaicina, [941](#)
- Treonil-tRNA sintetasa, centro activo, [863, 863-864](#)
- Treonina
 en la glicoproteínas, [316](#)
 estructura, [698, 698f](#)
 formación de piruvato, [667f, 668](#)
 síntesis, [698, 698f](#)
- Treonina desaminasa, [697-698, 697f](#)
- Treonina quinasa, [284-285, 285f, 285t](#)
- Treosa, [305f](#)
- Triacilglicerol(es), [617, 619-620](#)
 almacenamiento de energía, [619-620, 767f, 768](#)
 hidrólisis, [621-622, 621f, 768](#). Véase también Metabolismo de ácidos grasos
 movilización, [621-622, 621f](#)
 síntesis, [733-739, 733f, 734, 768](#)
 hepática, [744](#)
- transportador, [620, 620f, 743-744](#)
- Triadas catalíticas, [245-251](#)
 en la carboxipeptidasa H, [250, 250f](#)
 en la elastasa, [248-249, 249f](#)
 en la quimotripsina, [245-248, 249f](#)
 en la subtilisina, [249, 249f](#)
 en la tripsina, [248-249, 249f](#)
 mutagénesis detectada en un cenuro, [250-251, 250f](#)
- Triglicéridos. Véase Triacilglicerol(es)
- Trimetoprim, [223](#)
- Trimetoprim-sulfametoxazol, [223](#)
- Triosa fosfat isomerasa (TPI), [229-230, 230, 439](#)
 en la glicolisis, [436f, 438-440](#)
- Triosa quinasa, [449](#)
- Triosas, [304, 304f](#)
- Triosas fosfatos, en la síntesis de sacarosa, [573, 573](#)
- Tripsina, [207, 207f, 291](#)
 en la activación del zimógeno, [291, 291f](#)
 en la escisión de proteínas, [80, 80f, 81f, 291](#)
 estructura, [248, 249f](#)
 quimotripsina, [248, 249f](#)
 triada esacial, [248-249, 249f](#)
- Triptófano, [291](#)
- Triptófano, [672](#)
 degradación, [672, 672f](#)
 estructura, [694-697, 695f, 696f](#)
 formación de piruvato, [668](#)
 nicotinamida, [700f, 701](#)
 serotonina, [700f, 701](#)
 síntesis, [694-697, 695f, 696f](#)
- Triptófano sintasa, [695-697, 697](#)
- tRNA (RNA de transferencia), 119t, [120, 123, 124f](#). Véase también RNA
 anticodones, [859, 860, 860f, 861-862, 865](#)
 bases, [860, 860f](#)
 cargado, [862, 862f](#)
 codones, [859](#)
 en la traducción, [859-862, 871-876](#)
 centros de unión, [871-872, 871f](#)
 como molécula adaptadora, [859](#)
 en la elongación de la cadena, [872-873, 872f, 873f](#)
 en la iniciación, [871](#)
 función, [859](#)
 estructura, [124f, 859-862, 859f-861f](#)
 funciones, [120](#)
 iniciador, [879](#)
 inosina, [873](#)
 microhélice, [865](#)
 precursor, procesado, [840, 841f](#)
 procesado posttranscripcional, [832](#)
 secuenciación, [859-860, 859f](#)
 transcripción y procesado, [832, 840, 841f](#)
 translocación, [877-878, 878f](#)
 unión ribosómica de
 centros, [871-872, 872f, 873](#)
 mecanismo, [872-873, 872f](#)
- tRNA cargado, [862, 862f](#)
- tRNA iniciador, [879](#)
- Trombina, [207](#)
 γ-carboxilación, [284f](#)
 en la coagulación sanguínea, [293, 293f, 296-297](#)
 inhibidores, [296-297](#)
- Tromboxanos, [643, 643f, 644](#)
- Tropomiosina, [983](#)
- TTT (timidilato trifosfato), [725](#)
- Tubulina
 en los microtúbulos, [989-990, 989f, 990f](#)
 homología de secuencia, [990](#)
- α-Tubulina, [989-990, 989f, 990f](#)
- U**
- Ubiquinol, [512](#)
- Ubiquinona (coenzima Q), [509, 510](#)
 en el metabolismo de ácidos grasos, [624](#)
- Ubiquitina, [651-653](#)
 estructura, [651, 651-653](#)

- Ubiquitina proteína ligasa (E3), 652-653, 652f
 Ubiquitinación, 284t, 651-655
UCP-1, 533
UCP-2, 533
UCP-3, 533
 UDP (uridina difosfato), hidrólisis, 413
UDP-galactosa, 450, 450
UDP-glucosa, 450, 450
 en la síntesis de la glucosa, 604-607
 en la síntesis de sacarosa, 573, 573
 en la síntesis del glucógeno, 604-607
 estructura, 604, 604
UDP-glucosa fosforilasa, 604
 Umami, 927, 927f, 930
 UMP (uridina monofosfato), síntesis, 713
 Unidad reguladora 195, 653, 653f
 Unidades de medida
 factores de conversión, A1
 para la distancia, 7
 para la energía, 2
 prefijos, A1
 Unidades de un carbono
 en la degradación de aminoácidos, 690
 en la síntesis de aminoácidos, 689-690, 689t, 690f
 Unidades Svedberg (S), 76, 76f, 76t
 Unión cooperativa, 187-188, 188f, 189t, 280-281
 Unión de ligando
 constante de disociación, 1002-1003, 1002t
 en el desarrollo de fármacos, 1002-1003, 1002t
 en la expresión de genes, 898-899, 908
 Unión de péptidos, 93
 Unión de sustrato. Véase también Complejo enzima-sustrato
 cooperativa, 187-188, 188f, 280-281
 energía, 215-216, 242, 263-265. Véase también Energía de unión
 especificidad, 206-207, 207f, 263-266
 mecanismo concertado, 281
 modelo secuencial, 281
 Uniones Típ., 938-939, 938f
 Uniporte, 360-361, 360f
 Uracil-DNA glicosila, 809, 809f
 Uracilo, 109, 109
 en la reparación del DNA, 809
 timidilato, 720-721
 Urate
 degradación, 725, 725f
 en la gota, 726
 Urea, 59
 Uridilato, 713, 713, 832, 832
 Uridina, 109
 Uridina difosfato. Véase UDP (uridina difosfato)
 Uridina monofosfato (UMP), síntesis, 713
 Uridina trifosfato. Véase UTP (uridina trifosfato)
 Uroporfirinógeno III, 703, 703
 UTP (uridina trifosfato)
 en la síntesis del glucógeno, 593
 síntesis, 713

V
 Vacuna(s)
 HIV, 954, 960
 sintética, 148
 Valina

 degradación, 670-671
 en la enfermedad de la orina con sabor a arce, 673
 estructura, 28, 29f
 síntesis, 697-698
 Valoración o titulación, 16
 Valores de pK_a de grupos ionizables en proteínas, A2
 Variación genética, 20
 Vasopresina, 90, 91
 Vectores
 expresión, 153-154
 fago lambda (λ), 143, 144-145, 145f
 plasmido, 142-144, 144f
 viral, 144-145, 145f, 154-155
 Vectores de DNA, 142-145, 144f, 145f
 Vectores de expresión, 153-154
 Vectores de virus Vaccinia, 154-155
 Vectores plasmídicos, 142-144, 144f
 Vectores viricos, 144-145, 145f, 154-155
 de la leucemia murina de Moloney, 154
 Velocade (bortezomib), 651-655
 Velocidades de reacción, 216-225. Véase también Cinética
 aceleración catalítica, 206, 206t, 210-213, 213f
 definición, 216
 en reacciones catalizadas por enzimas, 217-225. Véase también Cinética de enzimas
 en reacciones de primer orden, 216-217
 en reacciones de pseudo primer orden, 217
 en reacciones de segundo orden, 217
 máxima, cálculo, 220
 Michaelis-Menten (K_m), 218-221
 Venenos
 hongos, 834-835, 835
 inhibición proteica, 885
 Vesículas
 formación, 346
 transporte, 882-883, 883f
 Vesículas de transporte, 882-883, 883f
 Vesículas lípidicas, 334-335, 334f
 Viagra (sildenafil), 1010
 descubrimiento, 1010-1011
 Vías de recuperación
 definición, 714
 en la síntesis de nucleótidos, 710, 710f, 714-718
Vibrio cholerae
 infección, 401-402
 transportador ABC, 358, 359f
 Vida media
 de fármacos, 1008
 de proteínas, 651, 651t
 Viost (rofecoxib), 1016, 1016, 1021
 Virus
 entrada a la célula, 321-323, 322f, 346
 HIV, 960, 969f
 mecanismos infecciosos, 50, 50f
 retrovirus, 969
 RNA, 118, 119f
 Virus de la gripe, 121-122
 Virus de la inmunodeficiencia humana, 960, 969f
 Virus de RNA, 118, 119f
 Virus del sarcoma de Rous, 400
 Visión, 931-937
 bastones, 931, 932, 932f
 color, 931, 935-937
 en animales, 936, 936f
 evolución, 936, 936f
 conos, 931, 935-936
 evolución, 936, 936f
 fotorreceptores, 931
 rodopsina, 937-938
 transdución de señales, 934-935, 934f
 Visión de colores, 931, 935-937. Véase también Visión
 defectos, 936-937
 en animales, 936, 936f
 evolución, 936, 936f
 Vitamina A (retinol), 424, 424f, 425
 deficiencia, relacionada con el alcohol, 778
 Vitamina B₁ (tiamina), 423t
 biosíntesis, 655, 655f
 deficiencia, 404
 Vitamina B₂, 423t
 Vitamina B₆ (ácido pantoténico), 423, 423t, 756
 Vitamina B₁₂ (cobalamina), 423t
 como coenzima, 628-630, 628f, 629f, 691-692
 en el metabolismo de ácidos grasos, 627-630, 630
 en la síntesis de aminoácidos, 628-630, 628f, 629f, 691-692
 estructura, 628, 628
 Vitamina C (ácido ascórbico), 424, 424f, 779, 779
 deficiencia, relacionada con el alcohol, 778
 formas, 779, 779
 Vitamina D (calciferol), 424-425, 424f
 deficiencia, 754-755
 fuentes, 755
 síntesis, 754-755, 754f
 Vitamina E (α-tocoferol), 424, 424f, 425
 en la prevención de la peroxidación de lípidos, 519
 Vitamina K, 424, 424t, 425
 deficiencia, 58, 295
 en la coagulación de la sangre, 295
 estructura, 295
 Vitamininas, 20-21
 B, 423, 423-424, 423t
 coenzima, 423, 423-424, 423t
 deficiencias, 423-424, 423t
 evolución, 423-424, 423t
 no coenzima, 424, 424-425, 424f
 transportador electrónico derivado, 422t, 423-425
 V_{max}
 cálculo, 220
 número de recambio, 221, 221t
 VO₄³⁻, 981
 VRI (receptor de capsaicina), 940-941, 940f
 v-SNARE, 347, 883
 v-Ser. en el cáncer, 400
 Vuelta en horquilla, 44, 44f
 en mRNA, 44, 44f, 123, 123f
 en la terminación de la transcripción, 829, 829f
 residuos aminoácidos, 52t, 53

Watson, James, 5, 111

Wiley, Don, 963

Wilkins, Maurice, 111

Withering, William, 352

Wyman, Jeffries, 189

X

Xantilato, 717, 717

Xantina, degradación, 725, 725f

Xantomas, 747

Xerodermia pigmentosa, 810

Xilosa, 305f

Xilulosa 5-fosfato, 571

en el ciclo de Calvin, 571, 571

en la ruta de las pentosas fosfato, 578f, 580

Xilulosa, 305, 306f

Y

Yanofsky, Charles, 913

Yodoacetamida, inhibición enzimática, 229, 229

Z

Zantac (ranitidina), 1017, 1017

ZAP-70, 965

Zimógenos, 288-297, 650

en la coagulación de la sangre, 293-297

funciones, 289

gástricos, 289, 289t, 650

pancreáticos, 289-292, 289f, 289t, 650

Zingibereno, 922, 922

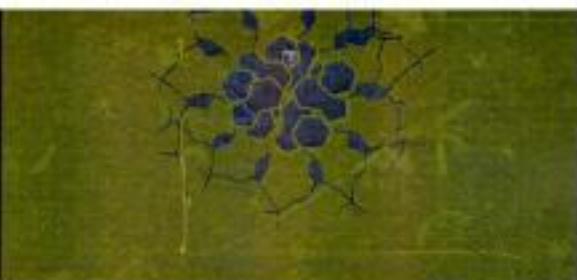
Zona de polipirimidinas, 843, 843f

Zona H, 982, 983f

Zwitteriones (iones dipolares), 27-28, 27f

Hidden page

Hidden page



BERG / TYMOCZKO / STRYER

Bioquímica