



***Proteólisis Intracelular:
Recambio Proteico***

José Neptuno Rodríguez López

Proteólisis Intracelular: Recambio Proteico

José Neptuno Rodríguez López

CONTENIDO

1. Recambio Proteico.
 - 1.1. Características cuantitativas.
 - 1.2. Explicaciones al recambio proteico.
 - 1.3. Señales químicas para el recambio.
2. Proteasas y Localización Celular
 - 2.1. Proteasas intracelulares: Clasificación.
 - 2.2. Mecanismos de control de las proteasas intracelulares.
3. Proteólisis Citosólica.
 - 3.1. Proteólisis dependiente de calcio: calpaínas.
 - 3.1.1. Aspectos generales.
 - 3.1.2. Estructura de las calpaínas.
 - 3.1.3. Activación de las calpaínas por calcio.
 - 3.1.4. Función fisiológica de las calpaínas.
 - 3.1.5. Implicación de las calpaínas en procesos patológicos.
 - 3.2. Proteólisis dependiente del sistema ubiquitina/proteosoma 26S.
 - 3.2.1. Ubiquitina.
 - 3.2.2. Enzimología de la ruta de ubiquitinación.
 - 3.2.3. El proteosoma.
 - 3.2.4. Regulación de procesos fisiológicos.
 - 3.2.5. Patologías asociadas al sistema ubiquitina/proteosoma.
 - 3.3. Proteólisis dependiente del proteosoma pero independiente de ubiquitina.
 - 3.3.1. Degradación de proteínas oxidadas por el proteosoma 20S.
 - 3.3.2. Ornitina descarboxilasa (ODC).
 - 3.4. Caspasas y apoptosis.
 - 3.4.1. Muerte celular programada (apoptosis).
 - 3.4.2. Caspasas: Ejecutoras de la apoptosis.
4. Proteólisis lisosómica.
 - 4.1. Proteólisis selectiva y no selectiva en los lisosomas.
 - 4.2. Catepsinas.
 - 4.2.1. Aspectos generales.
 - 4.2.2. Funciones de las catepsinas lisosómicas en el organismo.
 - 4.2.3. Implicación de la catepsinas en procesos patológicos.

Proteólisis Intracelular: Recambio Proteico

La concentración celular de cada clase de proteína es consecuencia del equilibrio entre su síntesis y su degradación. Aunque parece derrochador, la degradación y resíntesis continua de las proteínas, un proceso que recibe el nombre de recambio proteico, tiene varios fines. El primero de todos es la flexibilidad metabólica, que se consigue mediante cambios relativamente rápidos de la concentración de enzimas reguladoras, hormonas peptídicas y moléculas receptoras. El recambio proteico protege también a las células de la acumulación de proteínas anómalas. Finalmente, numerosos procesos fisiológicos dependen tanto de las reacciones de degradación oportunas como de las de síntesis. Un ejemplo destacado es el control del ciclo celular eucariota. La progresión de las células eucariotas a través de las fases del ciclo celular está regulada por la síntesis y degradación oportunas de una clase de proteínas que se denominan ciclinas. Las proteínas se diferencian de forma significativa en sus velocidades de recambio, que se miden como vida media (tiempo requerido para que se degrade el 50% de una cantidad específica de una proteína). Las proteínas que desempeñan funciones estructurales suelen tener una vida media más larga. Por ejemplo, algunas proteínas del tejido conjuntivo, como los colágenos, suelen tener una vida media que se mide por años. Por el contrario, la vida media de las enzimas reguladoras suele medirse en minutos. En los últimos años se ha realizado un gran avance en la elucidación de los mecanismos que controlan el recambio proteico. Las proteínas se degradan mediante enzimas proteolíticas que se encuentran por toda la célula. Entre ellas, las calpaínas activadas por Ca^{2+} y las catepsinas lisosómicas. Además, la ubiquitinación se cree que tiene una función fundamental en el recambio proteico. En la ubiquitinación varias moléculas de una proteína eucariota pequeña de 76 residuos que se denomina ubiquitina se unen covalentemente a algunas proteínas destinadas a la degradación. Una vez que la proteína está ubiquitinada, se degrada por un complejo proteolítico que se denomina proteosoma. A pesar de lo que se ha avanzado en los últimos años, no se conocen bien los mecanismos que dirigen a las proteínas a su destrucción por ubiquitinación o por otros procesos degradativos. Sin embargo, se piensa que la vida media de una proteína está parcialmente determinada por su resto N-terminal, por la existencia de secuencias determinadas (entre ellas las secuencias PEST) o por la presencia de restos de aminoácidos oxidados. Estos, y otros aspectos, que recogen los últimos descubrimientos, sobre la degradación intracelular de las proteínas, se discutirán en este tema.

1. RECAMBIO PROTEICO

Las proteínas se parecen a los intermedios metabólicos de bajo peso molecular, en el sentido de que están sujetas a una biosíntesis y degradación continua, en un proceso denominado recambio proteico. Para una proteína intracelular cuya concentración total no cambie con el tiempo, la concentración de estado estacionario se mantiene mediante la síntesis de la proteína a una velocidad suficiente para reponer las pérdidas producidas por la degradación de la proteína. Muchos de los aminoácidos liberados durante el recambio proteico se reutilizan en la síntesis de nuevas proteínas.

1.1 Características cuantitativas

Las dimensiones macroscópicas del recambio proteico pueden apreciarse considerando un día de la vida de una persona de 70 kilogramos de peso. Habitualmente esta persona consume 100 g de proteínas diarias y, puesto que el balance de nitrógeno está en estado estacionario, excretará una cantidad equivalente de productos nitrogenados terminales. Sin embargo, los estudios de marcaje isotópico indican que se sintetizan unos 400 g de proteínas al día y que se degradan 400 g. Aproximadamente tres cuartas partes de los aminoácidos liberados se reutilizan en la síntesis proteica, y los demás se degradan y se excreta el nitrógeno. Así pues, el conjunto total de aminoácidos consiste en 500 g/día, 100 ingeridos y 400 liberados a

través de la degradación proteica. De este conjunto, 400 g se utilizan en la síntesis proteica y 100 g se catabolizan y se excretan.

Las diversas proteínas presentan una enorme variabilidad en cuanto a sus tiempos de vida metabólica o vida media (tiempo requerido para que se degrade el 50% de una cantidad específica de una proteína), que va de pocos minutos a muchos meses. Se han realizado numerosos experimentos de pulso y caza en animales de laboratorio, que indican que la degradación proteica sigue una cinética de primer orden. Para una determinada proteína, las moléculas individuales se degradan de forma aleatoria, de tal modo que una representación semilogarítmica del isótopo que queda en la proteína respecto al tiempo es lineal. Así, se puede determinar la vida media de una proteína. La vida media de algunas proteínas se puede visualizar en la Tabla 1. Como cabría esperar, las proteínas que se secretan a un medio extracelular, como las enzimas digestivas, las hormonas polipeptídicas y los anticuerpos, tienen un recambio metabólico bastante rápido, mientras que las proteínas que desempeñan un papel predominantemente estructural, como el colágeno del tejido conjuntivo, son metabólicamente mucho más estables. Las enzimas que catalizan pasos limitantes de la velocidad de las rutas metabólicas tienen también una corta vida media. De hecho, para muchas enzimas, la velocidad

TABLA 1. Vida media y localización de la degradación de algunas proteínas

Vida media (horas)	Localización intracelular			
	Núcleo	Citosol	Mitocondrias	Retículo endoplásmico y membrana plasmática
< 2	Productos de oncogenes	Ornitina descarboxilasa, tirosina aminotransferasa, proteína quinasa C	Ácido δ -aminolevulínico sintetasa	HMG-CoA reductasa
2-8		Triptófano oxigenasa, proteína quinasa dependiente de cAMP		γ -Glutamil transferasa
9-40	Ubiquitina	Calmodulina, glucoquinasa		Receptor LDL, citocromo P-450
41-200	Histona H1	Lactato deshidrogenasa, aldolasa, dihidrofolato reductasa, citocromo P-670		Citocromo b ₅ , cit b ₅ reductasa
> 200	Histonas H2A, H2B, H3, H4	Hemoglobina, glucógeno fosforilasa, colágeno		Receptor de acetilcolina

de degradación constituye un factor de regulación importante en el control de las concentraciones enzimáticas intracelulares. En cambio, las proteínas que no constituyen puntos de control metabólico tienen un recambio relativamente lento.

1.2 Explicaciones al recambio proteico

Como se ha explicado anteriormente, diariamente se hidrolizan cerca de 400 g de proteína tisular y se remplazan por proteínas de nueva síntesis. Este recambio supone unas necesidades metabólicas significativas, puesto que la adición de cada aminoácido a la cadena polipeptídica consume una gran cantidad de ATP. Este requerimiento de energía supone de un 15 a un 20% del consumo metabólico basal. Entonces ¿por qué deben sufrir estas proteínas un recambio si su degradación no representa un mecanismo de control metabólico? ¿No es este recambio una pérdida inútil de energía? Algunas explicaciones para el recambio proteico se explican a continuación:

(1) **Control de calidad:** Como todos los demás componentes intracelulares, las proteínas pueden sufrir alteraciones, fundamentalmente oxidaciones por especies reactivas de oxígeno (ROS), que afectan a su estructura, conformación y/o actividad biológica. Al contrario, que para otros componentes celulares, como los ácidos nucleicos, la capacidad de las proteínas para reparar el daño causado es limitada. El recambio proteico supone un control de calidad en el que el carácter aleatorio del proceso implica que se degradan y sustituyen proteínas tanto normales como modificadas. Sin embargo, algunos estudios recientes indican que el proceso no es aleatorio, ya que las moléculas de proteína que se han alterado químicamente son las que se degradan de manera preferente. Un cierto cambio químico puede marcar a una molécula proteica, haciendo que pase a ser el objetivo

de una enzima proteolítica que identifica específicamente el marcador y que se encargará de degradarla.

Aunque queda mucho por averiguar respecto a la degradación intracelular de las proteínas, es mucho lo que se ha descubierto durante la última década. Se conoce que en las bacterias, las proteínas mutantes se degradan con mayor rapidez que las correspondientes proteínas de tipo salvaje. Evidentemente la evolución ha generado proteínas cuya conformación les confiere una máxima estabilidad en el medio intracelular, y la mayor parte de los cambios estructurales reducen esta estabilidad.

(2) **Regulación de etapas metabólicas:** Está explicación se deduce de la observación de las vidas medias de las proteínas y se ha discutido con anterioridad. Mediante el recambio proteico la concentración y, en consecuencia, la actividad de una enzima puede ser modificada. Enzimas que juegan un papel clave en la regulación de vías metabólicas tienen vidas medias particularmente cortas.

(3) **Adaptación celular:** Mediante el recambio de proteínas las células pueden adaptarse a cambios en las condiciones ambientales. Así, por ejemplo, en muchas bacterias la proteólisis intensa es uno de los fenómenos metabólicos interrelacionados con la esporulación. Las esporas son una forma termoestable del microorganismo que tiene un metabolismo mínimo y puede permanecer latente durante meses o años. Cuando las condiciones metabólicas inducen la esporulación de una célula en crecimiento, se produce un amplio recambio proteico, y los aminoácidos liberados se utilizan para sintetizar las proteínas de la espora.

(4) **Mecanismos fisiológicos:** Numerosos procesos fisiológicos dependen tanto de las reacciones de degradación oportunas como de las de síntesis. Entre

los ejemplos destacados se encuentra el control del ciclo celular eucariota y la presentación antigénica. La progresión de las células eucariotas a través de las fases del ciclo celular está regulada por la síntesis y degradación oportunas de una clase de proteínas que se denominan ciclinas. En la presentación antigénica determinadas células del sistema inmunitario (por ejemplo los macrófagos) capturan sustancias anormales o ajenas. La mayoría de las moléculas que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria, que se denominan antígenos, son polipéptidos o proteínas. El antígeno degradado parcialmente se transfiere a la membrana plasmática del macrófago donde se utiliza para activar determinados linfocitos T (células T) mediante interacciones célula-célula. Las células T son los reguladores principales de la respuesta inmunitaria corporal.

(5) **Procesos patológicos:** En múltiples enfermedades genéticas humanas se puede ver la importancia de la degradación de proteínas anómalas. En varias anemias hereditarias, un gen mutante determina la síntesis de moléculas anómalas de hemoglobina, que no se pliegan adecuadamente y se destruyen inmediatamente después de su síntesis. Otras enfermedades podrían ser, en parte, resultado de un fracaso de la degradación intracelular de proteínas anómalas. Hay conjunto de proteínas mal plegadas que se acumulan en determinadas neuronas del cerebro de sujetos con la enfermedad de Parkinson, la de Huntington o la de Alzheimer. Se están realizando muchos esfuerzos para averiguar por qué en las neuronas de estos individuos se dejan de degradar las proteínas anormales.

1.3 Señales químicas para el recambio

Las tasas de recambio de las distintas proteínas varía hasta 1000 veces, mientras que las diferencias de estabilidad de las proteínas, medidas según la desnaturalización *in vitro*, pueden ser mucho menores. En la actualidad se conocen hasta seis características estructurales a las que se consideran factores determinantes de la tasa de recambio: ubiquitinación, oxidación de determinados residuos, secuencias PEST, cajas de destrucción de ciclinas, determinados residuos N-terminales y la presencia del pentapéptido KFERQ.

(1) **Ubiquitinación:** La ubiquitina es una proteína pequeña (76 aminoácidos) que se encuentra en todas las células eucariotas y debe su nombre a su amplia distribución. Pertenece a una clase de proteínas que se denominan proteínas de agresión o proteínas de choque térmico (hsc), ya que su síntesis se acelera o se inicia cuando las células son agredidas. La ubiquitina experimenta una reacción dependiente de ATP con las proteínas, que condensa los residuos de glicina C-terminales de la ubiquitina con grupos amino de lisina de la proteína a marcar. Estas proteínas modificadas se degradan poco después por

un complejo proteo-lítico (proteosoma 26S) que reconoce al marcador ubiquitina. Este proceso se ha denominado como “*el beso de la muerte*” y su mecanismo se describirá con más detalle en otros apartados de este tema. Lo cierto es que todavía no está claro qué determina que una proteína sea marcada por la ubiquitina, aunque parecen intervenir aspectos estructurales, entre los que se podían encontrar algunos de los que se describen a continuación.

(2) **Residuos oxidados:** Los residuos de aminoácidos oxidados (es decir los residuos que están alterados por oxidasas o por ataque de ROS) promueven la degradación proteica. Earl Stadtman y sus colaboradores han demostrado que muchas proteínas experimentan una oxidación en determinados residuos promovida por condiciones que generan ROS. Algunos metales como el Fe^{2+} es esencial en el proceso y los residuos de lisina, arginina y prolina los más susceptibles a la oxidación. Estas modificaciones marcan a estas proteínas para su posterior degradación por las proteasas citosólicas. Un ejemplo reciente es el aislamiento de una proteasa en *Escherichia coli* y en el hígado de rata, que es capaz de degradar *in vitro* a la glutamina sintetasa oxidada pero no ataca a la enzima nativa. La acumulación de proteínas con daños oxidativos más allá de la capacidad de la célula para degradarlas y sustituirlas, parece que contribuye de manera importante al envejecimiento celular.

(3) **Secuencias PEST:** Proteínas con una vida media menor de 2 horas son ricas en regiones que contienen los aminoácidos prolina, glutamato, serina y treonina (P, E, S y T, respectivamente). A estas regiones, de entre 12 y 60 residuos de longitud, se las conoce como secuencias PEST. Son muy pocas las proteínas de vida media larga que contienen estas regiones. Parece probable que las regiones PEST formen parte de un esquema de reconocimiento para los sistemas enzimáticos que degradan las proteínas de vida media corta, que posiblemente incluya el sistema de marcado de la ubiquitina.

(4) **Ciclinas y cajas de destrucción:** Las ciclinas son proteínas relacionadas con el control del ciclo celular de eucariotas que han de ser degradadas para que la célula continúe desde metafase a anafase. Se trata, pues, de una degradación muy controlada, dependiente de un paso previo de marcado de la ciclina con ubiquitina. En casi todas las ciclinas se ha localizado una secuencia señal (*caja de destrucción*) formada por 9 aminoácidos (RAALGNISN) que se encuentra presente entre los residuos 13 y 66 de la secuencia proteica.

(5) **Residuos N-terminales:** El residuo N-terminal de una proteína es parcialmente responsable de su susceptibilidad a la degradación. Un residuo N-terminal de Phe, Leu, Tyr, Trp, Lys, Arg, Ile o His esta relacionado con una vida metabólica corta,

mientras que las proteínas con otros amino terminales tienen una vida más prolongada. Otros grupos N-terminales producen desestabilización de la proteína tras su modificación. La dependencia de la vida media de una proteína con su extremo N-terminal se indica en la Tabla 2. Estas observaciones, que se realizaron inicialmente en proteínas naturales, se han visto confirmados por experimentos en los que se alteró el residuo N-terminal mediante mutagénesis dirigida, lo cual produjo cambios correspondientes de la vida media de las proteínas mutantes. En algunos casos, parece ser, que este factor también implica al sistema de la ubiquitina.

TABLA 2. Dependencia de la vida media de proteínas citosólicas de levadura en función de la naturaleza de su residuo N-terminal

Residuos muy estabilizadores ($t_{1/2} > 20$ horas)			
Ala	Cys	Gly	Met
Pro	Ser	Thr	Val
Residuos desestabilizadores por sí mismos ($t_{1/2} =$ entre 2 y 30 minutos)			
Arg	His	Ile	Leu
Lys	Phe	Trp	Tyr
Residuos desestabilizadores tras su modificación química ($t_{1/2} =$ entre 3 y 30 minutos)			
Asn	Asp	Gln	Glu

(6) **Pentapéptido KFERQ**: Son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para su proteólisis lisosomal, siendo esta secuencia una de las señales para que las proteínas entren en los lisosomas. Este marcaje de proteínas no está relacionado con la ubiquitina, pero existen otras hsc (hsc73 citosólica e intralisosómicas) que reconocen estas secuencias.

2. PROTEASAS Y LOCALIZACIÓN CELULAR

Dado que la mayor parte de las proteínas se utilizan intracelularmente, la mayoría se recambian dentro de la célula. Las primeras proteasas intracelulares que se caracterizaron fueron las que se encuentran en los lisosomas. Sin embargo, es evidente que las proteínas se degradan en todos los compartimentos celulares principales, puesto que hay enzimas proteolíticas en todas las partes de la célula. En las células eucariotas se ha encontrado al menos cuatro sistemas de proteólisis citosólica unas proteasas activadas por el Ca^{2+} denominadas **calpaínas**, una proteasa neutra de gran tamaño (700 kilodaltons) de múltiples subunidades (**proteosoma 20S**), otra proteasa aún

más grande dependiente de ATP denominada **proteosoma 26S** y las proteasas responsables del proceso de apoptosis, las **caspasas**. Estas enzimas son distintas de las proteasas lisosómicas, denominadas **catepsinas**, que están diseñadas para actuar en un medio ácido. Aunque se está trabajando en definir las funciones específicas de cada una de estas proteasas, parece probable que las proteínas extracelulares captadas por la célula y las proteínas celulares de larga duración se degradan en los lisosomas, mientras que en otros compartimentos se produce el recambio proteico selectivo en relación con la regulación metabólica.

Los lisosomas, que se forman por gemación a partir del complejo de Golgi, son bolsas de enzimas digestivas, que contienen proteasas, nucleasas, lipasas y enzimas de degradación de hidratos de carbono. Desempeñan diversas funciones celulares como la secreción de enzimas digestivas, digestión de orgánulos destinados a la destrucción, digestión de partículas alimentarias o bacterias capturadas mediante fagocitosis, o liberación intracelular de enzimas seguida de autólisis, digestión y muerte de una célula como parte del proceso morfogénico normal del desarrollo. Así, por ejemplo, la membrana que existe entre los dedos de los pies y entre los dedos de las manos en la fase fetal inicial del ser humano se destruye mediante este tipo de muerte celular programada.

A diferencia de las enzimas lisosómicas, que generalmente se encuentran secuestradas de forma segura en sus vesículas, toda actividad proteasa libre en el citosol debe de estar bajo un estricto control, de forma que ataque sólo a aquellas proteínas que es necesario destruir (proteínas dañadas, mutantes o prescindibles). Además, aunque la proteólisis está termodinámicamente favorecida, gran parte del recambio proteico intracelular requiere una cantidad considerable de ATP. Algunos trabajos recientes indican que el proteosoma tiene una estructura tubular y que es necesaria energía tanto para marcar proteínas para la degradación como para desplazarlas al interior del tubo y a través del mismo. A continuación, se pasará a clasificar a las proteasas intracelulares y se describirán los mecanismos generales de regulación de estas enzimas. Los descubrimientos recientes sobre las proteólisis lisosómica y citosólica, por su gran importancia, se describirán en apartados independientes de este tema.

2.1 Proteasas intracelulares: Clasificación.

Desde un punto de vista molecular, la degradación intracelular de proteínas ocurre debido a la existencia de proteasas activas dentro de la célula. Para su clasificación se ha adoptado un criterio similar al utilizado para la clasificación de las enzimas extracelulares que participan en procesos como la

digestión, la coagulación sanguínea y fibrinólisis o el remodelado de tejidos. Si bien, una correcta clasificación de las proteasas implica su división inicial en endo- o exo-proteasas, para una mayor comprensión y simplificación, las proteasas intracelulares se han dividido en cuatro clases atendiendo a su mecanismo de acción (la Tabla 3 recoge una clasificación completa de las proteasas intracelulares):

(1) **Serín-proteasas:** Esta clase de proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos adyacentes a los aminoácidos aromáticos (actividad tipo quimotripsina), básicos (tipo tripsina) o ácidos (tipo caspasa). Tres residuos de aminoácidos son esenciales para el proceso catalítico (His, Asp y Ser o Thr). El mecanismo de acción de la enzima implica un paso rápido de acilación cuando el extremo carbonilo del enlace peptídico diana se transfiere a la enzima para formar un aducto acil-enzima y el extremo amino del sustrato abandona el centro activo. A continuación se produce una desacilación lenta, que libera el extremo carboxilo terminal. El mecanismo de reacción y el papel de los aminoácidos implicados se puede observar en la Figura 1.

Las **catepsinas A y G** son proteasas lisosómicas que pertenecen a esta clase. La catepsina G se trata de una endopeptidasa, mientras que la catepsina A hidroliza a las proteínas a partir de su extremo carboxilo terminal (carboxipeptidasa). La **catepsina R** de origen ribosomal también es una serín-proteasa.

TABLE 3: Clases de proteasas intracelulares

Clase	Ejemplos
Serín-proteasas	Catepsina A, G y R, Uroquinasa, Proteosoma (Treonín proteasa).
Cisteín proteasas	Catepsinas B, B2, C, H, I, J, K, L, M, N, O, P, S, T y X. Calpaínas I y II. Caspasas
Aspartato-proteasas	Catepsinas D y E.
Metaloproteasas	Gelatinasas A y B. Catepsina III. Collagenasas. Insulinasa

Dentro de esta clase también se clasifica al **proteosoma** (proteosomas 20S y 26S) ya que comparten un mecanismo catalítico similar, pero donde la serina esencial es sustituida por una treonina. Por este motivo, a los proteosomas también se les denomina treonín-proteasas. Su mecanismo de acción se discutirá con más detalle en otros apartados del tema.

(2) **Cisteín-proteasas.** Poseen en su centro activo una cisteína y una histidina formando un par iónico, lo que produce un tiol altamente nucleofílico. La presencia de estos dos grupos iónicos en el centro activo es consistente con las curvas de dependencia de pH observadas para estas proteasas, con un pK_a ácido (3,6) atribuido a la ionización de la Cys y un pK_a básico (8,5) atribuido al grupo imidazol de la His. Sólo la forma con el par iónico es activa, actuando la His como un catalizador ácido-base y produciendo intermedios tetraédricos denominados THI₁ y THI₂. En la primera reacción la enzima queda acilada mediante un enlace tioéster con el grupo carboxilo de la proteína sustrato. Después se produce una desacilación y se cierra el ciclo generando la enzima activa. La **catepsina B** pertenece a esta clase y los residuos activos han sido localizados (His199 y Cys29). Esta catepsina posee dos actividades proteolíticas; una dipeptidilcarboxipeptidasa y una endopeptidasa. El mecanismo de acción de las cisteín-proteasas se detalla en la Figura 2.

La mayoría de las catepsinas lisosómicas son cisteín proteasas (catepsinas B, H, L, S, etc). Las **caspsas**, proteínas implicadas en la apoptosis o muerte celular programada, también pertenecen a esta clase de proteasas. Además, también se incluyen en esta clase a las **calpaínas**, proteasas citosólicas dependientes de Ca²⁺.

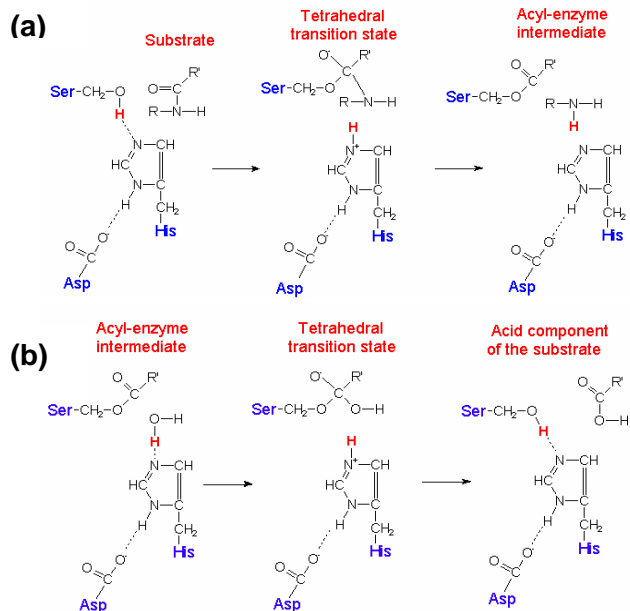


FIGURA 1. Catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por una serín-proteasa. La triada catalítica participa en la formación de un intermedio acilenzima (a) y su subsiguiente ruptura mediante una ruta de desacilación (b).

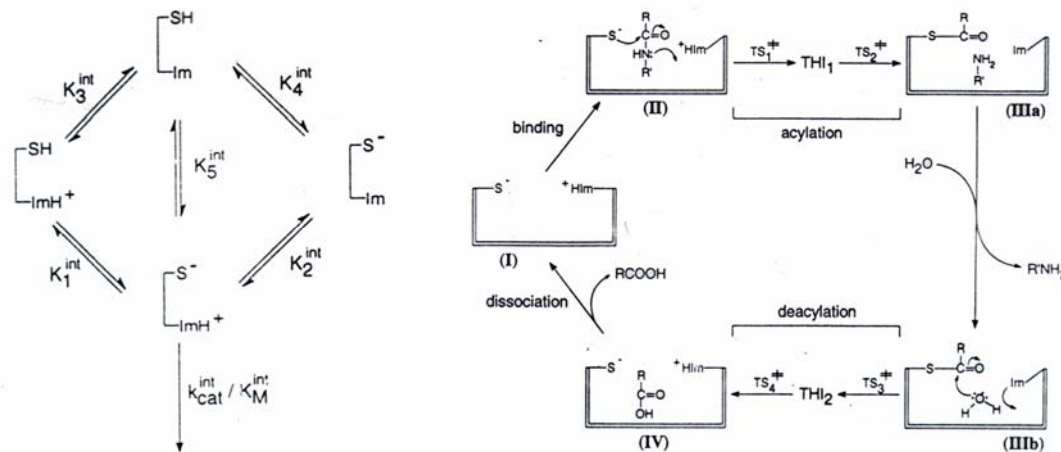


FIGURA 2. Mecanismo catalítico de las cisteín-proteasas. Estados de ionización del par iónico Cys-His y mecanismo de acilación/desacilación de la enzima. Mecanismo propuesto para la papaína y similar al que realizan otras proteasas intracelulares como algunas catepsinas y las calpaínas I y II (Storer y Ménard, 1994)

(3) **Aspartato-proteasas:** Estudios cristalográficos han demostrado que estas enzimas suelen ser diméricas, aportando cada uno de los monómeros un residuo de aspártico para la catálisis. Estos dos grupos se encuentran geoméricamente próximos formando el centro activo de la enzima. El pK_a de los grupos carboxilos de estos aspárticos es crucial para la catálisis, así, uno de ellos está ionizado mientras que el otro permanece desionizado en el rango de pH óptimo de la enzima (pH 2-3). El aspártico desprotonado actúa como una base aceptando un protón de una molécula de agua, mientras que el aspártico protonado actúa como un ácido, donando un protón al oxígeno carbonílico de la proteína sustrato. Este mecanismo lleva a la consecuente ruptura del enlace CO-NH y se observa en el esquema de la Figura 3.

La **catepsinas D y E** son proteasas lisosómicas pertenecientes a esta clase de proteasas.

(4) **Metaloproteasas:** Son un grupo de proteasas que contienen Zn como grupo prostético. Además del Zn otros componentes del centro activo son dos Glu y una His. La **catepsina III**, una aminopeptidasa citosólica, pertenece a esta clase de proteasas. Otras metaloproteasas que se encuentran implicadas en procesos patológicos como cáncer, reumatismo, etc, son las colagenasas y las gelatinasas, sin embargo no se tratarán en este tema ya que son proteasas que se excretan al medio extracelular. La insulina, presente en los lisosomas y en el citosol, es responsable de la inactivación de insulina y se ha clasificado dentro de esta clase de proteasas.

2.2 Mecanismos de control de las proteasas intracelulares

Las proteasas son enzimas altamente peligrosas para la integridad celular, por lo que deben estar fuertemente reguladas. Una visión global de los mecanismos de control de las proteasas intracelulares se discuten a continuación (Figuras 4 y 5). Aspectos más específicos sobre el control de algunas proteasas se tratarán con más detalle en otras secciones. Los

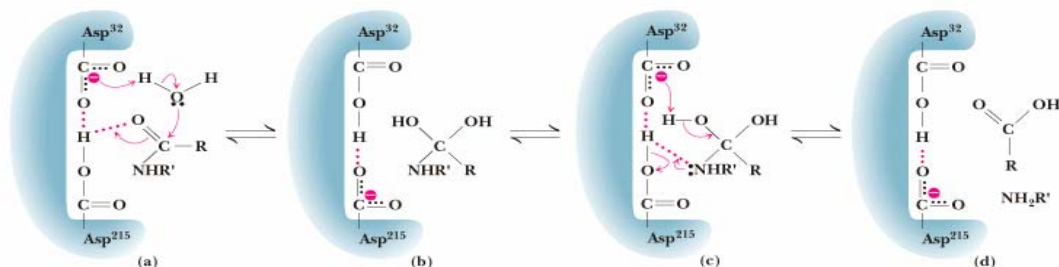


FIGURA 3. Mecanismo catalítico de las aspartato-proteasas. Mecanismo basado en la actuación de pepsina. El Asp32 tiene un pK_a de 1,4 estando desprotonado al pH óptimo de la enzima y actuando como una base. El Asp215 actúa como un ácido ya que su pK_a es 4,3 y estaría protonado.

distintos niveles de control de las proteasas intracelulares son:

(1) **Proteasas altamente específicas:** Se han descrito unos cuantos ejemplos de proteasas que degradan solamente unos cuantos enlaces peptídicos de una determinada proteína sustrato, mientras que el resto de enlaces serían hidrolizados por proteasas menos específicas. Esto no es una explicación general a la diversidad de la proteólisis intracelular, ya que deberían de existir un amplio número de proteasas.

(2) **Regulación a nivel genético:** La síntesis de algunas proteasas esta fuertemente controlada a nivel de la transcripción o traducción génica, en la estabilidad de su ARN_m, etc.

(3) **Formación de zimógenos:** La formación de precursores inactivos que son posteriormente activados por pH u otras enzimas proteolíticas es un sistema preferencial en el control de las proteasas. Los fenómenos de activación de zimógenos suponen la ruptura de uno o más enlaces peptídicos en la porción N-terminal, así, por ejemplo la procatepsina B es activada mediante su ruptura múltiple catalizada por la catepsina D o L. En otros casos, los zimógenos son activados por simples cambios conformacionales que dejan expuesto su centro activo. Así, los zimógenos de las aspartato-proteasas experimentan un cambio conformacional, necesario para su activación, cuando se exponen a bajo pH.

(4) **Otras vías de control:** Las formas maduras de las proteasas son controladas por (a) pH; (b) modificaciones post-transduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, oxidaciones); (c) por su localización (lisosomas, organulos de secreción, membranas) (d) por interacción con Ca²⁺; (e) por unión a activadores o inhibidores, y por último, (f) por degradación proteolítica de la propia proteasa.

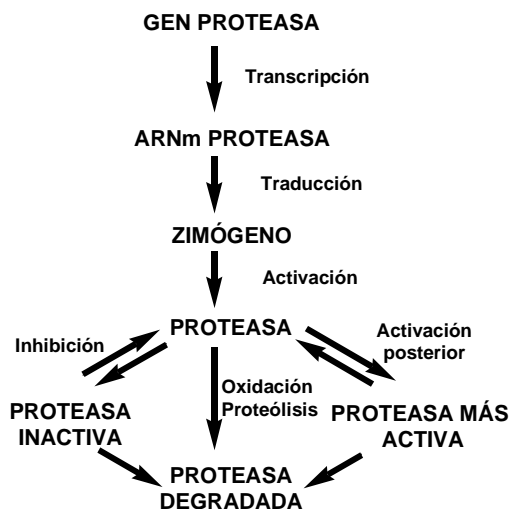


FIGURA 4. Visión general del control de las proteasas

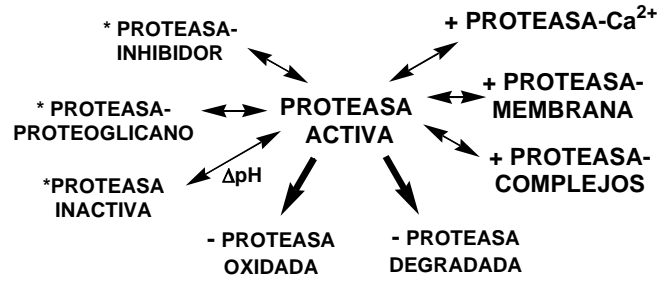


FIGURA 5. Sitios de control de la actividad proteolítica. (*) inactivación reversible, (-) proteasas degradadas o irreversiblemente inactivadas, (+) proteasa con mayor actividad.

En la Tabla 4 se discuten los mecanismos de control preferenciales de algunas proteasas dependiendo de su modo de acción.

3. PROTEÓLISIS CITOSÓLICA

Como se describió en la sección anterior, el citoplasma de la célula es un sitio preferencial de proteólisis. En la actualidad se conocen cuatro sistemas de degradación proteica en el citoplasma. Uno de ellos es dependiente de Ca²⁺ y es llevado a cabo por las **calpaínas**. Los otros dos sistemas dependen de un complejo proteico denominado proteosoma. Si bien estos dos últimos mecanismos de degradación se encuentran en continua discusión, se ha determinado que en ciertas células existe un complejo proteolítico multifuncional (de aproximadamente 650-720 kDa) que degrada proteínas por un sistema independiente de ubiquitina. Este sistema que se conoce como **MPC** o **proteosoma 20S**, degradaría proteínas que han sido dañadas pero que no han sido marcadas con la ubiquitina. Otra posibilidad es que el proteosoma 20S se convierta, mediante ATP y la adición de determinados factores proteicos, en un complejo que degrada específicamente proteínas que han sido marcadas con la ubiquitina. A este complejo, de aproximadamente 2.000 kDa, se le denomina **proteosoma 26S**. Un cuarto sistema de degradación citosólica incluiría a la **caspasas**.

3.1 Proteólisis dependiente de iones calcio: Calpaínas

3.1.1 Aspectos generales

Las calpaínas (EC 3.4.22.17) son una familia de cisteín-proteasas citosólicas relacionadas con el procesamiento de proteínas del citoesqueleto, la diferenciación celular y la apoptosis. El control de la actividad de estas proteasas está determinado por las concentraciones de Ca²⁺ y por la presencia de calpastatina (que por el momento es el único inhibidor endógeno conocido). La primera calpaína fue descubierta en 1964 y su nombre se debe a su dependencia al Ca²⁺ y a su analogía con la papaína.

TABLA 4. Mecanismos de control de las cuatro clases de proteasas

Mecanismo de Control	Serín-proteasas	Cisteín-proteasas	Metaloproteasas	Aspartato-ptoteasas
Síntesis	Síntesis puede ser estimulada	Síntesis puede ser estimulada	Estimulación de la síntesis es un mecanismo de regulación principal	Síntesis puede ser estimulada
Activación de Zimógenos	Mecanismo de control principal excepto para catepsina G	La mayoría son activadas durante su procesamiento	La mayoría son secretadas como zimógenos	Catepsina D es activada durante su procesamiento
Modificaciones post-transduccionales	La uroquinasa es fosforilada	Glicosilación marca a estas proteasas para ser llevadas a los lisosomas	Glicosilación para su excreción	Glicosilación marca a estas proteasas para dirigirlas a los lisosomas o vesículas de secreción
Confinamiento	Importante sólo para las que son secretadas	Importante para las proteasas lisosomales	Importante sólo para las que son secretadas	Importante para las que son secretadas o las lisosómicas
Localización en membranas	Importante para uroquinasa	Mecanismo de regulación principal para calpaínas	Puede ser importante para enzimas de esta clase que participen en metástasis	Catepsina E se encuentra en las membranas
pH	Usado como control en las lisosómicas	Usado como control en las lisosómicas	Controla los niveles de actividad	Controla a catepsina D en los lisosomas
Calcio	Estabiliza a casi todas las proteasas de esta clase	Estabiliza a casi todas las proteasas de esta clase. Activa a las calpaínas	Estabiliza a casi todas las proteasas de esta clase	No es un importante factor de control
Proteoglicanos	Importante en lisosomas y vesículas de secreción	Importante en lisosomas y vesículas de secreción	No es un importante factor de control	Importante en lisosomas y vesículas de secreción
Inhibidores	Importante	Importante	Importante	Importante
Degradación	Importante	Importante	Importante	Importante

TABLA 5. Propiedades moleculares de las calpaínas		
	μ -Calpaína	m-Calpaína
Mw	110.188	108.304
Mw subunidad mayor	81.890	80.006
Mw subunidad menor	28.316	28.316
pH óptimo	7,5	7,6
[Ca ²⁺] para 50% actividad (μ M)	5-50	200-1000
[Ca ²⁺] unión de calpastatina (μ M)	42	400
pI	5,36	4,94

Las calpaínas, que están fuertemente reguladas por su unión a membranas y actúan a pH neutro, han sido encontradas en casi todos los organismos, desde mamíferos hasta *Drosophila melanogaster*, así como en levaduras y bacterias, pero no han sido detectadas en plantas. En la actualidad se han identificado hasta 12 diferentes calpaínas en mamíferos que se expresan en todas las células (como son m- and μ -calpaínas) o en un tejido concreto (como por ejemplo, la calpaína p94, expresada en el músculo esquelético). La m- y μ -calpaínas son las mejor caracterizadas y se diferencian en sus afinidades por Ca²⁺, así μ -calpaína (también llamada calpaína I) requiere concentraciones micromolares de calcio para su activación (5-50 μ M) mientras que m-calpaína (calpaína II) es sólo activada por concentraciones milimolares (0.2-1 mM).

3.1.2 Estructura de las calpaínas

Tanto la m- como la μ -calpaína son heterodímeros formados por una subunidad mayor de 78-80 kDa (subunidad catalítica) y una más pequeña de 29 kDa (subunidad reguladora). La subunidad mayor está formada por cuatro dominios (dI-dIV), mientras que la subunidad pequeña tiene dos dominios (dV y dVI) (Figura 6). La estructura de la m-calpaína humana en ausencia de Ca²⁺ ha sido resuelta, recientemente, por difracción de rayos X (Figura 6). El dominio dI es un α -hélice anclada en una cavidad de dIV y que contribuye a la estabilidad de la proteína. El dominio dII (que ha sido dividido en dos subdominios dIIa y dIIb) contiene una secuencia similar a la detectada en el centro activo de la papaina. Los aminoácidos implicados en la catálisis han sido identificados por mutagénesis dirigida (Cys105, His262 y Asn286). Estos residuos permiten el mecanismo de catálisis general ácido-base descrito para las cisteín-proteasas (Figura 2). El dominio dIII está formado por ocho láminas β y tiene homología con una región de la

proteína quinasa C, la cual se conoce que interacciona con Ca²⁺ y fosfolípidos de membrana. En concreto, se ha propuesto, que una zona ácida (acidic loop) dentro de dIII, podría tener un importante papel en la activación de calpaína por Ca²⁺. Los dominios dIV y dVI son dominios de unión al Ca²⁺ (contienen cinco secuencias EF-hand), y son los responsables de la dimerización de las dos subunidades. El dominio dV de la subunidad pequeña es la parte N-terminal y contiene secuencias formadas por múltiples residuos de Gly, inusualmente largas. Si bien, la resolución de la estructura cristalina de m-calpaína permite explicar porqué la proteína es inactiva en ausencia de Ca²⁺, no explica cual es el mecanismo de activación por este catión.

3.1.3 Activación de calpaínas por calcio

Hasta el momento existen muchas dudas sobre el mecanismo de activación de las calpaínas por Ca²⁺. Lo más desconcertante es que ambas calpaínas (m- y μ -calpaína) son activadas por concentraciones de Ca²⁺ que nunca se encuentran en condiciones fisiológicas (aproximadamente menor de 1 μ M), por lo tanto otros factores deben de hacer que estas proteínas requieran menores concentraciones de Ca²⁺ *in vivo*. Relacionado con este hecho podría estar el que μ -calpaína es activada una vez unida a lípidos de membrana. Así, se especula que una vez unido el Ca²⁺ al dominio dIV se produciría una serie de procesos como (a) translocación de la enzima a la membrana plasmática; (b) autólisis de las dos subunidades (Figura 6) y (c) disociación de las dos subunidades. Estos procesos cambiarían el requerimiento de Ca²⁺ catalítico a concentraciones fisiológicas (0.1-1 μ M), pero también sugiere la existencia de otros sitios catalíticos de unión al calcio.

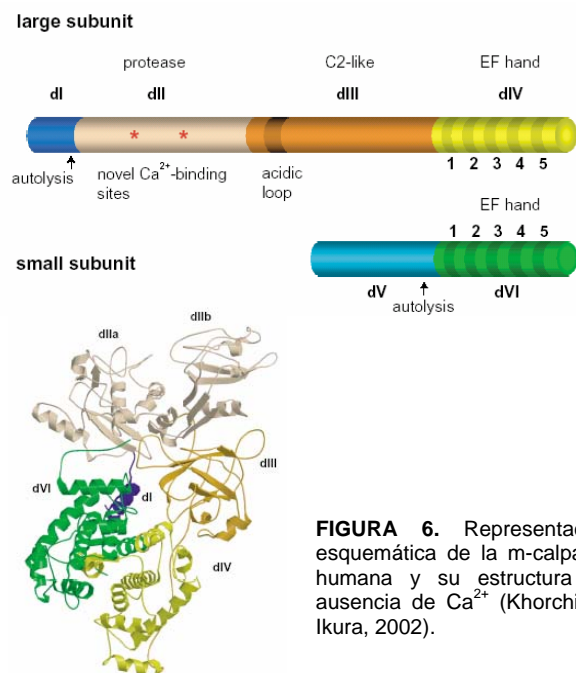


FIGURA 6. Representación esquemática de la m-calpaína humana y su estructura en ausencia de Ca²⁺ (Khorchid e Ikura, 2002).

TABLA 6. Implicaciones de las calpaínas en procesos patológicos	
Enfermedad	Mecanismo propuesto
Paraplegia	Degradación de las proteínas del citoesqueleto dando lugar a muerte neuronal
Daño cerebral	Mecanismo similar al anterior
Enfermedad de Alzheimer	Procesamiento anormal del péptido β-amiloideo. Modificación de unión de tau a microtubulos
Daño de la columna vertebral	Degradación de proteínas mielínicas
Isquemia cardiaca	Ruptura de proteína miofibrilares causando muerte celular irreversible
Distrofia muscular	Ruptura de proteína miofibrilares
Cataratas	Ruptura del cristalino dando lugar a precipitación proteica
Trombosis	Proteólisis de agreguina causando agregación plaquetaria
Artritis	Ruptura del cartílago y proteoglicanos componentes de la matriz extracelular

La cristalización de calpaínas en presencia de Ca^{2+} podría dar respuesta a muchos de las interrogantes que quedan sobre el mecanismo de activación de estas enzimas. Sin embargo, los trabajos realizados para llevar a cabo esta cristalización han sido hasta el momento infructuosos, debido a que el Ca^{2+} induce a la agregación de la proteína. Mientras tanto, estos sitios de unión han sido identificados gracias a la construcción de una calpaína recombinante que contiene sólo el dominio catalítico (dIIa-IIb). A esta “mini-calpaína” se le ha denominado como calpaína μ I-II. La Figura 7 muestra

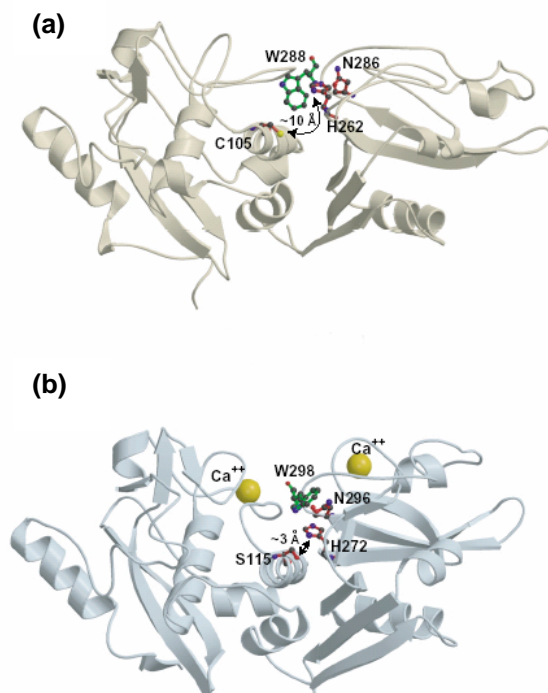


FIGURA 7. Representación del dominio dII en (a) m-calpaína (en ausencia de calcio) y en (b) μ I-II calpaína (en presencia de calcio) (Khorchid e Ikura, 2002)..

la estructura de esta mini-calpaína unida a Ca^{2+} y la compara con los dominios dIIa-IIb de la m-calpaína sin Ca^{2+} . Como puede observarse la unión del Ca^{2+} a dIIa-IIb produce un cambio conformacional que permite una alineación más apropiada de los residuos para la catálisis.

3.1.4 Función fisiológica de las calpaínas

Las calpaínas hidrolizan una amplia variedad de proteínas *in vitro*, sin embargo, y debido a que sus sustratos endógenos no son bien conocidos, el papel de estas enzimas en los organismos no está muy claro. Se sabe que proteínas de corta vida media, que llevan secuencias PEST, son buenos sustratos de estas enzimas. Una de las primeras reacciones descubiertas para las calpaínas fue la degradación de diferentes quinasas como la piruvato quinasa o la fosforilasa B quinasa. Además, las calpaínas hidrolizan proteínas miofibrilares y otras proteínas del citoesqueleto como proteínas de asociación de microtúbulos (MAPs), actina, laminina, tubulina, fodrina y vicientina. También se ha implicado a esta familia de proteínas en las reacciones de muerte programada o apoptosis y en la degradación del receptor de la eritropoyetina.

3.1.5 Implicación de las calpaínas en procesos patológicos

Algunos procesos relacionados con la **distrofia muscular**, como la degradación del disco Z, troponinas, I y C, y la cadena pesada de la miosina, son activados por altas concentraciones de Ca^{2+} . Esto ha hecho que se implique a la calpaínas en esta enfermedad. Otras enfermedades en las que se ha implicado a estas proteasas se pueden observar en la Tabla 6.

La implicación de las calpaínas en la **enfermedad de Alzheimer** ha sido recientemente identificada. El equipo de la Dra. Tsai, del Instituto Medico Howard Hughes y sus colegas en la Facultad de

Medicina de Harvard, han demostrado que una calpaína corta a una proteína reguladora denominada *p35*, que participa en el desarrollo del tejido nervioso. La calpaína divide a *p35* en dos proteínas, *p10* y *p25*. La presencia de *p25* en las células cerebrales acciona la formación de algunas de las marañas mortales de proteínas que pueden dañar o matar a esas células. Parece ser que el problema comienza cuando *p25* pierde un segmento diana crítico que se encuentra en *p35*, de esta forma *p25* activa a *cdk5* (quinasa-5 dependiente de ciclina, que es una enzima que normalmente es activada por *p35* y que cataliza la construcción y el mantenimiento del tejido nervioso durante el desarrollo) y le permite moverse libremente a través del citoplasma celular, hiperfosforilando a otras proteínas, especialmente a una proteína estabilizadora del citoesqueleto, llamada *tau*. La proteína *tau* alterada se vuelve menos capaz de asociarse a las proteínas del citoesqueleto y se agrega formando los nudos neurofibrilares letales que se observan en las células afectadas por la enfermedad de Alzheimer.

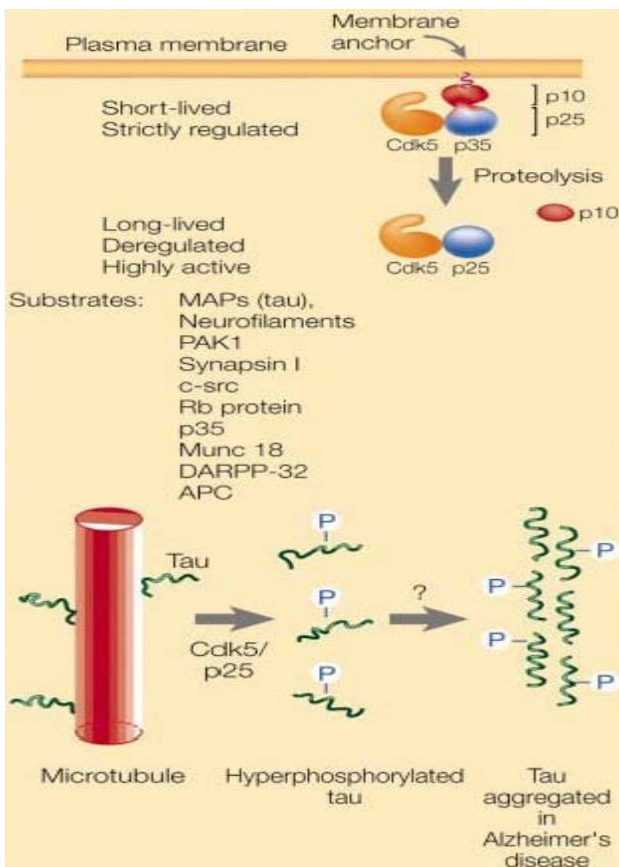


FIGURA 8. Posible implicación de las calpaínas en la enfermedad de Alzheimer (Patrick y col., 1999).

3.2 Proteólisis dependiente del sistema ubiquitina/proteosoma 26S (UPS)

Como ya se ha mencionado en otras partes del tema, la ubiquitinación funciona como un sistema unificador para la degradación de muchas proteínas, es decir, entre las proteínas se presentan distintas señales para la proteólisis pero muchas de ellas requieren la unión previa de la ubiquitina para que ocurra el paso final de la degradación. El sistema de degradación relacionado con la ubiquitina es un sistema complejo en el que participan múltiples componentes. Una visión general de este proceso se puede observar en la Figura 9. En el proceso participan, además de la ubiquitina, tres enzimas necesarias para la ubiquitinación (E1, E2 y E3), enzimas desubiquitinantes (como hidrolasas), y un complejo proteolítico denominado proteosoma 26S y que está formado por un núcleo central catalítico (proteosoma 20S) y dos subunidades reguladoras (complejos 19S). Además, en algunas etapas de este proceso se requiere energía en forma de ATP. Durante este apartado analizaremos este sistema con detalle y discutiremos su importancia fisiológica, así como, su participación en procesos patológicos como el cáncer o la infección por determinados virus.

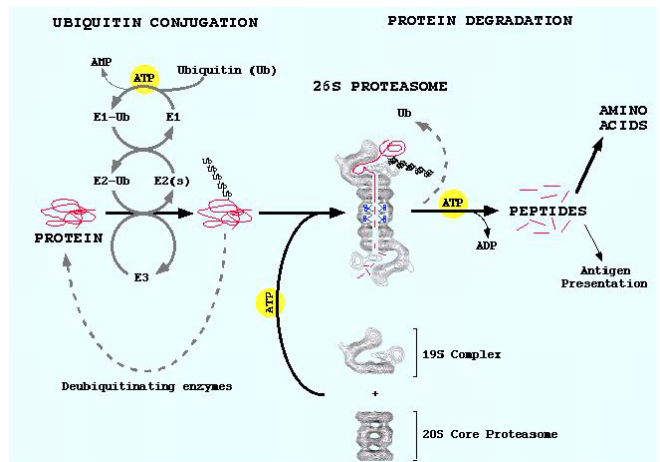


FIGURA 9. Representación esquemática de la ruta de degradación proteica dependiente de ubiquitina.

3.2.1 Ubiquitina

La ubiquitina es una pequeña proteína monomérica (8.5 kDa) de 76 aminoácidos presente en todas las células eucariotas, pero no en procariotas. Esta proteína ha sido altamente conservada durante el proceso de evolución, de tal forma, que la ubiquitina humana y la de levadura sólo se diferencian en 3 de los 76 aminoácidos. La ubiquitina ha sido aislada y cristalizada a partir de numerosas fuente biológicas. Todas ellas presentan una estructura común formada por α -hélices y láminas β , formando una estructura

estable y compacta (Figura 10). El grupo C-terminal de las ubiquitinas siempre es una glicina, siendo este el aminoácido de unión a la proteína a la que se va a unir. Para ello se establece un enlace isopeptídico entre este grupo C-terminal de la ubiquitina y un grupo ε-amino de lisina determinado. Las proteínas que van a degradarse pueden encontrarse monoubiquitinadas o poliubiquitinadas.



FIGURA 10. Estructura tridimensional de la ubiquitina de eritrocito humano

3.2.2 Enzimología de la ruta de ubiquitinación

La modificación post-transduccional de proteínas por la adición de ubiquitina marca a estas proteínas para ser degradadas por el proteosoma. Un asombroso número de proteínas están implicadas en la ubiquitinación y desubiquitinación de proteínas. Ambos procesos son importantes y deben ser controlados tanto temporal como espacialmente.

Ubiquitinación

El proceso de ubiquitinación de las proteínas se desarrolla en varias etapas. En él participan, fundamentalmente, tres enzimas, E1, E2 y E3. El primer paso es la formación, dependiente de ATP, de un enlace tioéster entre el C-terminal de la ubiquitina y un tiol de cisteína en E1 (también llamada enzima activadora de ubiquitina). A continuación, se produce la transferencia de la ubiquitina desde E1 a otro grupo de cisteína de E2 (denominada enzima transportadora de ubiquitina). La tercera enzima, E3 (proteína ligasa de ubiquitina), facilita, entonces, la transferencia de la ubiquitina activada desde E2 hasta residuos de lisina en las proteínas diana. El proceso se puede repetir (multiubiquitinación) o no (monoubiquitinación). Si se produce la multiubiquitinación, entonces, nuevas moléculas de ubiquitina se unen a la proteína ya marcada. La ubiquitina puede, en este momento, unirse a otros residuos de lisina de la proteína diana, y/o unirse a residuos de lisina de una ubiquitina unida anteriormente, formándose así largas colas de

ubiquitinas. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) cada uno de los cuales puede, potencialmente, unirse con el resto C-terminal de otra ubiquitina. Actualmente, se sabe que sólo los residuos K11, K29, K48 y K63 pueden unirse a otra molécula de ubiquitina, siendo las uniones a K48 las que se han encontrado más abundantemente. En el proceso de multiubiquitinación se ha descubierto la participación de otra enzima, E4 (factor de ensamblaje de las cadenas de ubiquitina). La multiubiquitinación, esta intensamente relacionada con la degradación de la proteína por el proteosoma, que reconoce las cadena de ubiquitina y atrae a la proteína hacia su interior. La monoubiquitinación está más relacionada con procesos de regulación, como la endocitosis, la reparación de ADN o la regulación transcripcional. La Figura 11 muestra esquemáticamente los procesos descritos en este apartado.

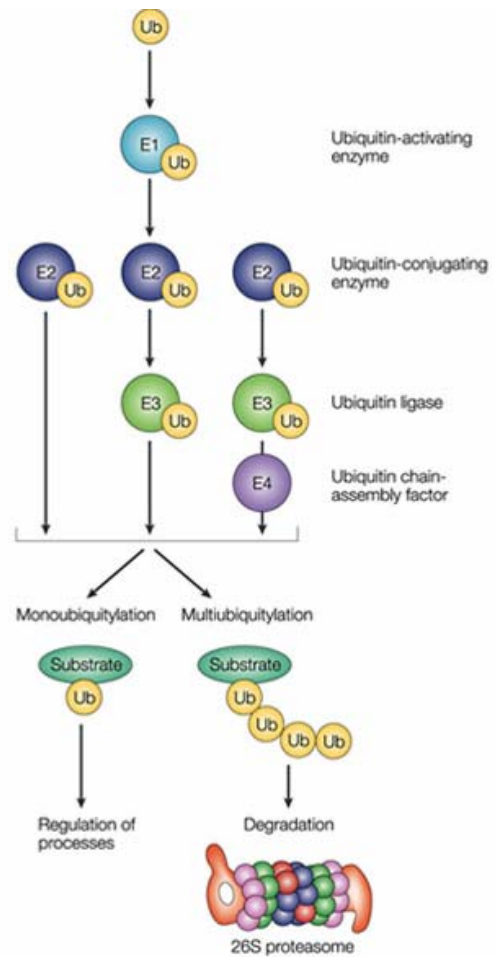


FIGURA 11. Ruta de ubiquitinación

Control de la ubiquitinación

Una primera pregunta que surge observando la complejidad de esta ruta es ¿Cómo se consigue

regular el proceso de ubiquitinación? Para conocer como se elige una determinada proteína para la ubiquitinación, parece ser, que hay que profundizar en las enzimas E3. Así, se conoce que las células poseen solamente una enzima E1, una docena de enzimas E2, pero cientos de enzimas E3 con especificidad única de sustrato. Las enzimas E3 parecen reconocer las secuencias de aminoácidos de otras proteínas convirtiéndolas en objetivo de la ubiquitinación. Ante condiciones fisiológicas alteradas, pensemos en una infección o una falta de nutrientes, las células pueden modificar las proteínas mediante la adición de grupos fosfato. Esta fosforilación puede transformar la actividad de una proteína o su capacidad para unirse a las E3. Estas enzimas reconocen también las proteínas que fracasan en el plegamiento o que están alteradas, haciéndolas pasar a un proceso de limpieza después de marcarlas para que el proteosoma las reconozca y las destruya.

Por lo tanto son las distintas enzimas E3 las que confieren esta alta especificidad al sistema. La proteína ligasa de ubiquitina es una proteína o complejo enzimático que debe de unir a ambos E2 y la proteína sustrato. Se conocen varios modos de reconocimiento de las proteínas sustrato por las distintas E3 (Figura 12). En algunos casos E3 reconoce directamente a regiones determinadas de la proteína, como es el caso del residuo N-terminal. En otras ocasiones la proteína sustrato debe de ser modificada químicamente para su reconocimiento, por ejemplo, por fosforilación post-transduccional. En otros casos, es la proteína E3 o alguna subunidad de esta, la que tiene que modificarse para que se produzca el reconocimiento. En otros casos, una proteína auxiliar (“ancillary protein”), como algunos chaperones moleculares, participa en el proceso de reconocimiento.

Las ligasas E3 se han clasificado en seis clases, de acuerdo, con su estructura o con la señal que reconocen:

- (1) E3 α (denominada Ubr1 en levaduras) reconoce extremos N-terminales desestabilizadores. Esta E3 α posee sitios de unión para residuos N-terminales básicos e hidrofóbicos de gran tamaño.
- (2) Proteínas con el dominio HECT. El mayor representante de esta familia es la proteína de mamíferos E6AP que está involucrada en la degradación del supresor de tumores p53 en células infectadas con el virus del papiloma.
- (3) El tercer tipo de E3 es un complejo multienzimático denominado complejo promotor de la anafase o ciclosoma (ACP/ciclosoma), y es de vital importancia para el ciclo celular en células eucariotas.
- (4) Complejos SCF: Está involucrado en el marcaje del inhibidor (I κ B α) del factor nuclear κ B (NF- κ B).

La destrucción de este inhibidor permite la expresión de varios genes relacionados con la inmunidad, la inflamación, la apoptosis y otros procesos celulares.

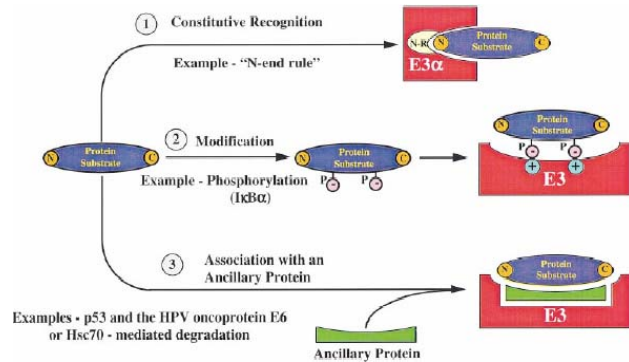


FIGURA 12. Distintas formas de reconocimiento de las proteínas sustrato por las distintas E3. **(1)** Reconocimiento de residuos específicos de la proteína sustrato (por ejemplo, E3 α reconoce proteínas de su extremo N-terminal); **(2)** Reconocimiento de un sustrato seguido de su modificación post-transduccional (p.e. I κ B α o β -catenina son marcadas por la ligasa SCF después de ser fosforiladas); **(3)** Reconocimiento del sustrato después de la fosforilación de E3 (p.e. las ciclinas del ciclo celular son marcadas por el APC/ciclosoma después de que se haya fosforilado una subunidad de la ligasa); **(4)** Reconocimiento de un sustrato después de la unión de una proteína de anclaje a E3 (p.e. p53 es marcada por E6-AP después de que las proteínas HPV-E6 o Hsc70 se hayan unido a E3).

(5) Algunas proteínas con dominios “ring finger” (dedos de zinc) también parecen servir como E3. Por ejemplo, el proto-oncogen c-Cbl estimula la ubiquitinización del receptor CSF-1 y endocitosis. Parece ser que estas secuencias tienen un importante papel en la función de estas ligasas E3, posiblemente en la formación de la cadena de poliubiquitina.

(6) El supresor de tumores Von Hippel Lindau (VHL) es otra proteína E3. Su mutación da lugar a tumores renales como se discutirá más adelante.

Desubiquitinación

La ubiquitinación de proteínas es un proceso reversible. Existen al menos 19 proteínas en levaduras que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico formado entre la Gly76 de la ubiquitina y una proteína diana. Parece ser que existen muchas más en los organismos eucariotas superiores. La liberación de ubiquitina de las proteínas y aductos es un proceso fundamental para el reciclamiento de la ubiquitina, la degradación de proteínas por el proteosoma y para otros procesos celulares. Así, la inhibición de las enzimas implicadas en desubiquitinación da lugar a la inhibición de la proteólisis dependiente de ubiquitina. Esto se debe probablemente a dos efectos. Por un lado, la eliminación de toda la ubiquitina libre en el citosol, y por otro la saturación del proteosoma por proteínas parcialmente digeridas, pero marcadas con

ubiquitina. Además, las enzimas que eliminan la ubiquitina también pueden acelerar la degradación en el proteosoma, ya que pueden generar cadenas de ubiquitina, de una longitud más apropiada para el reconocimiento por el proteosoma. La deubiquitinación también puede funcionar como un proceso corrector de errores en caso de proteínas que se hallan ubiquitinizado inadecuadamente.

Existen dos clases de proteasas que tienen actividad desubiquitinante, las ubiquitina C-terminal hidrolasas (UCH) y las proteasas de procesamiento específico de ubiquitina (UBP). Las primeras, UCH, podrían estar implicadas en el procesamiento de proteínas ubiquitinadas de bajo peso molecular (peptidos), mientras que las UBPs quitarían restos de ubiquitina de proteínas de alto peso molecular, y disgregarían las cadenas de poliubiquitina. Recientemente, una UCH de levadura (Yuh1) ha sido cristalizada, tratándose de una cisteína-proteasa.

3.2.3 El proteosoma

Aspectos generales

El destino final de muchas proteínas marcadas por la ubiquitina es su destrucción por el proteosoma. Fue descubierto a finales de los años setenta, y se llamó así porque contiene muchas proteasas. Los proteosomas son complejos multicatalíticos con una estructura gigantesca. Mientras que una proteína de tamaño medio tiene entre 40.000 y 80.000 daltons, la mayoría de los proteosomas de los organismos superiores pesan más de dos millones de daltons. A mediados de los años noventa, un grupo dirigido por

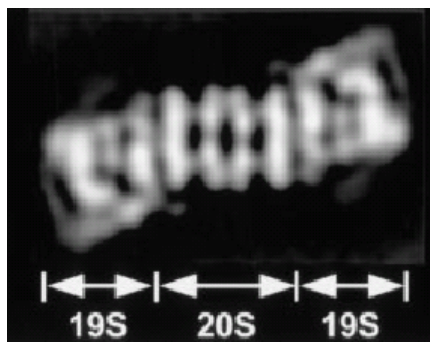


FIGURA 13. Microscopía electrónica del proteosoma 26S de *Drosophila melanogaster*

Wolfgang Baumeister y Robert Huber, del Instituto Max Planck de Bioquímica en Martinsried, recurrió al microscopio electrónico (Figura 13) y a la difracción de rayos X para determinar la arquitectura molecular de los proteosomas. Cada uno de ellos está constituido por una partícula central con aspecto de tunel (proteosoma 20S) a la que acompañan una o dos partículas reguladoras menores, situadas en un extremo o en ambos. La unidad central es la región catalítica del proteosoma, mientras que los anillos

externos actúan como puertas de control y alejan así el peligro de que alguna proteína extraviada penetre en su cámara de destrucción.

El proteosoma procaríota

Aunque una ruta de degradación asociada a ubiquitina no se puede dar en los procaríotas, algunas de las propiedades de los proteosomas procaríotas son incluidos en esta sección, ya que muchos de los conocimientos actuales sobre la estructura y propiedades catalíticas de los proteosomas eucariotas, han sido obtenidas de la caracterización del proteosoma 20S de arqueobacterias. El proteosoma 26S, responsable de la degradación de proteínas ubiquitinadas, solamente ha sido detectado en eucariotas. Sin embargo, el núcleo central proteosomas 20S, es una estructura conservada desde arqueobacterias (del género *Thermoplasma* o *Rhodococcus*) hasta eucariotas, y estructuras similares se han detectado en bacterias como *Escherichia coli* (Figura 14). Uno de los proteosomas mejor caracterizado ha sido el proteosoma 20S de *Thermoplasma acidophilum* (Figura 15). Este tiene forma de barril formado por 14 subunidades α y 14 subunidades β ($\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$). Todas las subunidades α son idénticas entre sí (codificadas por un mismo gen), al igual que las subunidades β . Esto es una diferencia fundamental con el proteosoma eucariótico donde cada subunidad es diferente (ver más adelante).

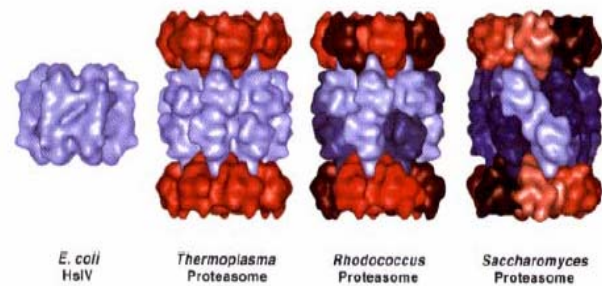


FIGURA 14. Ejemplo de proteínas relacionadas con el proteosoma 20S en bacterias y arqueobacterias

Los proteosomas eucariota y procaríota también se diferencian en la estructura y composición de las subunidades catalíticas (subunidades β). En procarío-

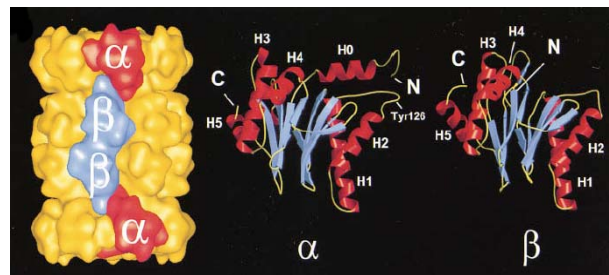


FIGURA 15. Estructura y organización del proteosoma 20S de *Thermoplasma acidophilum* (Baumeister y col, 1998).

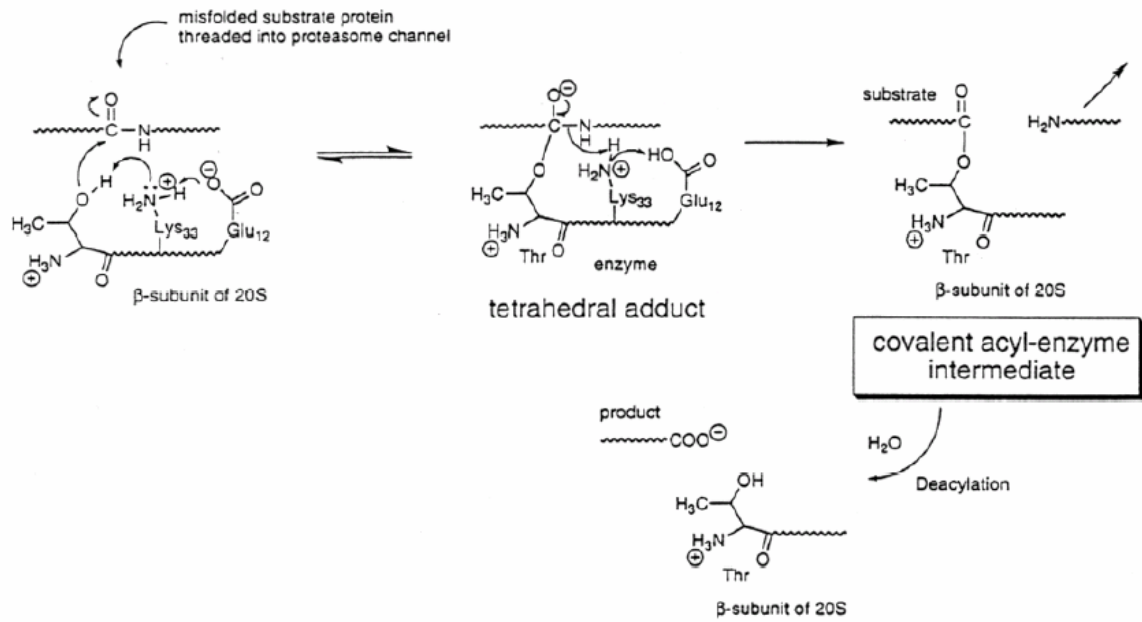


FIGURA 16. Mecanismo catalítico de la actividad quimotripsina-like del proteosoma 20S

tas cada una de las 14 subunidades β posee el mismo sitio catalítico formado por una triada de aminoácidos, poco usual (Glu, Lys, Thr), en el extremo N-terminal. El mecanismo de catálisis (denominado quimotripsina-like, ya que rompe enlaces peptídico solamente detrás de residuos hidrofóbicos) es similar al de las serín-proteasas, pero donde la función de la serina, es ahora, realizado por una treonina (treonín-proteasas) (Figura 16). Como veremos, en eucariotas

se han encontrado tres sitios catalíticos distintos dentro de un mismo proteosoma.

Composición y organización de los proteosomas eucariotas

El proteosoma 26S es un complejo multicatalítico que se encuentra en el citosol y en el núcleo de las células eucariotas. Consiste de una partícula central formada por 28 subunidades (proteosoma 20S) de 2.100 kDa, formando una estructura tubular con dos anillos

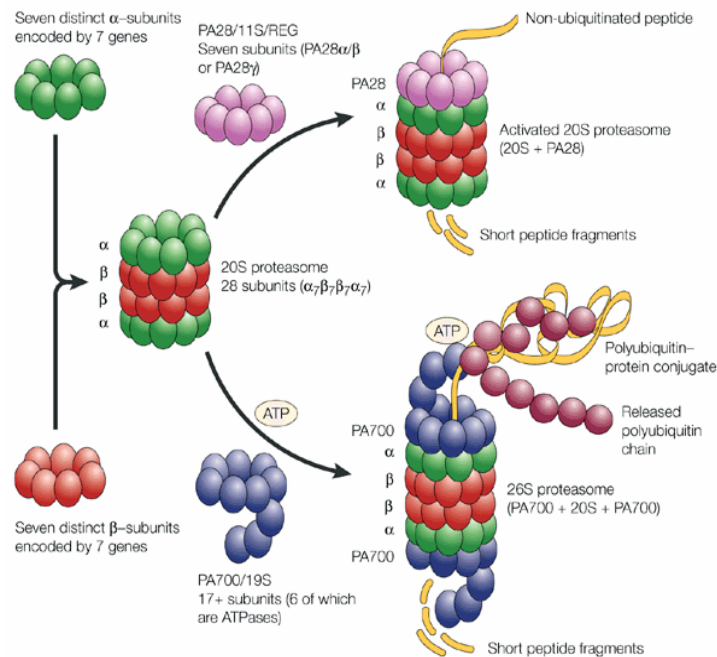


FIGURA 17. Composición y organización de los proteosomas

idénticos exteriores (anillos α) y dos idénticos interiores (anillos β) (Figura 17). Cada uno de los dos anillos α y β están formados por 7 subunidades diferentes (codificadas por 14 genes distintos), dando lugar a una estructura general $\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$. Los tres sitios catalíticos se encuentran en algunas de las subunidades β , en la parte interna del complejo para, así, evitar la degradación indiscriminada de las proteínas intracelulares. Estos tres centros activos promueven la hidrólisis de proteínas en la parte C-terminal de residuos hidrofóbicos (actividad quimotripsina-like), básicos (actividad tripsina-like) o ácidos (actividad caspasa-like) (Figura 18). La subunidad β puede ser constitutiva o inducible, y está ensamblada de manera distinta (con distinta proporción de estas tres actividades proteolíticas) dependiendo de las condiciones fisiológicas y de los requerimientos celulares. En los tres tipos de actividades proteolíticas, parece ser, que la treonina es el residuo catalítico esencial (treonín-proteasas). Los anillos externos, formados por las subunidades α , no presentan actividad proteolítica pero sirven de anclaje para una multisubunidad PA700 (19S; 700 kDa) que contiene actividad ATPasa, y que es una subunidad reguladora que se une al extremo superior e inferior del proteosoma 20S para formar el proteosoma 26S. Una vez unidas las subunidades 19S, estas tienen las siguientes funciones: (a) abrir el canal de entrada al interior de la subunidad 20S, ya que este estaría cerrado por los restos N-terminales de las subunidades α y (b) desplegar las proteínas ubiquitinizadas para

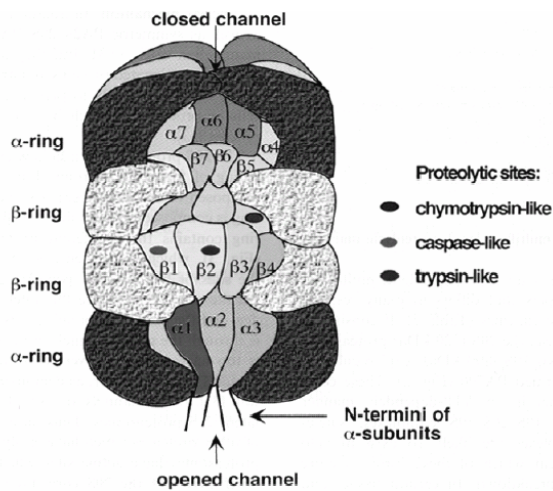


Figura 18. Representación esquemática del proteosoma 20S de levaduras y disposición de los centros catalíticos.

que puedan penetrar en el centro catalítico. Ambos procesos requieren ATP.

En otras ocasiones una subunidad reguladora PA28/11S/REG (180 kDa) puede unirse al proteosoma 20S abriendo el canal de entrada al centro

catalítico y dando lugar al proteosoma 20S activado. Sin embargo, este proceso es independiente de ATP y contribuye a la degradación de proteínas dañadas, pero no ubiquitinadas, y por lo tanto se discutirá en otras secciones de este tema.

3.2.4 Regulación de procesos fisiológicos

Mediante el control de la estabilidad de proteínas cruciales, el sistema ubiquitina-proteosoma 26S regula el desarrollo de las extremidades, la respuesta inmunitaria, la división celular, la reparación del ADN y la comunicación intercelular, entre otros procesos. Los propios ritmos circadianos y la floración en las plantas podrían estar regulados por este sistema. También se conocen algunas ligasas de ubiquitina con función supresora de tumores u oncogénica, lo que vincula la ubiquitinación al comienzo del proceso canceroso. En este apartado se describirán algunos ejemplos de procesos fisiológicos controlados por la ubiquitinación y, en el siguiente, se abordará su implicación en procesos patológicos.

Ciclo celular eucariota

La información genética contenida en el genoma de una célula se transmite fielmente a la célula hija gracias a la precisa duplicación de sus cromosomas, previa a la división celular. Los procesos de síntesis de ADN (fase S) y de mitosis (fase M) se hallan perfectamente coordinados en cada ciclo de división celular. El ciclo celular se completa con una fase G1, en la que la célula prepara la maquinaria necesaria para la síntesis de ADN, y una fase G2, que precede a la división nuclear y citocinesis; es esta última se corrigen posibles errores replicativos. Los procesos celulares característicos de las distintas fases del ciclo, así como las proteínas que los lleva a cabo, persisten (están conservados) en todas las células eucariotas.

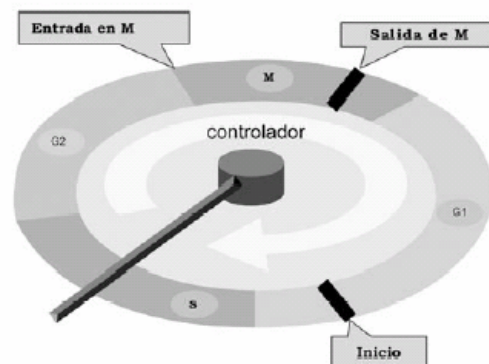


FIGURA 19. Regulación del ciclo celular. Los procesos básicos tales como la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo

TABLA 7. Ciclinas y Cdk's en vertebrados y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Complejo Cdk-ciclina	Vertebrados		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	Ciclina	Cdk	Ciclina	Cdk
G1-Cdk	Ciclina D*	Cdk4, Cdk-6	Cln 3	Cdk-1**
G1/S-Cdk	Ciclina E	Cdk-2	Cln 1, 2	Cdk-1
S-Cdk	Ciclina A	Cdk-2	Clb 5, 6	Cdk-1
M-Cdk	Ciclina B	Cdk-1**	Clb 1, 2, 3, 4	Cdk-1

*Hay tres ciclinas D en mamíferos (ciclinas D1, D2 y D3)
 **El nombre original de Cdk1 fue Cdk2 en vertebrados y *Schizosaccharomyces pombe* y *Cdc28* en *Saccharomyces cerevisiae*.

La correcta progresión por las distintas fases del ciclo celular viene regulada por una quinasa dependiente de ciclina, o CDK, complejo enzimático que consta de una subunidad catalítica y una subunidad activadora denominada ciclina. Los complejos CDK aparecen en todos los organismos eucariotas hasta ahora estudiados, si bien el número de sus componentes puede diferir de uno a otro. Así, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* producen una única subunidad catalítica Cdk1 (también conocidas como Cdc28 y Cdc2, respectivamente) activada por diversas ciclinas específicas de cada fase del ciclo. En el caso de células de mamífero existe una familia de proteínas Cdk relacionadas (Cdk1, 2, 4 y 6) que se asocian, a su vez, con múltiples ciclinas y cuyas combinaciones dan lugar a complejos CDK peculiares de cada fase del ciclo celular. El nombre de las distintas Cdk y ciclinas se observa en la Tabla 7. Existen cuatro clases de ciclinas:

- (1) Las ciclinas G1/S, las cuales se unen a las Cdk's al final de la fase G1 y preparan a la célula para la replicación del ADN.
- (2) Las ciclinas S, que se unen a las Cdk's durante la fase S y son necesarias para la replicación del ADN.
- (3) Las ciclinas M o mitóticas, las cuales se unen a Cdk durante G2 y forman el factor promotor de la fase M (MPF), el cual induce a la célula a entrar en mitosis.
- (4) Las ciclinas G1 que ayudan a pasar el punto de inicio del ciclo.

Para que la célula abandone la fase G1 e ingrese a la fase S, es decir, inicie la replicación del ADN, la ciclina G1 aumenta su concentración, a partir del punto de inicio, y se une a una Cdk dando lugar al complejo CDK activado llamado factor promotor de la replicación (RPF) que activa la síntesis de ADN. Cuando la concentración de ciclina decrece el complejo FPR se desactiva. El proceso de activación

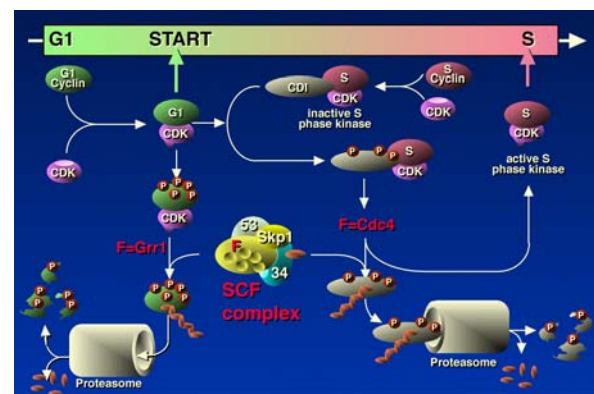


FIGURA 20. Regulación del ciclo celular con la participación de la ciclina G1. Se trata de un modelo de la degradación de reguladores positivos y negativos para la iniciación del ciclo celular. (1) Cdk es activada por unión a la ciclina G1; (2) la Cdk de fase G1 activa fosforila sustratos que son necesarios para la iniciación de la fase S entre ellos al inhibidor de Cdk (CKI ó CDI). Cuando no es necesaria el complejo Cdk de fase G1 se autofosforila para su destrucción en el proteosoma; (3) Los complejos Cdk de fase G1 y los CDI fosforilados son reconocidos por los complejos SCF, que catalizan la adición de ubiquitina a estas proteínas, marcándolas, así, para su destrucción en el proteosoma 26S; (4) Algunos componentes integrantes del complejo SCF son Skp1, Cdc53, una proteína de caja F, así como la enzima Cdc34 que es una enzima E2; (5) La hipótesis más extendida hasta el momento es que las proteínas de caja F son las que determinan la especificidad del complejo SCF. Se han descrito hasta tres complejos SCF en levaduras: SCF^{Cdc4}, SCF^{Grr1} y SCF^{Met30}.

de fase S se observa en la Figura 20. En este proceso las E3 (ubiquitin ligasas) identificadas pertenecen a la familia SCF.

Superada la fase G2, se activa el inicio de la mitosis. Al final de G2 aumenta la concentración de ciclina mitótica y al alcanzar una determinada concentración de una ciclina se une a una Cdk formando el MPF que se encarga de fosforilar proteínas con funciones esenciales durante la mitosis. Cuando la célula ha salido de mitosis se produce una disminución de esta actividad CDK. En este caso las E3 implicadas pertenecen al grupo de las ACP/ciclosoma (Figura 21)

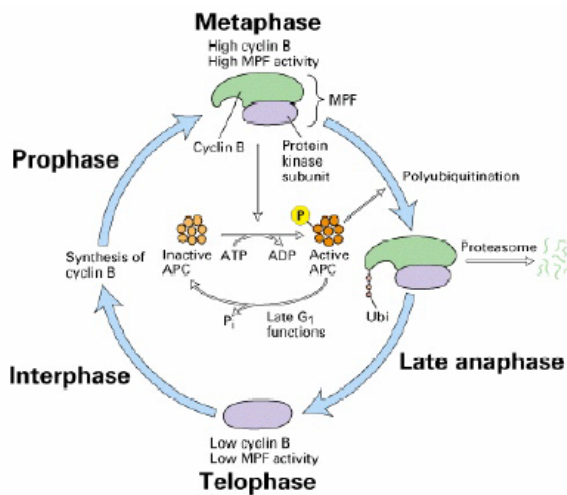


FIGURA 21. Control del ciclo celular por ciclinas mitóticas

Sistema inmunitario

En la presentación antigénica determinadas células del sistema inmunitario (por ejemplo los macrófagos) capturan sustancias anormales o ajenas. La mayoría de las moléculas que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria, que se denominan antígenos, son polipéptidos o proteínas. El antígeno degradado parcialmente se transfiere a la membrana plasmática del macrófago donde se utiliza para activar determinados linfocitos T (células T) mediante interacciones célula-célula. Las células T son los reguladores principales de la respuesta inmunitaria corporal. El sistema inmunitario se apoya en los inmunoproteosomas. Estos proteosomas especializados le ayudan a distinguir entre las células sanas y las células cancerosas. En el ejemplo descrito en la Figura 22, una proteína vírica está marcada con ubiquitina para su destrucción por el inmunoproteosoma. Trozos de la proteína vírica, que consta de ocho a diez aminoácidos, entra entonces en el retículo

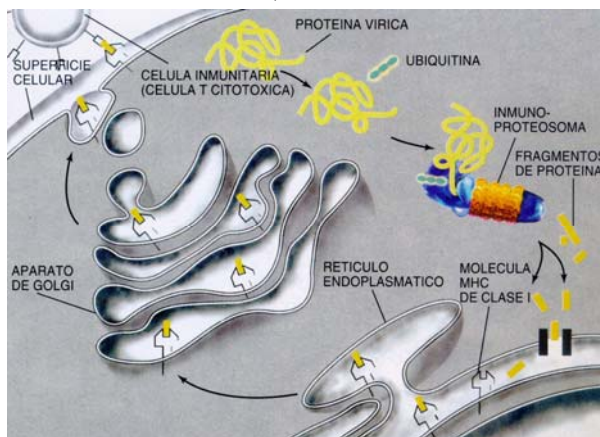


FIGURA 22. Proteosomas y sistema inmunitario

endoplasmático, donde se unen a moléculas recién sintetizadas, que forman el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. A medida que las moléculas MHC de clase I pasan por el aparato de Golgi y salen a la superficie, van captando los fragmentos de las proteínas víricas. Las células T citotóxicas, del sistema inmunitario, reconocen como material foráneo los trozos del virus unidos a las moléculas MHC de clase I en la superficie celular y destruyen la célula infectada.

3.2.5 Patologías humanas asociadas al sistema ubiquitina/proteosoma 26S (UPS)

Una vez visto como el UPS participa en múltiples e importantes procesos celulares, no es de extrañar, que fallos en este sistema den lugar a un gran número de patologías. Un resumen de algunas enfermedades en las que estaría involucrado este sistema se da en la Tabla 8, y casi todas ellas se deben a la generación de proteínas E3 defectuosas por mutaciones o deleciones en alguno de sus genes. Además, es interesante destacar como algunos virus secuestran el UPS para su propio beneficio, y así poder propagarse en el organismo.

TABLA 8. Algunas patologías asociadas al complejo ubiquitina/ proteosoma	
Hipertensión <i>Síndrome de Liddle</i> <i>Síndrome de DiGeorge</i>	Enfermedades motrices <i>Síndrome de Angelman</i>
Cáncer	Fibrosis quística
Neurodegenerativas <i>Alzheimer</i> <i>Parkinson</i> <i>Huntington</i>	Infecciones virales

Proteosomas y cáncer

Se cree, hoy en día, que casi todos los procesos tumorales son debidos a mutaciones genéticas en oncogenes y/o en genes supresores de tumores. Los productos de muchos de estos genes están regulados por el UPS, por lo tanto mutaciones en alguno de los componentes del UPS pueden dar lugar a cambios en la estabilidad de estas proteínas y por lo tanto contribuir a la carcinogénesis. Además, algunos supresores de tumores o productos de oncogenes son en sí mismos proteínas E3. Se conocen 5 genes supresores de tumores cuyos productos interactúan con el sistema UPS (APC, DCC, TP53, RB1 y VHL) y hasta 9 proto-oncogenes humanos (ABL, FOS, MOS, MYB, MYC, RAF, RAS, REL y SRC).

Un caso muy bien caracterizado es el del supresor de tumores Von Hippel Lindau (VHL), una E3 que sufre a menudo una mutación dando lugar a tumores renales. La función de VHL consiste en regular

ciertos genes que se expresan en condiciones de bajo oxígeno (hipoxia). La célula normal tiene mecanismos para responder a bajos niveles de oxígeno, así, en condiciones de hipoxia la célula activa al factor de transcripción HIF-1, el cual se une a una zona específica del ADN y activa la expresión de una serie de genes inducibles por hipoxia (HRE), y que incluye, entre otros, a la eritropoyetina (EPO) y al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos proteínas HIF-1 α y ARNT. Para que se produzca la activación de genes antes descrita, estas dos proteínas deben de estar dimerizadas. En condiciones de oxígeno normales la subunidad HIF-1 α es degradada por el UPS. De hecho, la E3 que transfiere la ubiquitina a HIF-1 α es el VHL, la cual es regulada por una ferro-proteína y, forma parte de un sistema complejo con varios componentes (Figura 23). En condiciones de hipoxia HIF-1 α es estabilizado (por fosforilación y por otras señales oncogénicas) y activo, ya que estas condiciones inhiben la función del proteosoma. Recientemente, se ha demostrado que HIF-1 α es hidroxilado en un residuo de prolina en condiciones normales de oxígeno, y que esta modificación post-transduccional sería necesaria para su reconocimiento por VHL y su posterior ubiquitinación. Mutaciones en VHL producirían una expresión continua y exagerada de genes promotores de angiogénesis y derivaría en procesos cancerosos.

En otros casos los cánceres pueden estar inducidos por virus. Por ejemplo el virus del papiloma humano (HPV) provoca verrugas genitales, cáncer de útero o cáncer de recto. La transformación hacia el desarrollo tumoral se bloquea, habitualmente, por la p53, una de las proteínas supresoras de tumores del organismo. El HPV recurre a una estrategia para evitar el sistema defensivo celular, fabrica una proteína (E6) que se enlaza simultáneamente a la p53 y a una enzima E3 (E6-AP) (Figura 24). La fatídica unión insta la ubiquitinación de la p53, que así queda marcada para su destino fatal en el proteosoma. Las

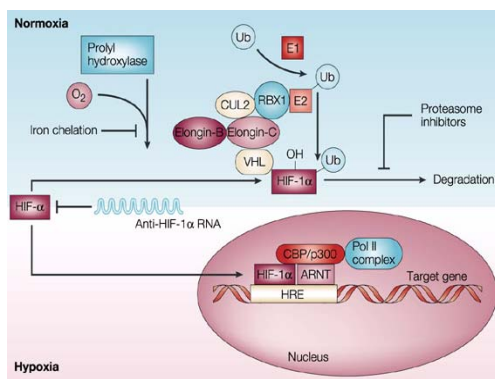


FIGURA 23. Activación de genes inducibles por hipoxia (HRE) regulada por el supresor de tumores Von Hippel Lindau (VHL) (Harris, 2002)

células infectadas se convierten más fácilmente en un cancer incipiente.

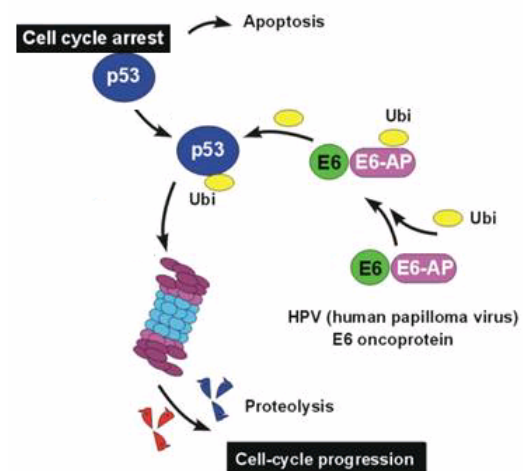


FIGURA 24: Mecanismo utilizado por HPV para evitar su destrucción mediada por p53

3.3 Proteólisis dependiente del proteosoma pero independiente de ubiquitina

Recientes descubrimientos han demostrado que algunas proteínas pueden ser degradadas por los proteosomas en rutas independientes de la ubiquitina. Una de estas rutas involucra al proteosoma 20S, que en presencia o no de la partícula reguladora 11S puede degradar proteínas dañadas por oxidación. El otro caso es más paradigmático, ya que, una enzima, la ornitina descarboxilasa puede ser degradada por el proteosoma 26S sin necesidad de ser ubiquitinada.

3.3.1 Degradación de proteínas oxidadas por el proteosoma 20S

La unidad central del proteosoma (proteosoma 20S) puede hidrolizar proteínas dañadas por oxidación en un ruta independiente de ATP y de ubiquitina. La forma en que el proteosoma 20S reconoce a estas proteínas dañadas no está clara pero se piensa que pueden intervenir varios factores: (a) reconocimiento de grupos hidrófobos que quedan expuestos después de la modificación; (b) reconocimiento de marcadores, como residuos de aminoácidos oxidados y (3) reconocimiento de cambios conformacionales en la proteína dañada. Estudios realizados sobre calmodulina y aconitasa oxidadas apoyan estas hipótesis. En algunas ocasiones el proteosoma 20S une una subunidad reguladora 11S, que facilita el reconocimiento de las proteínas dañadas, y su paso a la parte central del proteosoma para su degradación.

3.3.2 Ornitina descarboxilasa (ODC)

La ODC es la primera enzima en la ruta de biosíntesis de poliaminas. Estos compuestos participan en

múltiples procesos fisiológicos, estabilizando a los ácidos nucleicos y a las proteínas y, por lo tanto, su ruta de síntesis debe estar muy regulada. Así, el sitio primordial para la regulación de esta ruta es la ODC que además es una proteína de muy corta vida media. Lo extraño de la degradación de esta enzima es que se realiza en el proteosoma 26S pero sin necesidad de ser ubiquitinada. Cuando se produce una acumulación de poliaminas se produce la estimulación de otra proteína, la antizima. Esta proteína regula negativamente a la ODC ya que se une a ella y permite su destrucción en el proteosoma 26S.

3.4 Caspasas y apoptosis

3.4.1 Muerte celular programada (apoptosis)

Todo ser vivo pluricelular debe desembarazarse de las células que a lo largo de su vida han ido acumulando mutaciones y errores susceptibles de convertirlas en la amenaza de un cáncer. Cualquier desarreglo que afecte a la capacidad de morir de estas células puede tener consecuencias letales. A la muerte de una célula se llega por diversas vías. Cuando un tejido resulta dañado, por ejemplo en una herida, las células de la zona afectada mueren súbitamente perdiendo su integridad y liberando en el entorno su contenido. Este tipo de muerte, llamado necrosis, perjudica a las células vecinas y en los animales desata una respuesta inmunitaria, a veces desproporcionada, que conduce a una lesión.

Junto a esta muerte celular violenta, existe la requerida por el propio organismo para su desarrollo y bienestar. Debe hallarse ésta, pues, sometida a un control más estricto que el observado en la necrosis. Esta muerte celular controlada no conduce a una expulsión de la célula moribunda, sino a su implosión, habitualmente seguida por su ingestión por células del sistema inmunitario, los macrófagos. Se trata de la *muerte celular programada o apoptosis*. El término apoptosis fue acuñado en 1972 por John Kerr, Andrew Wyllie y Alastair Currie, a partir de la palabra griega que designa caída, en analogía con la caída de las hojas y en referencia a su carácter natural.

Nos hallamos todavía lejos de comprender, en toda su integridad, los mecanismos desencadenantes de la apoptosis. No obstante, se va avanzando. Así, se han identificado señales externas, como la privación de factores de crecimiento, e internas, como la presencia de alteraciones en el ADN, que pueden provocar la respuesta apoptótica. Igualmente, se nos muestra con nitidez creciente que el control de esta respuesta pasa por diferentes órganos celulares y, muy en particular, por la mitocondria.

Las mitocondrias constituyen la factoría que produce la energía de la célula. Cualquier desarreglo en su funcionamiento conduce a la desregulación de los mecanismos celulares, de ahí su posición central

en la apoptosis. En respuesta a señales como las mencionadas, la mitocondria deja de producir eficientemente energía y libera una serie de moléculas que, fuera de su contexto, se convierten en desencadenantes de la apoptosis. Una de estas moléculas es el citocromo c, proteína crucial en la respiración. Una vez en el citoplasma, el citocromo c desata la vía de las caspasas, así llamada por el papel clave que en la misma desempeñan estas proteínas.

La mitocondria libera también el factor inductor de la apoptosis (AIF), una proteína que presenta otra característica en común con el citocromo c: esto es, capacidad de transferir electrones entre distintas moléculas. Sin embargo, a contrario de lo que sucede con el citocromo c, se desconoce la función de AIF en la mitocondria, se ignora, además, el mecanismo por el que AIF induce una respuesta apoptótica. Si se sabe, en cambio, que la actividad apoptótica de AIF pasa por su transporte al núcleo. Tal actividad es independiente, al menos en parte, de la vía de las caspasas.

3.4.2 Caspasas: ejecutoras de la apoptosis

Clasificación y estructura

Las caspasas han sido clasificadas en tres grupos atendiendo a sus implicaciones fisiológicas:

- (1) Activadoras de citoquinas (Clase I): Si bien las caspasas son esenciales para la apoptosis, algunas de ellas están exclusivamente implicadas en la activación de citoquinas. Entre estas se encuentran las caspasas -1, -4, -5 y -14.
- (2) Iniciadoras de la ruta de apoptosis (Clase II): como su nombre indica, inician la ruta de activación de las caspasas e incluye a las caspasas-2, -8, -9 y -10.
- (3) Efectoras de la apoptosis (Clase III): son las encargadas de llevar a cabo la destrucción proteica asociada a la destrucción celular programada y pertenecen a esta clase las caspasas-3, -6 y -7.

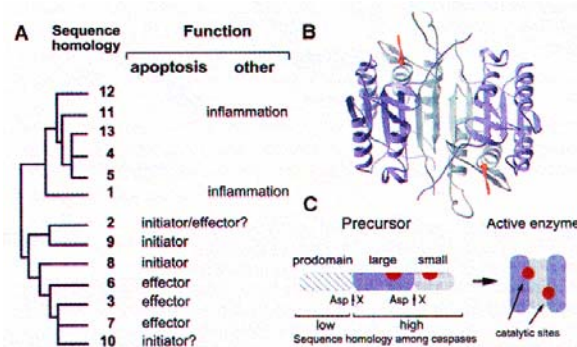


FIGURA 25. Clasificación y estructura de las caspasas (A) Filogenia y función de las 13 caspasas identificadas hasta el momento. (B) Estructura cristalina de caspasa-3. (C) Activación de caspasas.

Las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Todas ellas son expresadas como proenzimas (30 a 50 kDa) que contienen tres dominios: un dominio N-terminal, una subunidad grande (aproximadamente 20 kDa) y una pequeña (aproximadamente 10 kDa) (Figura 25). Su activación requiere el procesamiento proteolítico entre los dominios seguido por la asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. La estructura cristalina de dos de las caspasas activas (caspasa-1 y -3) muestra que, en ambos casos, dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero, con dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente. Dentro de cada dominio catalítico las unidades grandes y pequeñas están íntimamente asociadas, contribuyendo ambas con los residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis.

Dos características de la estructura de las proenzimas, son de central importancia para el mecanismo de acción de estas proteasas. Primero, el dominio N-terminal, que es altamente variable en secuencia y longitud, esta involucrado en la regulación de la activación de estas enzimas. Segundo, todos los dominios derivan de la proenzima por ruptura en el sitio consenso de las caspasas, implicando que estas enzimas pueden ser activadas tanto autocatalíticamente como por una cascada de enzimas con especificidad celular.

Todas las caspasas son cisteín-proteasas con una especificidad inusual, el requerimiento de un residuo de ácido aspártico en la posición anterior al sitio de corte. Además, se requiere el reconocimiento de cuatro aminoácidos en la zona N-terminal del sitio de corte. El tetrapeptido de reconocimiento difiere significativamente entre las caspasas, explicando, así, la diversidad de sus funciones biológicas. Su especificidad es aún más estricta, esto es, no todas las proteínas que contienen la secuencia óptima de tetrapeptidos son rotas, debe de existir a la vez un reconocimiento de la estructura terciaria de la proteína sustrato. La estricta especificidad de las caspasas es consistente con la observación de que la apoptosis no va acompañada de una digestión indiscriminada de proteínas, sino que un selecto conjunto de proteínas son digeridas de forma coordinada, normalmente en un sitio único, resultando en su pérdida o cambio de función.

Mecanismos de destrucción celular

Los eventos apoptóticos incluyen fragmentación del ADN, condensación de cromatina, encogimiento celular y desensamble de las células en vesículas rodeadas de membrana (cuerpos apoptóticos). *In vivo*, este proceso culmina con la captura de estos cuerpos por células vecinas, previniendo las complicaciones

que podrían resultar de la liberación del contenido intracelular. Estos cambios ocurren en una secuencia predecible y reproducible, que puede completarse entre 30 y 60 minutos.

El cómo las caspasas contribuyen a este proceso no está completamente aclarado. Se conocen hasta 40 sustratos de caspasas, pero la relación entre su ruptura y la apoptosis sólo se conoce para unos cuantos. Sin embargo, esos pocos ejemplos sugieren que las caspasas son las responsables de los cambios celulares que ocurren durante la apoptosis y permiten dar una idea del mecanismo empleado (Figura 26). Una de las funciones de las caspasas es inactivar proteínas que protegen a las células vivas de la apoptosis. Un ejemplo claro lo constituye la ruptura de I^{CAD}, un inhibidor de una nucleasa responsable de la fragmentación del ADN (CAD, desoxyrrbonucleasa activada por caspasa). En células no apoptóticas, las CAD están presentes como un complejo inactivo (CAD-I^{CAD}). Durante la apoptosis, el inhibidor I^{CAD} es digerido por las caspasas liberando CAD que funciona como una nucleasa.

Las caspasas contribuyen a la apoptosis a través del desensamble de la estructura celular, como lo demuestra la destrucción de la lámina nuclear, una estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear y está implicada en la organización de la

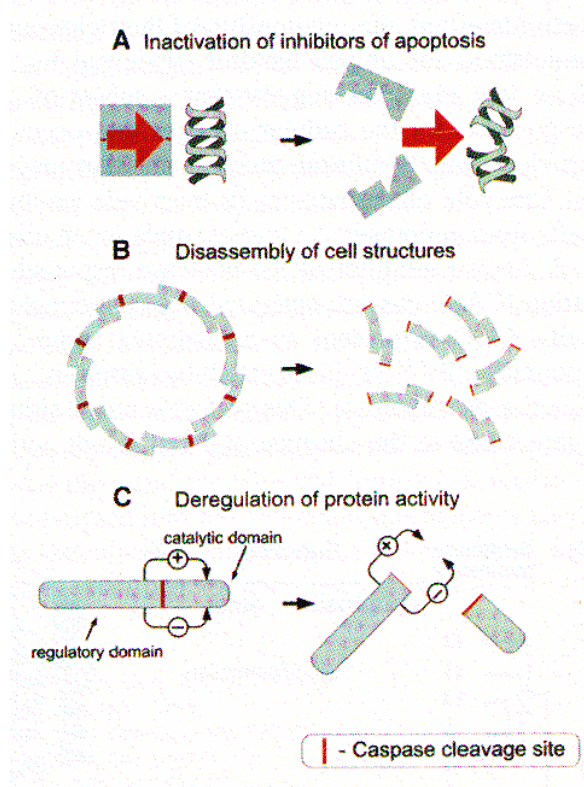


FIGURA 26. Procesos propuestos para la inducción de apoptosis por las caspasas.

cromatina. La lámina está formada por polímeros de proteínas filamentosas intermedias denominadas lamininas. Durante la apoptosis estas son degradadas en un sitio único por las caspasas, causando el colapso de la lámina y contribuyendo a la condensación de la cromatina. Las caspasas indirectamente también modifican estructuras por ruptura de proteínas involucradas en la regulación del citoesqueleto, incluyendo a la gelsolina, la quinasa de adhesión focal y la quinasa 2 activada por p21.

La disociación de dominios reguladores y efectores es un carácter distintivo de la función de las caspasas. Por ejemplo, las caspasas desactivan o desregulan las proteínas involucradas en la reparación del ADN (tales como la ADN-PKCs), del *splicing* del ARNm (tal como U1-70K) y de la replicación del ADN (como el factor de replicación C).

Un examen de éstos y otros sustratos de las caspasas sugieren que estas enzimas participan en la apoptosis en una forma que recuerda a una bien planeada y ejecutada operación militar. Las caspasas cortan el contacto con las células vecinas, reorganizan el citoesqueleto, apagan la replicación y reparación del ADN, interrumpen el *splicing* del ARNm, destruyen en ADN, rompen la estructura nuclear, inducen a la célula a exhibir señales que la marcan para ser fagocitadas y desintegran las células en cuerpos apoptóticos.

Mecanismos de regulación de las caspasas

Aunque quedan muchos aspectos que solucionar sobre la regulación de las caspasas, y en consecuencia de la apoptosis, parece ser que la complejidad de su regulación podría rivalizar con la de los sistemas del complemento y de la coagulación.

Activación de caspasas efectoras: Existen numerosas evidencias genéticas y bioquímicas que apoyan un mecanismo en cascada para las caspasas efectoras (Figura 27). Según esto, una señal proapoptótica culminaría en la activación de un iniciador de caspasas que activaría a las caspasas efectoras. Diferentes iniciadores de caspasas actúan mediante distinto conjunto de señales. Por ejemplo, la caspasa-8 está asociada con apoptosis por receptores de muerte celular, mientras que la caspasa-9 está involucrada en la muerte celular inducida por agentes citotóxicos. Este modelo explica porqué distintas señales apoptóticas inducen los mismos cambios bioquímicos y morfológicos.

Activación de caspasas iniciadoras: Las evidencias disponibles indican que la activación de las caspasas iniciadoras requiere de la unión de cofactores específicos. Esta unión es disparada por una señal proapoptótica. Por ejemplo, la activación de caspasa-9 requiere de la unión del cofactor APAF-1, citocromo

c y dATP. Existen varios modelos, basados en evidencias indirectas, sobre los mecanismos de activación.

El modelo de inducción por proximidad o de oligomerización, esta basado en varias observaciones: las procaspasas tienen baja actividad y requieren de dimerización para su activación, además, las procaspasas sobreexpresadas en la célula y entrecruzadas artificialmente se tornan activas. El modelo argumenta que las caspasas están en estado de latencia en las células, debido a que se encuentran en estado monomérico a bajas concentraciones. Los cofactores actúan llevando a dos o más precursores de caspasas a un estado de estrecha proximidad, permitiéndole realizar una activación autoproteolítica intermolecular.

El modelo de autocatálisis facilitada postula que los precursores de caspasas están presentes en la célula con una conformación o en un complejo que previene la autocatálisis. Los cofactores facilitan la activación por cambios conformacionales del precursor tanto directamente como por eliminación de un inhibidor.

La diferente compartimentación de las caspasas y sus cofactores podría ser otra manera de regulación. El citocromo c mitocondrial debe de abandonar la mitocondria para activar a la caspasa-9.

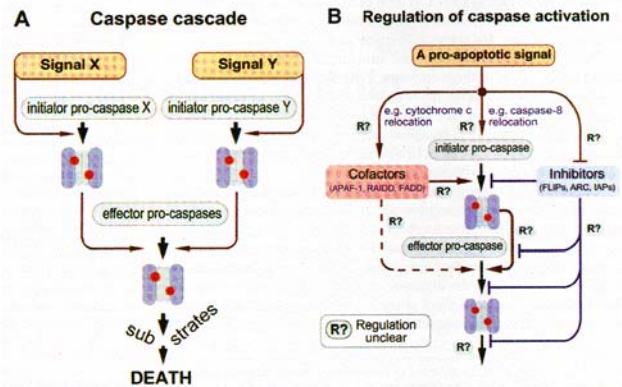


FIGURA 27: Cascada de activación de caspasas en células apoptóticas y molelo de regulación.

Regulación por inhibidores: La identificación de inhibidores de caspasas ha provenido, fundamentalmente, de trabajos con virus que atenúan la respuesta a la infección de la célula huésped. Se han descrito tres clases diferentes de inhibidores virales: CrmA, p35 y una familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP).

Las caspasas como dianas en el tratamiento de enfermedades

Hay dos tipos opuestos de enfermedades que involucran una desregulación de la apoptosis. Están

aquellas en las que la apoptosis es excesiva, causando daño a los tejidos normales (por ejemplo, podemos incluir en este grupo a las enfermedades neurodegenerativas, enfermedades de respuesta a injertos y enfermedades autoinmunes) y aquellas en las que la apoptosis es prevenida, permitiendo el crecimiento de los tejidos malignos (cáncer). En concordancia con esto, las dos estrategias a seguir serán: inhibición de las caspasas o inducción de la apoptosis vía activación de las caspasas.

4. PROTEÓLISIS LISOSÓMICA

4.1 Proteólisis selectiva y no selectiva en los lisosomas

Durante muchos años, todos los procesos intracelulares de degradación selectiva de proteínas se atribuyeron a los sistemas citosólicos. Por otro lado, a los lisosomas, orgánulos celulares dotados de una potente maquinaria enzimática, se les asignó la degradación general, no selectiva. Sin embargo, no dejan de aparecer pruebas que apoyan la existencia de mecanismos de degradación específica de ciertas proteínas en los lisosomas.

Entre las múltiples proteínas que pueden ser objeto de degradación en los lisosomas se encuentran las proteínas de la membrana celular y las proteínas extracelulares. Estas proteínas, una vez internalizadas por los endosomas (estructuras vesiculares del interior celular), sufren una completa degradación tras la fusión de estos orgánulos con lisosomas en un proceso de *heterofagia*. Una fusión similar se produce entre los lisosomas y las vesículas de secreción, que contienen proteínas sintetizadas en el interior celular y cuyo destino último reside en el medio extracelular. Este proceso degradativo de *crinofagia* es el responsable de la regulación de los niveles de secreción celular de proteínas. El otro grupo amplio de sustratos lisosómicos los constituyen las proteínas citosólicas. Se sirven de diversos mecanismos de transporte para arribar al interior de los lisosomas. Por ejemplo, los lisosomas engloban porciones de citosol, a veces orgánulos completos, en un proceso de *macroautofagia* o de *microautofagia*, según el tamaño de la porción citosólica englobada.

La autofagia lisosómica se caracteriza principalmente por su falta de selectividad. Una vez en el interior del lisosoma, las proteínas englobadas se degradan de forma conjunta. Corresponde a la microautofagia, siempre activa, mantener los niveles basales de proteólisis intracelular; a la macroautofagia, que se activa preferentemente en las primeras fases de privación de nutrientes, aporta a las células los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas esenciales.

Además de estos dos procesos no selectivos de degradación de proteínas citosólicas en los lisosomas,

se ha confirmado la existencia de un transporte directo de ciertas proteínas citosólicas, a través de la membrana lisosómica. En este proceso, muy similar al transporte de proteínas a otros orgánulos celulares (mitocóndrias, retículo endoplasmático, vacuolas, etc), intervienen factores citosólicos, componentes de membrana y proteínas intralisosómicas.

Aunque no se ha identificado todavía el estímulo que activa esta vía degradativa directa, sí que se conoce la existencia de una señal marcadora en la secuencia de aminoácidos de la proteína sustrato (el pentapéptido Lys-Phe-Glu-Arg-Gln ó KFERQ), responsable de la interacción con el factor citosólico implicado en esta vía, la proteína de choque térmico de 73kDa (hsc73). Esta hsc73 mantiene a la proteína sustrato en una conformación adecuada para favorecer su unión con la membrana lisosómica y su posterior transporte a través de la misma (Figura 28).

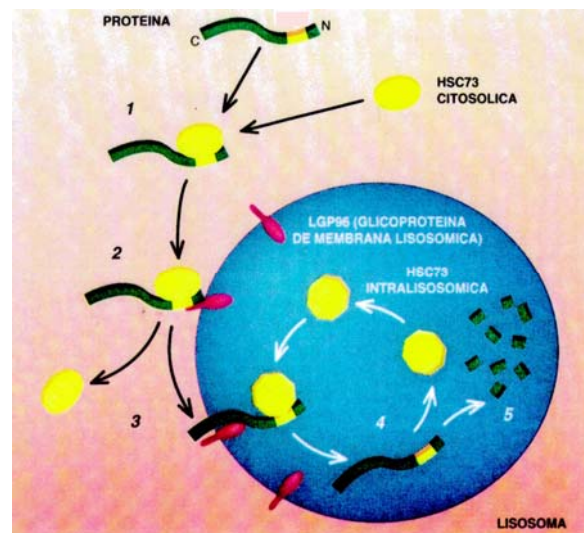


FIGURA 28. Degradación selectiva de proteínas citosólicas por el lisosoma. La zona amarilla en la proteína representa al pentapéptido KFERQ (Cuervo, 1997)

Recientemente, se ha identificado el primer componente de este sistema de transporte, una glicoproteína integral de la membrana lisosómica de 96 kDa (Igp96), cuya región C-terminal aparece expuesta en la superficie del lisosoma y sirve de punto de anclaje para las proteínas sustrato. Tras la unión a la membrana del lisosoma, las proteínas viajan al interior en un proceso de transporte que requiere la presencia en la matriz lisosómica de una proteína de choque térmico de 73 kDa, variante de la forma citosólica. Por comparación con otros transportadores celulares, la hsc73 lisosómica podría actuar como fuerza motriz que, tras anclarse a la porción de proteína que alcanza en un primer momento la matriz lisosómica, empujaría al resto de la proteína hacia el interior. Una vez en la matriz y tras disociarse de la

TABLA 9. Algunas de las proteasas lisosómicas mejor caracterizadas

Nombre y clasificación	Mw relativo	pH óptimo	Características de la actividad
Catepsina B (cisteín-proteasa)	24.000	5	Presenta actividad endopeptidasa o carboxipeptidasa dependiendo del sustrato empleado. Se inhibe por agentes oxidantes de tioles
Catepsina L (cisteín-proteasa)	24.000	5	Actividad endopeptidasa, preferencia por residuos hidrofóbicos. Se inhibe por reactivos de tioles.
Catepsina H (cisteín-proteasa)	28.000	5	Actividad endopeptidasa o aminopeptidasa dependiendo del sustrato empleado. Se inhibe por reactivos de tioles
Catepsina D (aspartato-proteasa)	42.000	3,5	Mecanismo de acción similar a la pepsina Se inhibe por pepstatina

hsc73 lisosómica, la proteína se sometería a su completa degradación.

Es de destacar, que aunque esta vía selectiva de degradación lisosómica de proteínas citosólicas, puede operar en condiciones basales, se activa sobre todo en situaciones de ayuno prolongado. En tales condiciones extremas, y tras una primera fase de activación de la autofagia, la célula parece necesitar un proceso degradativo más selectivo, en el que solo se sacrifican las proteínas que no son vitales en estas circunstancias en beneficio de la síntesis de proteínas imprescindibles para el funcionamiento celular. Entre los sustratos que se someterán a una degradación específica está el propio proteosoma. Se ha propuesto así que, en condiciones extremas celulares, esta vía lisosómica, al intervenir en la degradación de otras proteasas intracelulares, podría controlar también la actividad de otros sistemas degradativos.

La descripción de estas vías degradativas selectivas lisosómicas está contribuyendo a modificar la vieja imagen de los lisosomas como “sacos de proteasas”, para atribuirles funciones reguladoras en diversos procesos fisiológicos. Por otra parte, se pone de manifiesto la existencia de un equilibrio dinámico entre los distintos sistemas degradativos intracelulares, regulado por sus múltiples interacciones, que asegura así un control estricto de este proceso fundamental, que es la degradación proteica.

4.2 Catepsinas

4.2.1 Aspectos generales

El nombre catepsina fue introducido en 1929 por Willstätter y Bamann para una proteasa que actuaba a pH ácido pero que difería de la pepsina. El término actual de catepsina es usado para proteasas intracelulares (mayoritariamente localizadas en los lisosomas) las cuales son activas a pH ácido (el pH del lisosoma está alrededor de 5). La mayoría de las

catepsinas son cisteín-proteasas pero existen excepciones (Tabla 9). Su concentración en los lisosomas es muy alta (10-40 mg/mL) de ahí su necesidad de ser secuestradas en vesículas.

La catepsina B es, sin duda, la catepsina mejor caracterizada. Ha sido aislada de diferentes tejidos de mamíferos, y sus propiedades no varían en gran medida entre diferentes especies. Recientemente, se ha aislado en la levadura. La primera estructura cristalina para una catepsina B fue resuelta en 1991. La enzima está glicosilada en un residuo de asparagina (Asn113, para la numeración de la catepsina B humana). Su secuencia se conoce para la enzima de ratón, hígado bovino e hígado humano (254 aminoácidos). El peso molecular de la forma glicosilada es de 29 kDa. Una ruptura en Asn47 produce dos péptidos, uno ligero de 5 kDa y otro pesado de 24 kDa, que permanecen unidos por un puente disulfuro. El centro activo de la enzima está en la cadena ligera (Cys29). La catepsina B se expresa como un zimógeno de 39 kDa el cual es procesado en el aparato de Golgi antes de ser enviada al lisosoma. Hay evidencias de que esta activación del zimógeno es un proceso de autocatálisis en que catepsina B activa a procatepsina B.

4.2.2 Función de las catepsinas lisosómicas en el organismo

Aunque existen muchas evidencias de que las catepsinas juegan un papel primordial en un gran número de procesos fisiológicos (más del 70% de la proteólisis intracelular es debida a las proteasas lisosomales), no ha podido ser establecido, con toda seguridad, la función exacta para una catepsina en concreto. Además de su actividad proteolítica específica y no específica comentada anteriormente, las catepsinas podrían tener importancia en procesos de activación. Así, la catepsina B activa la proalbumina a albumina, la prorenina a renina y el tripsinógeno a tripsina. Otra función de las catepsinas,

especialmente para catepsinas B, L y K, es la degradación de colágeno en los osteoclastos y la activación de colagenasas. Las catepsinas B, L y H también degradan a las histonas y la B al fibrinógeno. Existen también evidencias de que podrían estar implicadas en la reproducción, en la diferenciación celular y en la proliferación. Por último, también se piensan que podrían estar implicadas en la respuesta inmune en procesos de presentación de antígenos.

4.2.3 Implicación de las catepsinas en procesos patológicos

El control anómalo de las catepsinas da lugar a diversos procesos patológicos, entre los que se encuentran:

(1) **Procesos inflamatorios y traumáticos:** Los macrófagos y granulocitos neutrófilos que median en la respuesta inmune, excretan vesículas de degradación en la, que por supuesto, se incluyen enzimas lisosomales. Normalmente, estas catepsinas se encuentran controladas por inhibidores extracelulares y por el pH neutro del entorno. Sin embargo, en condiciones anormales, puede haber un desajuste entre las concentraciones de las proteasas y sus inhibidores, así como, disminuciones de pH en el microentorno, lo que produciría una activación de las catepsinas. Algunos ejemplos, muestran que la catepsina B se encuentra en gran concentración en los fluidos articulares en pacientes con artritis reumatoide, y la catepsina L parece ser la responsable de la degradación del cartílago en artritis óseas. También hay evidencias de la implicación de la catepsina B en la formación de los enfisemas pulmonares y en enfermedades inflamatorias crónicas.

(2) **Distrofia muscular:** Esta enfermedad hereditaria se caracteriza por la pérdida muscular progresiva y es causada por la delección en un gen que codifica la proteína distrofina. Esta proteína está asociada a la membrana plasmática de las células musculares. La degradación muscular excesiva es producida por defectos en la membrana plasmática, lo que da lugar a un aumento en la permeabilidad al calcio en estas células y el aumento de la degradación intracelular de proteínas. La migración de macrófagos, para destruir las células musculares defectuosas, producirían un aumento en los niveles de las catepsinas B, H, y L, que ayudarían a degradar proteínas de la membrana citosólica. Estas, junto con las calpaínas, serían las responsables de los síntomas observados en esta enfermedad muscular degenerativa.

(3) **Progresión de tumores, metástasis:** La progresión de un tumor primario para metastatizar otros tejido, depende de la hidrólisis del tejido conectivo de la matriz extracelular (ECM). Catepsina B y L se han encontrado en elevadas concentraciones en tumores malignos y están relacionadas junto con la colagenasa

en la destrucción de la laminina, componente proteico de la ECM:

(4) También hay indicaciones de que las catepsinas podrían estar relacionadas con otras patologías como la enfermedad de Alzheimer, el infarto de miocardio y la osteoporosis.

BIBLIOGRAFÍA

Recambio proteico

Si bien para una visión amplia de la degradación de proteínas, de este y otros apartados, habría que consultar determinadas revisiones y artículos que se recomendarán a continuación, una visión general de este tema se puede obtener en los siguientes libros de texto:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M, Roberts, K. y Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4ª ed., Garland Science, New York. Excelente libro en general, que trata la proteólisis celular en su Capítulo 6. Pero sin duda, la mejor parte de este libro, respecto a la proteólisis intracelular, es la que trata sobre el control del ciclo celular por las ciclinas y su control por el sistema ubiquitina/proteosoma en el Capítulo 17.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L. y Darnell, J. (2003) *Molecular Cell Biology*, 5ª ed. W.H. Freeman & Co., New York. Libro recién editado (también se puede consultar la 4ª ed) con videos y tutoriales sobre el control del ciclo celular por el sistema Cdk-ciclina-proteosoma. Interesante.

Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. (1998) *Bioquímica*, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. Es sin duda el libro de texto que mejor recoge la digestión de proteínas. Hace referencia a este tema en dos capítulos (Capítulos 20 y 28). Además, la localización del tema estaría de acuerdo con nuestra localización en el programa de la asignatura.

Sobre aspectos generales de la proteólisis intracelular también se puede consultar las siguientes revisiones y artículos de investigación:

Atáix, D., Combaret, L., Pouch, M.N. y Taillandier, D. (2002) Cellular control of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. *J. Anim. Sci.* 80: E56-E63. Una excelente y reciente revisión que recoge algunos de los aspectos sobre las señales químicas para el recambio.

Goldberg, A.L., Elledge, S.J. y Harper, J.W. (2001) Proteosomas. *Investigación y Ciencia* 294, 22-27. Revisión general y actualizada sobre los proteosomas, realizada por alguno de sus descubridores. Da una visión global del tema de la proteólisis con bonitas imágenes y una discusión

sobre los aspectos fisiológicos de la proteólisis intracelular.

Grisolía, S., Knecht, E. y Hernández-Yago, J. (1981) Proteólisis intracelular. *Investigación y Ciencia* 57, 122-137. Un artículo antiguo pero interesante sobre la proteólisis intracelular. En él se dan conceptos como la vida media de las proteínas y la forma de medir estos parámetros, sin embargo, resulta un poco anticuado respecto a los sistemas de proteólisis. Interesante de leer para tener una visión histórica del tema.

López-Otín, C. (2000) Proteasas y cáncer. *Investigación y Ciencia* 284, 68-75. Artículo sobre la implicación de los distintos tipos de proteasas en procesos cancerígenos.

Proteasas y localización celular

Aspectos relacionados con el mecanismo de acción de las proteasas se pueden obtener en casi todos los libros de texto de bioquímica. Alguno de los recomendados, incluyendo un libro monográfico sobre proteasas, son los siguientes:

Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. (1998) *Bioquímica*, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. En su Capítulo 11 describe con todo detalle los mecanismos de catálisis de la quimotripsina, una serín-proteasa, y de la carboxipeptidasa A, una metalo-proteasa.

Herrera, E. (1991) *Bioquímica: Aspectos estructurales y vías metabólicas*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. En su Capítulo 29 hace una buena revisión sobre las clases de proteasas, su mecanismo de acción y mecanismos de regulación.

McKee, T. y McKee, J.R. (2003) *Bioquímica: La base molecular de la vida*. 3ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. En su Capítulo 6, dedicado a las enzimas, describe el proceso de activación de zimógenos y el mecanismo de acción de algunas proteasas.

Beynon, R.J. y Bond, J.S. (1989) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. IRL Press, Oxford. Libro monográfico sobre las proteasas. Interesante su lectura aunque en algunos aspectos ya se encuentra un poco anticuado.

Sobre los mecanismos de acción y regulación de las proteasas también se puede consultar las siguientes revisiones y artículos de investigación:

Khan, A.R. y James, M.N.G. (1998) Molecular mechanism for the conversion of zimógenos to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7: 815-836. Una revisión sobre los mecanismos de activación de zimógenos. De lectura recomendada.

Otto, H. y Schirmeister, T. (1997) Cystein Proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133-171. Excelente revisión, mencionada en varios aparta-

dos de este tema, y que estudia todos los aspectos relacionados con esta clase de enzimas.

Storer, A.C. y Ménard, R. (1994) Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 486-500. Excelente revisión sobre el mecanismo de acción de las cisteín-proteasas.

Tang, J. (1998) Pepsin A. en *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barret, A.J., Rawlings, N.D. y Woessner, J.F.; eds) pp. 805-814, Academic Press, Londres. Excelente capítulo que recoge los aspectos estructurales y mecanicísticos de las aspartato-proteasas.

Además, también se aconseja visitar las siguientes páginas web para profundizar en la clasificación y modos de acción de las proteasas

<http://65.219.84.5/prowl/aainfo/proteases/proteases.htm>

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>

http://biochem.wustl.edu/~protease/ser_pro_overview.html

<http://cgat.ukm.my/protease/classification.html>

Proteólisis citosólica

Las siguientes revisiones y artículos de investigación sobre las **calpaínas** son de gran interés.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W y Cong, J. (2002) The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801. Revisión completa y actualizada sobre estas proteasas dependientes de calcio. Se recogen aspectos estructurales, fisiológicos y patológicos de este sistema enzimático.

Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L. y Jia, Z. (1999) Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18: 6880-6889. Estudio cristalográfico sobre las calpaínas donde se discuten los mecanismos de activación por calcio.

Khorchid, A. y Ikura, M. (2002) How calpain is activated by calcium. *Nat. Struct. Biol.* 9: 239-241. Artículo corto de fácil lectura y que desvela la presencia de nuevos sitios de unión a calcio en las calpaínas.

Otto, H. y Schirmeister, T. (1997) Cystein Proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133-171. Excelente revisión, mencionada en varios apartados de este tema, y que dedica varias páginas a revelar los últimos conocimientos sobre las calpaínas, incluido un apartado sobre su implicación en diversas enfermedades.

Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. y Tsai, L. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615-622. Identificación de calpaínas en rutas de neurodegeneración asociadas al Alzheimer. Artículo con una gran difusión.

- Tidball, J. y Spencer, M.J. (2000) Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 1-5. Revisión que recoge la implicación de las calpaínas en la distrofia muscular y propone nuevas terapias para esta enfermedad.
- La siguiente bibliografía está referida a la degradación proteica por el **proteosoma**. La bibliografía encontrada sobre este tema es muy numerosa, aquí se incluyen algunas revisiones de gran interés, artículos monográficos, e incluso, un libro dedicado al sistema ubiquitina-proteosoma.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl y Seemuler, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367-380. Excelente revisión de lectura obligada. Recoge los aspectos estructurales, y de regulación de la ruta del proteosoma.
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160. Excelente revisión sobre el proteosoma y la ruta de ubiquitinación, de uno de los autores más reconocidos sobre el tema. Se discuten los distintos tipos de enzimas E3 y su interacción con las proteínas sustrato.
- DeMartino, G. y Slaughter, C.A. (1999) The proteasome regulated by multiple mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 22123-22126. Revisión corta sobre los mecanismos de control y regulación de los proteosomas.
- Goldberg, A.L., Elledge, S.J. y Harper, J.W. (2001) Proteosomas. *Investigación y Ciencia* 294, 22-27. Revisión general y actualizada sobre los proteosomas, realizada por alguno de sus descubridores. Da una visión global del tema de la proteólisis con bonitas imágenes y una discusión sobre los aspectos fisiológicos de la proteólisis intracelular.
- Grune, T., Reinheckel, T. y Davies, K.J. (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11: 526-534. Demostración de una ruta de degradación de proteínas independiente de la ubiquitina. Explicación de los factores estructurales necesarios para el reconocimiento y la catálisis.
- Harris, A.L. (2002) Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev.* 2: 38-47. Una revisión en la que se explica la regulación de los genes inducibles por hipoxia, por el supresor de tumores VHL.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. Y Gordon, C. (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* 28: 26-31. Revisión sobre los procesos que tienen lugar en la cavidad reguladora del proteosoma para introducir los sustratos a la cavidad proteolítica.
- Huffman, H.A., Sadeghi, M., Seemuller, E., Baumeister, W. y Dunn, M.F. (2003) Proteasome-cytochrome c interactions: A model system for investigation of proteasome host-guest interactions. *Biochemistry* 42: 8679-8686. Estudios del mecanismo cinético del proteosoma 20S de *Thermoplasma acidophilum*.
- Johnston, S.C., Riddle, S.M., Cohen, R.E. y Hill, C.P. (1999) Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J.* 18: 3877-3887. Estudio estructural de una enzima que participa en desubiquitinación.
- Kisselev, A.F., Songyang, Z. Y Goldberg, A.L. (2000) Why does threonine and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J. Biol. Chem.* 275: 14831-14837. Artículo sobre el mecanismo de catálisis del proteosoma.
- Koepp, D.M., Harper, J.W. y Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97: 431-434. Regulación del ciclo celular por el proteosoma.
- McNaught, K., Olanow, C.W., Haliwell, B., Isacson, O. y Jenner, P. (2001) Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev.* 2: 589-594. Implicaciones del proteosoma en la enfermedad de Parkinson.
- Pajonk, F. y McBride, W.H. (2001) The proteasome in cancer biology and treatment. *Radiation Res.* Una revisión completa sobre la implicación de los proteosomas en el cáncer.
- Sacristan, M. y Bueno, A. (2002) Salida de mitosis: Inactivación de CDK y replicación del genoma. *Investigación y Ciencia* 312: 31-32. Artículo breve sobre la regulación del ciclo celular incluyendo a las Cdk, las ciclinas y el proteosoma.
- Sweder, K. y Madura, K. (2002) Regulation of repair by the 26S proteasome. *J. Biomed. Biotech.* 2: 94-105. Implicación del proteosoma 26S en la reparación del ADN.
- Verma, R. y Deshaies, R.J. (2000) A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101, 341-344. Revisión corta que intenta explicar el extraño caso de la ODC.
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J. y Baumeister, W. (1998) 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 121: 19-29: A pesar de su modernidad, un clásico en la bibliografía del proteosoma. Magníficas fotografías sobre la estructura de este complejo proteico.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C. y Hill, C.P. (2000) Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408: 115-120. Artículo corto que estudia los aspectos estructurales de la degradación de proteínas por el

proteosoma, en una ruta independiente de ubiquitina.

Zwickl, P. y Baumeister, W. Eds. (2002) The proteasome-ubiquitin protein degradation pathway. Springer Verlag, Un excelente libro sobre la ruta ubiquitina-proteosoma. Incluye ocho capítulos escritos por las máximas autoridades en el tema y que va desde aspectos estructurales, catalíticos o de regulación hasta sus funciones fisiológicas y patológicas.

A continuación se describen algunos artículos relacionados con las **caspasas** y la **apoptosis**.

Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16. Otra excelente revisión, aconsejable de leer después de la revisión de Thornberry y Lazebnik para aspectos más concretos de las caspasas.

Ortiz-Lombardía M. y Maté-Pérez, M.J. (2003) Apoptosis: mecanismos moleculares. *Investigación y ciencia* 321: 38-39. Lectura corta sobre la apoptosis, recomendable para hacerse una idea general del proceso.

Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316. Excelente revisión, no muy larga, que recoge casi todos los aspectos conocidos de las caspasas, como clasificación estructura, activación, participación en apoptosis, control en enfermedades. Sin duda una lectura obligada sobre estas enzimas.

Wolf B.B. y Green D.R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274: 20049-20052. Mecanismos de actuación de las caspasas en la apoptosis.

Proteólisis lisosómica

La siguiente bibliografía recoge algunos aspectos relacionados con la **proteólisis lisosómica** y las **catepsinas**.

Bohley, P. y Seglen, P.O. (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48, 151-157. Artículo describiendo los procesos de proteólisis en los lisosomas y la implicación de las catepsinas.

Cuervo, A.M. (1997) Lisosomas: Algo más que vertederos celulares. *Investigación y Ciencia* :32-33. Lectura corta sobre la degradación selectiva y no selectiva en los lisosomas. De lectura obligada para una visión rápida y general del tema.

Cuervo, A.M. y Dice, J.F. (1998) How do intracellular proteolytic system change with age? *Front. Biosci.* 3, 25-43. Revisión de como los sistemas enzimáticos involucrados en la proteólisis son afectados por la edad.

Otto, H. y Schirmeister, T. (1997) Cystein Proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133-171. Excelente revisión, mencionada en varios aparta-

dos de este tema. Trata de una forma muy completa a las catepsinas en varios aspectos, incluido su implicación patológica.