





**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

***INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLOGICAS***

**MECANISMOS DE DEGRADACION INTRACELULAR**

**DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES:**

***Estudio sobre el proceso de recambio***

***de la Ornitina Transcarbamilasa***

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Alfonso Navarro Marzal**

**Dirigida por:**

**Profesor Santiago Grisolia**

**Valencia, Enero de 1992.**



UMI Number: U603131

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603131

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
BIBLIOTHECA

Nº de entrada ~~AC-875~~ 23.419.

DATA ~~18-2-2005~~.

SIGNATURE

70-Q/316.

Nº de R. 18671731.

**SANTIAGO GRISOLIA**, *Profesor Honorario de la Universidad de Valencia y Profesor Distinguido de Bioquímica de la Universidad de Kansas,*

**CERTIFICA** que la presente Tesis Doctoral: " **MECANISMOS DE DEGRADACION INTRACELULAR DE PROTEINAS MITOCONDRIALES: Estudio sobre el proceso de recambio de la Ornitina Transcarbamilasa** ", ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado en Ciencias Químicas **D. Alfonso Navarro Marzal**, y que habiendo revisado el trabajo, considera que reúne los méritos necesarios para optar al grado de Doctor.

*Para que así conste a todos los efectos, se expide la presente certificación en Valencia, Enero de 1992.*

A handwritten signature in black ink, reading "Santiago Grisolia". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.

**Fdo. Profesor Santiago Grisolia**

*Para Rosa por su ternura y firmeza*

*A mis padres , con todo mi cariño*

*...no hay cuestiones pequeñas, las que lo parecen son cuestiones grandes no comprendidas.*

(Santiago Ramón y Cajal, *Los tónicos de la voluntad*)

*It always seemed to me that a biochemist devoted to enzymes could, if persistent, reconstitute any metabolic event in the test tube as well as the cell does it. In fact better!*

(Arthur Kornberg, *Never a dull enzyme*)

Llegar al final de una etapa y concluir esta Tesis Doctoral, ha llevado consigo también el recuerdo de los años vividos y las experiencias compartidas con las personas a las que ahora quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer al Profesor Santiago Grisolfá, no sólo Director de esta Tesis sino también mi maestro en esta singladura que es la carrera científica, por haberme acogido en su laboratorio, por el tiempo que me ha dedicado y por enseñarme lo duro que es este camino.

Al Profesor Joaquín Colomer, de cuya confianza y cariño me hubiera gustado ser más digno depositario, quisiera agradecerle, más allá de los estrechos límites de estas líneas, su incondicional apoyo y amistad, que han sido mi estímulo y soporte más firmes.

Quiero dar las gracias de manera muy especial a Ruth Wallace, por toda la generosidad que ha derrochado conmigo y el afecto, a su manera pero bien entendido, con el que me ha mimado siempre. Todo ello ha sido más importante aun que su incalculable ayuda y aportación a este trabajo.

También me gustaría mostrar mi más profunda gratitud al Dr. Erwin Knecht, puesto que no sólo me ha brindado su experiencia y ayuda más desinteresadas, sino que siempre ha sabido cómo aconsejarme y corregir mis errores con infinita paciencia.

A la amistad de Carmen Navarro, que ha sido inestimable durante todos estos años, debo no sólo las figuras de este trabajo, sino también el haber escuchado y compartido mis dudas y problemas.

Asimismo, quiero dar las gracias al Dr. José Hernández-Yago, por sus acertados consejos y la amabilidad con que siempre me ha distinguido; al Dr. Vicente Rubio, que nunca ha escatimado su tiempo para prestarme la ayuda, orientación y crítica constructiva del amigo que es; a la Dra. Consuelo Guerri, por iniciarme en las técnicas de determinación de vidas medias y por haberse preocupado constantemente por mi trabajo.

Deseo también agradecer muy especialmente a mi hermano Carlos sus denodados esfuerzos por darle a esta Tesis una prosa menos ardua y más ortodoxa; al Dr. Vicente Miralles, amigo incondicional con el que he compartido no pocas vicisitudes, entre ellas la aventura de la purificación de la OTC de vaca; a la Dra. Eulalia Alonso y al Dr. Ricardo Flores por tanto afecto y cariño mutuo; al Dr. Juan Saus, a quien volvería a prestar mi chaqueta, y al Dr. Joaquín Timoneda, con quien compartí mis inicios en la proteólisis y la bioestadística, por su amistad; a la Dra. Rosa Sanchís, por la alegría y el optimismo con los que siempre supo contagiarme; a la Dra. Ana Guadalajara, cuyo ejemplo fue siempre un magnífico aliciente en mi trabajo; a Filomena Bote, Gloria Picó, María José Lázaro y Elisa Marco por haber tenido siempre una sonrisa y una mano tendida para ayudarme; a todos los miembros de mi familia, que tanto han contribuido a hacer posible la realización de esta Tesis, porque su apoyo ha sido fundamental.

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento a la Caja de Ahorros de Valencia y a SM la Reina Doña. Sofía por la creación de la beca de iniciación a la investigación que lleva su nombre y que disfruté durante la realización de esta Tesis.

Las abreviaturas, símbolos y normas de citación de las referencias bibliográficas empleados en esta Tesis, han seguido, generalmente, las pautas recomendadas por el *European Journal of Biochemistry* (detalladas en el último número de cualquier volumen) y por el *Biochemical Journal* (descritas en *Biochem. J.* (1991) 273, 1-19). Los símbolos de los nucleótidos de secuencias de ácidos nucleicos, y las abreviaturas, bien de una o de tres letras, de los aminoácidos del código genético, al seguir la nomenclatura recomendada por la International Union of Biochemistry, se han utilizado sin definición previa. Los restantes símbolos y abreviaturas son:

ADP, CDP, GDP, IDP, UDP	5'-difosfatos de adenosina, citidina, guanina, inosina y uridina.
AMP, etc.	5'-monofosfatos de adenosina, etc.
ATP, etc.	5'-trifosfatos de adenosina, etc.
Ado-P[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PP	5'-[α,β-metileno]trifosfato de adenosina
Ado-PP[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> P	5'-[β,γ-metileno]trifosfato de adenosina
Ado-PP[NH]P	5'-[imino]trifosfato de adenosina
ADP-β-S	5'-[β-tio]difosfato de adenosina
AP <sub>5</sub> A	adenosina(5')pentafosfo(5')adenosina
AP <sub>6</sub> A	adenosina(5')hexafosfo(5')adenosina
ATP-γ-S	5'-[γ-tio]trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosina Trifosfatasa
cAMP, etc.	adenosina 3',5'-fosfato, etc.
d-AMP, etc.	5'-monofosfato de 2'-desoxiadenosina, etc
dibutiril-c-AMP	dibutiriladenosina 3',5'-monofosfato
ε-ATP	1,N <sup>6</sup> -etenoadenosina 5'-trifosfato
ATC	Aspartato Transcarbamilasa
bp	pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
Cit	citulina
Cl <sub>3</sub> AcOH	ácido tricloroacético
CoA	coenzima A
CP	carbamil fosfato
CPS I	Carbamil Fosfato Sintetasa I
CTAB	bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio
DNA, cDNA	ácido desoxirribonucleico, DNA complementario
DTE	ditioeritritol
ε	coeficiente de absorción molar
E64	L-trans-epoxisuccinil leucilamida(4-guanidino)butano

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FCCP	carbonilcianuro 4-trifluorometoxifenilhidrazona
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
Hepes	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfónico
IAA	ácido yodoacético
IgG	Inmunoglobulina G
kb	10 <sup>3</sup> bases
K <sub>D</sub>	constante de velocidad de degradación
K <sub>d</sub>	constante de disociación
K <sub>Eq</sub>	constante de equilibrio
K <sub>m</sub>	contante de Michaelis-Menten
kDa	10 <sup>3</sup> daltons
Mes	ácido 4-morfolinoetanosulfónico
MOPS	ácido 4-morfolinopropanosulfónico
Mr	masa molecular relativa
MSH	2-mercaptoetanol
NAD, NAD <sup>+</sup> , NADH	nicotinamida adenina dinucleótido y sus formas oxidada y reducida
NADP, NADP <sup>+</sup> , NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, formas oxidada y reducida
β-NAGASA	β-N-Acetilglucosaminidasa
NEM	N-etil maleimida
ORN	ornitina
OTC, pOTC, iOTC	Ornitina Transcarbamilasa, su precursor y la forma intermedia del mismo
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
δ-PALO	δ-N-fosfoacetil L-ornitina
PBS	tampón fosfato salino
PEG-20.000	polietilenglicol de
PheMeSO <sub>2</sub> F	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
Pi	fosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
POPOP	1,4 bis (5-feniloxazolil) benceno
PPO	2,5 difeniloxazol
p/v	relación peso/volumen
R <sub>f</sub>	Movilidad relativa
RNA, mRNA, tRNA	ácido ribonucleico, RNA mensajero, RNA de transferencia
RNA <sub>sa</sub>	Ribonucleasa
SDS	dodecil sulfato sódico
t <sub>½</sub>	vida media

TosLysCH<sub>2</sub>Cl

N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona

TosPheCH<sub>2</sub>Cl

L-1-tosilamido-2-feniletilclorometil cetona

Tris

2-amino-2-hidroximetil propano-1,3-diol

U

unidad de actividad enzimática

# INDICE

Pág.

1.- INTRODUCCION.	1
1.1.- El concepto de lisosoma.	1
1.2.- Lisosomas y degradación intracelular de protefnas.	4
1.3.- Determinaciones cuantitativas de las velocidades de proteolisis lisosómica.	7
1.4.- Efectos de los inhibidores del sistema lisosomal.	8
1.5.- La multiplicidad de rutas en la degradación proteica intracelular.	10
1.6.- Regulación del proceso de degradación de protefnas.	14
1.6.1.- Regulación a nivel del sistema proteolítico.	17
1.6.2.- Regulación a nivel de las protefnas substrato.	24
1.6.2.1.- Caracterfsticas estructurales de las protefnas substrato.	26
1.6.2.2.- Caracterfsticas adquiridas por las protefnas substrato.	32
1.7.- Dependencia energética de la proteolisis intracelular.	35
1.8.- Requerimientos energéticos de la proteolisis lisosómica.	37
1.9.- El sistema proteolítico ATP-dependiente de los reticulocitos.	39
1.10.- Sistemas proteolíticos ATP-dependientes en <i>Escherichia coli</i> .	46
1.11.- Otros sistemas proteolíticos ATP-dependientes.	50
1.12.- La hipótesis de la plasticidad molecular.	54
1.13.- Medida del recambio proteico.	56
1.14.- Ornitina Transcarbamilasa.	60
1.14.1.- Perspectiva histórica.	60
1.14.2.- Caracterfsticas generales.	62
1.14.3.- Ornitina Transcarbamilasa de hígado bovino.	63
1.14.4.- Ornitina Transcarbamilasa de hígado de rata.	66
1.15.- Nivel mitocondrial de la Ornitina Transcarbamilasa.	68
1.16.- Deficiencias enzimáticas y aspectos patológicos de la Ornitina Transcarbamilasa.	80
2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	83
3.- MATERIAL.	89
3.1.- Animales.	89
3.2.- Reactivos.	89
3.3.- Tampones y soluciones.	90
3.4.- Aparatos y material informático.	90

4.- METODOS.	92
4.1.- Purificación de la Enzima Ornitina Transcarbamilasa de hígado de ternera.	92
4.2.- Determinación de la actividad enzimática de la Ornitina Transcarbamilasa.	94
4.3.- Preparación de lisosomas.	96
4.3.1.- Preparación de lisosomas de hígado de rata por el método de Wattiaux et al.	96
4.3.2.- Preparación de lisosomas de cerebro de rata.	99
4.4.- Síntesis del $\delta$ -N-fosfoacetil L-ornitina ( $\delta$ -PALO).	100
4.5.- Purificación del $\delta$ -PALO por cromatografía preparativa sobre papel.	101
4.6.- Inmovilización del $\delta$ -PALO a un adsorbente.	102
4.7.- Purificación de OTC por cromatografía de afinidad.	102
4.8.- Administración de isótopos y preparación de las diversas fracciones hepáticas utilizadas en la determinación de la vida media de la OTC por el método del doble isótopo.	103
4.9.- Procedimiento de inmunización.	104
4.10.- Preparación de suero.	104
4.11.- Purificación de la fracción de inmunoglobulinas G.	105
4.12.- Microscopía electrónica.	105
4.13.- Preparación de las suspensiones de oro coloidal y de los complejos proteína A-oro coloidal.	106
4.14.- Procedimientos inmunocitoquímicos.	108
4.14.1.- Técnica del marcaje simple.	108
4.14.2.- Técnica del doble marcaje.	109
4.15.- Radioyoduración de la Ornitina Transcarbamilasa.	110
4.16.- Técnicas electroforéticas.	112
4.16.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida/sodio dodecil sulfato (PAGE/SDS).	112
4.16.2.- Inmunodetección de proteínas transferidas electroforéticamente e inmovilizadas sobre un soporte sólido (Western Blotting).	112
4.17.- Fluorografía.	113
4.18.- Preparación de las soluciones de vanadato.	115
4.19.- Determinación de ATP por bioluminiscencia.	115
4.20.- Condiciones de incubación.	118

<b>5.- RESULTADOS</b>	<b>119</b>
5.1.- Purificación de la Ornitina Transcarbamilasa de hígado de ternera.	119
5.2.- Purificación de la Ornitina Transcarbamilasa. de hígado de rata por cromatografía de afinidad.	121
5.3.- Preparación de lisosomas.	124
5.4.- Inmunocitoquímica cuantitativa de proteínas mitocondriales.	128
5.5.- Determinaciones cuantitativas del recambio proteico en hígado de rata.	144
5.6.- Inactivación y proteólisis lisosómica de la Ornitina Transcarbamilasa.	154
5.7.- Estructura proteica y estabilidad intracelular de las proteínas mitocondriales.	179
<b>6.- DISCUSION</b>	<b>202</b>
6.1.- Localización inmunocitoquímica mediante la técnica de los complejos proteína A-oro coloidal.	202
6.2.- Niveles intracelulares de las enzimas mitocondriales.	205
6.3.- Velocidad de recambio de la Ornitina Transcarbamilasa.	207
6.4.- Susceptibilidad de la OTC al sistema proteolítico lisosomal.	212
6.5.- Determinantes moleculares de la velocidad de recambio de las proteínas mitocondriales.	219
<b>7.- CONCLUSIONES.</b>	<b>226</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>228</b>

# **1.- INTRODUCCION**

El principal objetivo de esta Introducción es realizar un compendio de las materias más importantes sobre las que se fundamenta la concepción del trabajo que se presenta, proporcionando un marco adecuado para su mejor comprensión. No obstante, el tema de la degradación de proteínas es extenso y, tanto para cuestiones generales como para una ampliación de otros aspectos del mismo, se deben de consultar previas y excelentes revisiones (30, 39, 55, 62, 67, 95, 116, 197, 198, 199, 205, 229, 258, 259, 263, 264, 398, 422, 437, 439, 504, 523, 525, 526, 534, 536, 575, 590, 609, 610, 611, 679, 680, 701), así como las publicaciones correspondientes a algunos de los últimos simposios celebrados y libros publicados sobre esta cuestión (56, 305-308, 312, 325).

Se comienza por describir el sistema proteolítico estudiado en este trabajo, los lisosomas, destacando su importancia en la proteólisis intracelular. Tras evidenciar la existencia de múltiples rutas degradativas, se resalta el alto grado de regulación de estos procesos, su dependencia energética y se hace referencia a los más importantes sistemas proteolíticos ATP-dependientes. A continuación, se exponen la hipótesis de la plasticidad molecular, las bases teóricas de los procedimientos de medida del recambio proteico y, finalmente, se detalla el conocimiento actual acerca de la enzima objeto de este estudio: la Ornitina Transcarbamilasa.

### 1.1.- EL CONCEPTO DE LISOSOMA.

Hace treinta años todavía se debatía acerca del grado de aplicabilidad que tenía el concepto de lisosoma. Hoy en día ya no existe ese problema y el lisosoma se considera presente, en una u otra forma, como una característica constante de todas las células eucariotas, no sólo animales sino también del reino vegetal. No obstante, las células postcarióticas (reticulocitos, eritrocitos, etc.) carecen de lisosomas, así como las bacterias. Sin embargo, estas últimas poseen una maquinaria degradativa cuyas hidrolasas se encuentran en su mayoría concentradas en la membrana plasmática y que, evolutivamente, podría ser la precursora de los lisosomas en las células de mamíferos.

El concepto de lisosoma se basa esencialmente en dos criterios bioquímicos: 1) la asociación de una gran variedad de hidrolasas ácidas, es decir con un valor de pH ácido para el óptimo de su actividad, dentro de un determinado y especial grupo de partículas citoplasmáticas que fueron identificadas y caracterizadas en virtud de sus propiedades centrífugas; 2) el compartir una propiedad llamada latencia, estrechamente vinculada a la estructura del lisosoma, y que permite definirlo como una partícula en forma de "saco" y rodeada por una membrana lipoproteica. Las membranas lisosomales presentan una composición similar a la de la membrana plasmática, salvo que en aquellas el contenido en colesterol es más alto (alrededor del 20 % de los lípidos totales), y que entre sus fosfolípidos, la esfingomielina alcanza hasta el 30 % (640). Por su cara interna, las membranas lisosomales tienen una gran cantidad de compuestos asociados, de los que un alto

porcentaje son residuos hidrolíticos como aminoácidos libres, ácido siálico, etc. (118). Especialmente importante es el contenido en azúcares de dicha membrana, en comparación con otras membranas como las mitocondriales (326).

Al contrario de lo que ocurre con otros orgánulos intracelulares, los lisosomas no pueden ser identificados por los criterios morfológicos al uso, como pueden ser el tamaño, la forma y la estructura interna, debido a la enorme variabilidad que presentan en estas características, dando origen a un polimorfismo que constituye en sí mismo su principal señal de identidad. Tanto es así que, cuando se observan al microscopio electrónico cuerpos rodeados de membrana y conteniendo depósitos densos, vesículas membranosas o cualquier otro material de confusa apariencia, se sabe que muy probablemente lo que estamos mirando es un lisosoma.

Precisamente, debido a la elevada heterogeneidad morfológica de esta subestructura celular, se han generado una gran cantidad de términos descriptivos de la misma. No obstante, la terminología más difundida para la clasificación de los lisosomas y otras estructuras relacionadas es la siguiente (390):

- Lisosoma primario: orgánulo, en general, de tamaño pequeño (unos 50 a 100 nm.) que contiene enzimas hidrolíticas que todavía no han participado en ningún proceso degradativo. Morfológicamente aparecen al microscopio electrónico con una matriz uniforme y más o menos densa a los electrones.
- Vacuolas, fagosomas o vacuolas fagocíticas: orgánulos sin enzimas hidrolíticas (pre-lisosomas) pero que contienen material de origen extracelular (vacuola endocítica, heterofágica o heterofagosoma) o intracelular (vacuola autofágica o autofagosoma). La vacuola heterofágica o endocítica puede ser a su vez: fagocítica si contiene material de apariencia sólida, o pinocítica si incluye material líquido que le confiere el aspecto de estar vacía.
- Lisosoma secundario: Proviene de la fusión de una vacuola con un lisosoma primario, por lo que poseerá en su interior enzimas hidrolíticas junto con material fagocitado en diferentes estados de degradación. Al microscopio electrónico se presenta como un orgánulo con una matriz más o menos clara y conteniendo diversas estructuras. Pueden dividirse en : heterolisosomas (si la fusión se realiza con una vacuola heterofágica) o autolisosomas (si la vacuola con la que se fusionan los lisosomas primarios es autofágica). A su vez, se denomina también ambilisosoma a un lisosoma secundario que contiene tanto material de origen extracelular como intracelular. Cuando el

material fagocitado se acumula en forma de depósitos que ya no pueden ser degradados en los lisosomas, se originan los llamados cuerpos residuales.

De acuerdo con estos términos, se definen diversas funciones en las que se ven implicados estos orgánulos. La incorporación de material al interior de los lisosomas o vacuolas se denomina fagocitosis. Si lo que se incorpora tiene un origen intracelular se denomina autofagocitosis, que a su vez comprende:

- a) Autofagia: incorporación de orgánulos o estructuras celulares identificables por microscopía electrónica, tales como membranas, mitocondrias, etc.
- b) Crinofagia: cuando son englobadas, o fusionadas con lisosomas, vesículas de secreción (que contienen material cuyo destino era extracelular).
- c) Microautofagia: incorporación de material intracelular de naturaleza molecular y, en general, no visible a microscopía electrónica, al menos mediante las técnicas convencionales.

Cuando la incorporación es de material de origen extracelular, el proceso se denomina heterofagocitosis o endocitosis, que a su vez puede ser de dos clases:

- Endocitosis mediada por receptores: se produce cuando determinadas macromoléculas interaccionan con receptores situados en la membrana plasmática. Dicha interacción genera vesículas en un proceso mediado por la polimerización de una proteína llamada clatrina.
- Endocitosis de fase fluida: se produce cuando las moléculas externas son internalizadas según su concentración extracelular, sin la selectividad que aportan los receptores.

en ambos casos, la vesícula resultante puede interaccionar posteriormente con un lisosoma.

Las estructuras lisosomales pueden intervenir también en procesos de eliminación del material fagocitado al exterior celular. Este tipo de proceso se denomina exocitosis y se puede considerar como un caso especial de secreción.

Nada más confirmarse que el lisosoma era portador de hidrolasas ácidas, y cuando tan sólo empezaba a sospecharse su función digestiva, ya se dedujo que su interior debería poseer un pH ácido. Desde entonces han aparecido en la literatura numerosos intentos de determinar el pH

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

***INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLOGICAS***

**MECANISMOS DE DEGRADACION INTRACELULAR**

**DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES:**

*Estudio sobre el proceso de recambio*

*de la Ornitina Transcarbamilasa*

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Alfonso Navarro Marzal**

**Dirigida por:**

**Profesor Santiago Grisolia**

**Valencia, Enero de 1992.**



UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
BIBLIOTHECA

Nº Registro ~~16-875~~ 23.419.

DATA 18-2-2005.

SIGNATURE

70-Q/316.

Nº de R. 18671731.

**SANTIAGO GRISOLIA**, *Profesor Honorario de la Universidad de Valencia y Profesor Distinguido de Bioquímica de la Universidad de Kansas,*

**CERTIFICA** que la presente Tesis Doctoral: " **MECANISMOS DE DEGRADACION INTRACELULAR DE PROTEINAS MITOCONDRIALES: Estudio sobre el proceso de recambio de la Ornitina Transcarbamilasa** ", ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado en Ciencias Químicas **D. Alfonso Navarro Marzal**, y que habiendo revisado el trabajo, considera que reúne los méritos necesarios para optar al grado de Doctor.

*Para que así conste a todos los efectos, se expide la presente certificación en Valencia, Enero de 1992.*

A handwritten signature in black ink, reading "Santiago Grisolia". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the left.

**Fdo. Profesor Santiago Grisolia**

*Para Rosa por su ternura y firmeza*

*A mis padres , con todo mi cariño*

*...no hay cuestiones pequeñas, las que lo parecen son cuestiones grandes no comprendidas.*

(Santiago Ramón y Cajal, *Los tónicos de la voluntad*)

*It always seemed to me that a biochemist devoted to enzymes could, if persistent, reconstitute any metabolic event in the test tube as well as the cell does it. In fact better!*

(Arthur Kornberg, *Never a dull enzyme*)

Llegar al final de una etapa y concluir esta Tesis Doctoral, ha llevado consigo también el recuerdo de los años vividos y las experiencias compartidas con las personas a las que ahora quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer al Profesor Santiago Grisolfá, no sólo Director de esta Tesis sino también mi maestro en esta singladura que es la carrera científica, por haberme acogido en su laboratorio, por el tiempo que me ha dedicado y por enseñarme lo duro que es este camino.

Al Profesor Joaquín Colomer, de cuya confianza y cariño me hubiera gustado ser más digno depositario, quisiera agradecerle, más allá de los estrechos límites de estas líneas, su incondicional apoyo y amistad, que han sido mi estímulo y soporte más firmes.

Quiero dar las gracias de manera muy especial a Ruth Wallace, por toda la generosidad que ha derrochado conmigo y el afecto, a su manera pero bien entendido, con el que me ha mimado siempre. Todo ello ha sido más importante aun que su incalculable ayuda y aportación a este trabajo.

También me gustaría mostrar mi más profunda gratitud al Dr. Erwin Knecht, puesto que no sólo me ha brindado su experiencia y ayuda más desinteresadas, sino que siempre ha sabido cómo aconsejarme y corregir mis errores con infinita paciencia.

A la amistad de Carmen Navarro, que ha sido inestimable durante todos estos años, debo no sólo las figuras de este trabajo, sino también el haber escuchado y compartido mis dudas y problemas.

Asimismo, quiero dar las gracias al Dr. José Hernández-Yago, por sus acertados consejos y la amabilidad con que siempre me ha distinguido; al Dr. Vicente Rubio, que nunca ha escatimado su tiempo para prestarme la ayuda, orientación y crítica constructiva del amigo que es; a la Dra. Consuelo Guerri, por iniciarme en las técnicas de determinación de vidas medias y por haberse preocupado constantemente por mi trabajo.

Deseo también agradecer muy especialmente a mi hermano Carlos sus denodados esfuerzos por darle a esta Tesis una prosa menos ardua y más ortodoxa; al Dr. Vicente Miralles, amigo incondicional con el que he compartido no pocas vicisitudes, entre ellas la aventura de la purificación de la OTC de vaca; a la Dra. Eulalia Alonso y al Dr. Ricardo Flores por tanto afecto y cariño mutuo; al Dr. Juan Saus, a quien volvería a prestar mi chaqueta, y al Dr. Joaquín Timoneda, con quien compartí mis inicios en la proteólisis y la bioestadística, por su amistad; a la Dra. Rosa Sanchís, por la alegría y el optimismo con los que siempre supo contagiarme; a la Dra. Ana Guadalajara, cuyo ejemplo fue siempre un magnífico aliciente en mi trabajo; a Filomena Bote, Gloria Picó, María José Lázaro y Elisa Marco por haber tenido siempre una sonrisa y una mano tendida para ayudarme; a todos los miembros de mi familia, que tanto han contribuido a hacer posible la realización de esta Tesis, porque su apoyo ha sido fundamental.

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento a la Caja de Ahorros de Valencia y a SM la Reina Doña. Sofía por la creación de la beca de iniciación a la investigación que lleva su nombre y que disfruté durante la realización de esta Tesis.

Las abreviaturas, símbolos y normas de citación de las referencias bibliográficas empleados en esta Tesis, han seguido, generalmente, las pautas recomendadas por el *European Journal of Biochemistry* (detalladas en el último número de cualquier volumen) y por el *Biochemical Journal* (descritas en *Biochem. J.* (1991) 273, 1-19). Los símbolos de los nucleótidos de secuencias de ácidos nucleicos, y las abreviaturas, bien de una o de tres letras, de los aminoácidos del código genético, al seguir la nomenclatura recomendada por la International Union of Biochemistry, se han utilizado sin definición previa. Los restantes símbolos y abreviaturas son:

ADP, CDP, GDP, IDP, UDP	5'-difosfatos de adenosina, citidina, guanina, inosina y uridina.
AMP, etc.	5'-monofosfatos de adenosina, etc.
ATP, etc.	5'-trifosfatos de adenosina, etc.
Ado-P[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PP	5'-[α,β-metileno]trifosfato de adenosina
Ado-PP[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> P	5'-[β,γ-metileno]trifosfato de adenosina
Ado-PP[NH]P	5'-[imino]trifosfato de adenosina
ADP-β-S	5'-[β-tio]difosfato de adenosina
AP <sub>5</sub> A	adenosina(5')pentafosfo(5')adenosina
AP <sub>6</sub> A	adenosina(5')hexafosfo(5')adenosina
ATP-γ-S	5'-[γ-tio]trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosina Trifosfatasa
cAMP, etc.	adenosina 3',5'-fosfato, etc.
d-AMP, etc.	5'-monofosfato de 2'-desoxiadenosina, etc
dibutiril-c-AMP	dibutiriladenosina 3',5'-monofosfato
ε-ATP	1,N <sup>6</sup> -etenoadenosina 5'-trifosfato
ATC	Aspartato Transcarbamilasa
bp	pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
Cit	citrulina
Cl <sub>3</sub> AcOH	ácido tricloroacético
CoA	coenzima A
CP	carbamil fosfato
CPS I	Carbamil Fosfato Sintetasa I
CTAB	bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio
DNA, cDNA	ácido desoxirribonucleico, DNA complementario
DTE	ditioeritritol
ε	coeficiente de absorción molar
E64	L-trans-epoxisuccinil leucilamida(4-guanidino)butano

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FCCP	carbonilcianuro 4-trifluorometoxifenilhidrazona
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
IAA	ácido yodoacético
IgG	Inmunoglobulina G
kb	10 <sup>3</sup> bases
K <sub>D</sub>	constante de velocidad de degradación
K <sub>d</sub>	constante de disociación
K <sub>Eq</sub>	constante de equilibrio
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
kDa	10 <sup>3</sup> daltons
Mes	ácido 4-morfolinoetanosulfónico
MOPS	ácido 4-morfolinopropanosulfónico
Mr	masa molecular relativa
MSH	2-mercaptoetanol
NAD, NAD <sup>+</sup> , NADH	nicotinamida adenina dinucleótido y sus formas oxidada y reducida
NADP, NADP <sup>+</sup> , NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido, formas oxidada y reducida
β-NAGASA	β-N-Acetilglucosaminidasa
NEM	N-etil maleimida
ORN	ornitina
OTC, pOTC, iOTC	Ornitina Transcarbamilasa, su precursor y la forma intermedia del mismo
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
δ-PALO	δ-N-fosfoacetil L-ornitina
PBS	tampón fosfato salino
PEG-20.000	polietilenglicol de
PheMeSO <sub>2</sub> F	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
Pi	fosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
POPOP	1,4 bis (5-feniloxazolil) benceno
PPO	2,5 difeniloxazol
p/v	relación peso/volumen
R <sub>f</sub>	Movilidad relativa
RNA, mRNA, tRNA	ácido ribonucleico, RNA mensajero, RNA de transferencia
RNAsa	Ribonucleasa
SDS	dodecil sulfato sódico
t <sub>1/2</sub>	vida media

TosLysCH<sub>2</sub>Cl

N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona

TosPheCH<sub>2</sub>Cl

L-1-tosilamido-2-feniletilclorometil cetona

Tris

2-amino-2-hidroximetil propano-1,3-diol

U

unidad de actividad enzimática

# INDICE

Pág.

1.- INTRODUCCION.	1
1.1.- El concepto de lisosoma.	1
1.2.- Lisosomas y degradación intracelular de protefñas.	4
1.3.- Determinaciones cuantitativas de las velocidades de proteolisis lisosómica.	7
1.4.- Efectos de los inhibidores del sistema lisosomal.	8
1.5.- La multiplicidad de rutas en la degradación proteica intracelular.	10
1.6.- Regulación del proceso de degradación de protefñas.	14
1.6.1.- Regulación a nivel del sistema proteolítico.	17
1.6.2.- Regulación a nivel de las protefñas substrato.	24
1.6.2.1.- Caracterfsticas estructurales de las protefñas substrato.	26
1.6.2.2.- Caracterfsticas adquiridas por las protefñas substrato.	32
1.7.- Dependencia energética de la proteolisis intracelular.	35
1.8.- Requerimientos energéticos de la proteolisis lisosómica.	37
1.9.- El sistema proteolítico ATP-dependiente de los reticulocitos.	39
1.10.- Sistemas proteolíticos ATP-dependientes en <i>Escherichia coli</i> .	46
1.11.- Otros sistemas proteolíticos ATP-dependientes.	50
1.12.- La hipótesis de la plasticidad molecular.	54
1.13.- Medida del recambio proteico.	56
1.14.- Ornitina Transcarbamilasa.	60
1.14.1.- Perspectiva histórica.	60
1.14.2.- Caracterfsticas generales.	62
1.14.3.- Ornitina Transcarbamilasa de hígado bovino.	63
1.14.4.- Ornitina Transcarbamilasa de hígado de rata.	66
1.15.- Nivel mitocondrial de la Ornitina Transcarbamilasa.	68
1.16.- Deficiencias enzimáticas y aspectos patológicos de la Ornitina Transcarbamilasa.	80
2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	83
3.- MATERIAL.	89
3.1.- Animales.	89
3.2.- Reactivos.	89
3.3.- Tampones y soluciones.	90
3.4.- Aparatos y material informático.	90

<b>4. - METODOS.</b>	<b>92</b>
4.1.- Purificación de la Enzima Ornitina Transcarbamilasa de hígado de ternera.	92
4.2.- Determinación de la actividad enzimática de la Ornitina Transcarbamilasa.	94
4.3.- Preparación de lisosomas.	96
4.3.1.- Preparación de lisosomas de hígado de rata por el método de Wattiaux et al.	96
4.3.2.- Preparación de lisosomas de cerebro de rata.	99
4.4.- Síntesis del $\delta$ -N-fosfoacetil L-ornitina ( $\delta$ -PALO).	100
4.5.- Purificación del $\delta$ -PALO por cromatografía preparativa sobre papel.	101
4.6.- Inmovilización del $\delta$ -PALO a un adsorbente.	102
4.7.- Purificación de OTC por cromatografía de afinidad.	102
4.8.- Administración de isótopos y preparación de las diversas fracciones hepáticas utilizadas en la determinación de la vida media de la OTC por el método del doble isótopo.	103
4.9.- Procedimiento de inmunización.	104
4.10.- Preparación de suero.	104
4.11.- Purificación de la fracción de inmunoglobulinas G.	105
4.12.- Microscopía electrónica.	105
4.13.- Preparación de las suspensiones de oro coloidal y de los complejos proteína A-oro coloidal.	106
4.14.- Procedimientos inmunocitoquímicos.	108
4.14.1.- Técnica del marcaje simple.	108
4.14.2.- Técnica del doble marcaje.	109
4.15.- Radioyoduración de la Ornitina Transcarbamilasa.	110
4.16.- Técnicas electroforéticas.	112
4.16.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida/sodio dodecil sulfato (PAGE/SDS).	112
4.16.2.- Inmunodetección de proteínas transferidas electroforéticamente e inmovilizadas sobre un soporte sólido (Western Blotting).	112
4.17.- Fluorografía.	113
4.18.- Preparación de las soluciones de vanadato.	115
4.19.- Determinación de ATP por bioluminiscencia.	115
4.20.- Condiciones de incubación.	118

<b>5.- RESULTADOS</b>	<b>119</b>
5.1.- Purificación de la Ornitina Transcarbamilasa de hígado de ternera.	119
5.2.- Purificación de la Ornitina Transcarbamilasa. de hígado de rata por cromatografía de afinidad.	121
5.3.- Preparación de lisosomas.	124
5.4.- Inmunocitoquímica cuantitativa de proteínas mitocondriales.	128
5.5.- Determinaciones cuantitativas del recambio proteico en hígado de rata.	144
5.6.- Inactivación y proteólisis lisosómica de la Ornitina Transcarbamilasa.	154
5.7.- Estructura proteica y estabilidad intracelular de las proteínas mitocondriales.	179
<b>6.- DISCUSION</b>	<b>202</b>
6.1.- Localización inmunocitoquímica mediante la técnica de los complejos proteína A-oro coloidal.	202
6.2.- Niveles intracelulares de las enzimas mitocondriales.	205
6.3.- Velocidad de recambio de la Ornitina Transcarbamilasa.	207
6.4.- Susceptibilidad de la OTC al sistema proteolítico lisosomal.	212
6.5.- Determinantes moleculares de la velocidad de recambio de las proteínas mitocondriales.	219
<b>7.- CONCLUSIONES.</b>	<b>226</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>228</b>

# **1.- INTRODUCCION**

El principal objetivo de esta Introducción es realizar un compendio de las materias más importantes sobre las que se fundamenta la concepción del trabajo que se presenta, proporcionando un marco adecuado para su mejor comprensión. No obstante, el tema de la degradación de proteínas es extenso y, tanto para cuestiones generales como para una ampliación de otros aspectos del mismo, se deben de consultar previas y excelentes revisiones (30, 39, 55, 62, 67, 95, 116, 197, 198, 199, 205, 229, 258, 259, 263, 264, 398, 422, 437, 439, 504, 523, 525, 526, 534, 536, 575, 590, 609, 610, 611, 679, 680, 701), así como las publicaciones correspondientes a algunos de los últimos simposios celebrados y libros publicados sobre esta cuestión (56, 305-308, 312, 325).

Se comienza por describir el sistema proteolítico estudiado en este trabajo, los lisosomas, destacando su importancia en la proteólisis intracelular. Tras evidenciar la existencia de múltiples rutas degradativas, se resalta el alto grado de regulación de estos procesos, su dependencia energética y se hace referencia a los más importantes sistemas proteolíticos ATP-dependientes. A continuación, se exponen la hipótesis de la plasticidad molecular, las bases teóricas de los procedimientos de medida del recambio proteico y, finalmente, se detalla el conocimiento actual acerca de la enzima objeto de este estudio: la Ornitina Transcarbamilasa.

### 1.1.- EL CONCEPTO DE LISOSOMA.

Hace treinta años todavía se debatía acerca del grado de aplicabilidad que tenía el concepto de lisosoma. Hoy en día ya no existe ese problema y el lisosoma se considera presente, en una u otra forma, como una característica constante de todas las células eucariotas, no sólo animales sino también del reino vegetal. No obstante, las células postcarióticas (reticulocitos, eritrocitos, etc.) carecen de lisosomas, así como las bacterias. Sin embargo, estas últimas poseen una maquinaria degradativa cuyas hidrolasas se encuentran en su mayoría concentradas en la membrana plasmática y que, evolutivamente, podría ser la precursora de los lisosomas en las células de mamíferos.

El concepto de lisosoma se basa esencialmente en dos criterios bioquímicos: 1) la asociación de una gran variedad de hidrolasas ácidas, es decir con un valor de pH ácido para el óptimo de su actividad, dentro de un determinado y especial grupo de partículas citoplasmáticas que fueron identificadas y caracterizadas en virtud de sus propiedades centrífugas; 2) el compartir una propiedad llamada latencia, estrechamente vinculada a la estructura del lisosoma, y que permite definirlo como una partícula en forma de "saco" y rodeada por una membrana lipoproteica. Las membranas lisosomales presentan una composición similar a la de la membrana plasmática, salvo que en aquéllas el contenido en colesterol es más alto (alrededor del 20 % de los lípidos totales), y que entre sus fosfolípidos, la esfingomiélin alcanza hasta el 30 % (640). Por su cara interna, las membranas lisosomales tienen una gran cantidad de compuestos asociados, de los que un alto

porcentaje son residuos hidrolíticos como aminoácidos libres, ácido siálico, etc. (118). Especialmente importante es el contenido en azúcares de dicha membrana, en comparación con otras membranas como las mitocondriales (326).

Al contrario de lo que ocurre con otros orgánulos intracelulares, los lisosomas no pueden ser identificados por los criterios morfológicos al uso, como pueden ser el tamaño, la forma y la estructura interna, debido a la enorme variabilidad que presentan en estas características, dando origen a un polimorfismo que constituye en sí mismo su principal señal de identidad. Tanto es así que, cuando se observan al microscopio electrónico cuerpos rodeados de membrana y conteniendo depósitos densos, vesículas membranosas o cualquier otro material de confusa apariencia, se sabe que muy probablemente lo que estamos mirando es un lisosoma.

Precisamente, debido a la elevada heterogeneidad morfológica de esta subestructura celular, se han generado una gran cantidad de términos descriptivos de la misma. No obstante, la terminología más difundida para la clasificación de los lisosomas y otras estructuras relacionadas es la siguiente (390):

- Lisosoma primario: orgánulo, en general, de tamaño pequeño (unos 50 a 100 nm.) que contiene enzimas hidrolíticas que todavía no han participado en ningún proceso degradativo. Morfológicamente aparecen al microscopio electrónico con una matriz uniforme y más o menos densa a los electrones.
- Vacuolas, fagosomas o vacuolas fagocíticas: orgánulos sin enzimas hidrolíticas (pre-lisosomas) pero que contienen material de origen extracelular (vacuola endocítica, heterofágica o heterofagosoma) o intracelular (vacuola autofágica o autofagosoma). La vacuola heterofágica o endocítica puede ser a su vez: fagocítica si contiene material de apariencia sólida, o pinocítica si incluye material líquido que le confiere el aspecto de estar vacía.
- Lisosoma secundario: Proviene de la fusión de una vacuola con un lisosoma primario, por lo que poseerá en su interior enzimas hidrolíticas junto con material fagocitado en diferentes estados de degradación. Al microscopio electrónico se presenta como un orgánulo con una matriz más o menos clara y conteniendo diversas estructuras. Pueden dividirse en : heterolisosomas (si la fusión se realiza con una vacuola heterofágica) o autolisosomas (si la vacuola con la que se fusionan los lisosomas primarios es autofágica). A su vez, se denomina también ambilisosoma a un lisosoma secundario que contiene tanto material de origen extracelular como intracelular. Cuando el

material fagocitado se acumula en forma de depósitos que ya no pueden ser degradados en los lisosomas, se originan los llamados cuerpos residuales.

De acuerdo con estos términos, se definen diversas funciones en las que se ven implicados estos orgánulos. La incorporación de material al interior de los lisosomas o vacuolas se denomina fagocitosis. Si lo que se incorpora tiene un origen intracelular se denomina autofagocitosis, que a su vez comprende:

- a) **Autofagia:** incorporación de orgánulos o estructuras celulares identificables por microscopía electrónica, tales como membranas, mitocondrias, etc.
- b) **Crinofagia:** cuando son englobadas, o fusionadas con lisosomas, vesículas de secreción (que contienen material cuyo destino era extracelular).
- c) **Microautofagia:** incorporación de material intracelular de naturaleza molecular y, en general, no visible a microscopía electrónica, al menos mediante las técnicas convencionales.

Cuando la incorporación es de material de origen extracelular, el proceso se denomina heterofagocitosis o endocitosis, que a su vez puede ser de dos clases:

- **Endocitosis mediada por receptores:** se produce cuando determinadas macromoléculas interaccionan con receptores situados en la membrana plasmática. Dicha interacción genera vesículas en un proceso mediado por la polimerización de una proteína llamada clatrina.
- **Endocitosis de fase fluida:** se produce cuando las moléculas externas son internalizadas según su concentración extracelular, sin la selectividad que aportan los receptores.

en ambos casos, la vesícula resultante puede interaccionar posteriormente con un lisosoma.

Las estructuras lisosomales pueden intervenir también en procesos de eliminación del material fagocitado al exterior celular. Este tipo de proceso se denomina exocitosis y se puede considerar como un caso especial de secreción.

Nada más confirmarse que el lisosoma era portador de hidrolasas ácidas, y cuando tan sólo empezaba a sospecharse su función digestiva, ya se dedujo que su interior debería poseer un pH ácido. Desde entonces han aparecido en la literatura numerosos intentos de determinar el pH

intralisosomal, tanto *in vivo* como *in vitro*. El método mejor conocido ha sido desarrollado por Poole y Ohkuma (482). Se basa en la dependencia que con respecto al pH manifiesta el espectro de fluorescencia de la fluoresceína. Dicha sustancia se introduce en el lisosoma en asociación con partículas de dextrano, que hacen el papel de transportadores al ser fácil y rápidamente endocitadas. En lisosomas de macrófagos de peritoneo de ratón, se ha encontrado un valor de pH de 4,7, valor muy próximo al pH óptimo de proteólisis *in vitro* que presentan muchos extractos lisosomales.

El mecanismo a través del cual se mantiene la acidez intralisosomal también ha sido objeto de grandes controversias entre los partidarios de la teoría de que se debía meramente a un simple equilibrio Donnan, y los defensores de una bomba protónica dirigida por ATP. Hoy en día se acepta de una forma clara y general que, independientemente de la posible contribución de cargas negativas fijas al mantenimiento del medio ácido, los lisosomas están dotados de una auténtica bomba protónica dirigida por ATP (481, 578).

## 1.2.- LISOSOMAS Y DEGRADACION INTRACELULAR DE PROTEINAS.

La posible participación de los lisosomas en la proteólisis intracelular se ha considerado durante largo tiempo, ya que estos contienen todo un conjunto de proteasas capaces de hidrolizar proteínas exógenas que hayan sido endocitadas. Además, también se han encontrado procesos autofágicos de constituyentes celulares en diversas condiciones fisiológicas o patológicas. Sin embargo, no quedaba claro si los lisosomas, aparte del papel que parecía desempeñar la autofagocitosis en el proceso de eliminación de componentes citoplasmáticos dañados, tendrían alguna función a lo largo del permanente y continuo proceso de recambio de las proteínas intracelulares.

Las evidencias de la participación de los lisosomas en el recambio proteico, provienen fundamentalmente de observar: a) la relación que existe entre las alteraciones estructurales del sistema lisosómico y los niveles de proteólisis intracelular, y b) los efectos que producen los inhibidores de la función lisosomal sobre la degradación intracelular de proteínas. La descripción del primer punto, se debe a los experimentos que Mortimore et al. realizaron con hígado de rata perfundido. Inicialmente, observaron que la velocidad de proteólisis aumentaba notablemente cuando se perfundía el hígado, y que este aumento se suprimía con la adición de insulina al medio de perfusión (437). Una inhibición similar de la proteólisis también se conseguía añadiendo al medio diversas mezclas de aminoácidos (691). Además, la adición al medio de perfusión de glucagón, también aceleraba la proteólisis (692), aunque el efecto de esta hormona parece deberse a la bajada que produce en los niveles intracelulares de aminoácidos. Como ni la insulina ni los aminoácidos tienen influencia sobre la velocidad de síntesis proteica, parece concluirse que en el

hígado la regulación del metabolismo de las proteínas se ejercía, mayoritariamente, en el paso de su degradación. Además, todos estos efectos reguladores de la degradación proteica no son específicos del hígado, sino que ocurren en muchos tipos celulares (259, 437) y probablemente representan un mecanismo general regulador de este proceso por nutrientes, hormonas específicas o factores de crecimiento.

La demostración de que este aumento de la degradación de proteínas, inducida por alguna carencia o privación, se debía a un incremento de la autofagia lisosomal se debe, como hemos dicho, a Mortimore et al., así como a estudios mediante inhibidores llevados a cabo por otros investigadores, tal y como se describe a continuación.

Los experimentos iniciales que indicaban que la autofagia lisosomal podía jugar un papel en la degradación de las proteínas, fueron observaciones en los cambios de la sensibilidad osmótica de los lisosomas obtenidos de hígados perfundidos bajo condiciones que afectaban a la proteólisis. Cuando los lisosomas se preparaban a partir de hígado perfundido con medio sin suplementar (el cual aumenta la degradación de proteínas), su sensibilidad a la lisis en una solución de sacarosa hipotónica se incrementaba notablemente. Este efecto se eliminaba por adición de insulina, aminoácidos o cicloheximida. De estudios anteriores se conocía que las vacuolas autofágicas son más sensibles a choques osmóticos que los lisosomas primarios (129) y, por tanto, se concluyó que los cambios osmóticos observados reflejaban el aumento en el número de elementos autofágicos.

Una característica muy llamativa de estos cambios lisosomales era la rápida transición entre un estado y el otro: cuando se añadía insulina o aminoácidos, tras un tratamiento previo del hígado con medio sin suplementar, las alteraciones osmóticas eran rápidamente reversibles, con un tiempo medio alrededor de ocho minutos (460). Por tanto, y aceptando que la insulina y los aminoácidos evitan la formación de vacuolas autofágicas bajo condiciones de deprivación, estas vacuolas se encuentran en un estado de rápida formación y regresión. Efectos similares de la insulina sobre la latencia lisosomal se han encontrado en experiencias con corazón perfundido (519).

Experimentos posteriores han confirmado que las conclusiones que acabamos de ver eran correctas, puesto que se ha demostrado que la densidad de flotación de los lisosomas se incrementa por perfusión bajo condiciones de carencia nutricional (459). De nuevo, esta alteración física se correlaciona con las velocidades de proteólisis, ya que es eliminada por la adición de insulina y aminoácidos. Este incremento en la densidad de los lisosomas refleja un incremento de autofagia, que conduce a una captura de elementos más densos, provenientes del citoplasma, tales como el glucógeno. Así, la eliminación de glucosa del medio de perfusión, que reduce el contenido en glucógeno de las células hepáticas, también causa una reducción en el desplazamiento a densidades más altas de los elementos lisosomales (583).



Estas interpretaciones son corroboradas por un examen morfológico directo del tejido hepático, una vez ha sido sometido a algún tratamiento que afecta a la degradación de proteínas. En micrográficas obtenidas con el microscopio electrónico, y procedentes de muestras de tejido perfundido con medio sin suplementar, se encuentra la aparición de numerosos elementos lisosomales que han aumentado de tamaño, o sea de vacuolas autofágicas, en contraposición con los cuerpos densos que se observan en el hígado no sometido a tratamiento alguno. De nuevo este efecto desaparece por completo cuando durante la perfusión se suplementa el medio con aminoácidos (440).

Paralelamente a los estudios que acabamos de describir, y que correlacionan alteraciones físicas y morfológicas con velocidades de proteólisis, Mortimore et al. utilizaron otra aproximación al problema de la degradación de proteínas que habían sido incorporadas a los lisosomas cuando estos se encuentran en la célula intacta, realizando posteriormente un aislamiento e incubación *in vitro* de tales lisosomas. Así, se encontró una buena correlación entre las velocidades relativas de liberación de aminoácidos a partir de homogeneizados de hígado perfundido en diversas condiciones, y las velocidades de proteólisis en hígado intacto, pero que había sufrido el mismo tratamiento (438). La proteólisis sólo era patente en incubaciones de homogeneizado total y no en los sobrenadantes libres de partículas. La fracción particulada responsable de la liberación de material soluble en ácido tricloroacético ( $\text{Cl}_3\text{AcOH}$ ), a partir de proteínas endógenas marcadas radiactiva y previamente, fue identificada como la fracción lisosomal.

Además, no se producía liberación de material  $\text{Cl}_3\text{AcOH}$ -soluble, cuando se incubaban lisosomas sin marcar y citosol marcado con aminoácidos radiactivos, mientras que al contrario sí que se observaba dicho aumento, lo que indicaba que las proteínas substrato eran las que previamente a la homogeneización ya se encontraban en el interior del lisosoma (441). De aquí se deduce que la cantidad de proteólisis endógena que presentan los lisosomas aislados e incubados *in vitro*, refleja el tamaño del "pool" o acervo de proteínas que van a ser degradadas por vía lisosómica en el tejido original. Más aún, las correlaciones observadas entre proteólisis en hígado intacto y en homogeneizados, indican que hay una correspondencia entre los niveles de proteína contenidos en lisosomas y las diferentes situaciones fisiológicas. Trabajos posteriores, en los que se utilizan fracciones lisosomales de mayor pureza, encuentran que más del 90 % de la degradación de proteínas de vida media larga y más del 80 % de la degradación de proteínas de vida media corta se produce, en hígado de rata y en condiciones basales, en los lisosomas (3).

### 1.3.- DETERMINACIONES CUANTITATIVAS DE LAS VELOCIDADES DE PROTEOLISIS LISOSOMICA.

Los estudios anteriores relacionan directamente la autofagia lisosomal con el aumento de proteolisis que se observa bajo condiciones de carencia nutricional, y demuestran que el proceso está regulado por aminoácidos y hormonas. Sin embargo, todavía queda por aclarar si la proteolisis lisosómica es responsable en todo, o sólo en parte, de los fenómenos observados anteriormente.

Para solucionar este problema, se necesita realizar una estimación cuantitativa de la proteolisis lisosómica y compararla con las velocidades absolutas de proteolisis en hígado perfundido. Sólo se puede calcular la velocidad de proteolisis lisosómica si se conocen, por un lado la velocidad de recambio de las vacuolas autofágicas, y por otro la cantidad de proteína atrapada en el interior de éstas. Se ha calculado la velocidad de recambio de las vacuolas autofágicas a partir de su velocidad de regresión cuando, bajo condiciones de deprivación nutricional, se añaden aminoácidos e insulina. Utilizando el método de la sensibilidad osmótica se ha estimado, tal y como ya hemos mencionado, que su vida media es aproximadamente de ocho minutos, y este valor ha sido confirmado mediante observaciones cuantitativas al microscopio electrónico (584). A partir de estos datos se puede calcular la constante de velocidad para el proceso de recambio del material contenido en las vacuolas autofágicas, siempre y cuando se postule que su regresión va acompañada de una digestión total del material atrapado.

Para cuantificar la cantidad de proteína contenida en los lisosomas se han utilizado varios métodos. Se puede realizar una estimación directa, suponiendo que se separen bien los lisosomas de las mitocondrias, y tomar el incremento en el contenido de proteína de los lisosomas aislados como una medida del incremento de la cantidad de proteína que va a ser digerida por vía lisosómica. La velocidad de proteolisis lisosomal se calcula multiplicando ese depósito de proteína por la constante de velocidad del proceso de recambio de las vacuolas autofágicas. La velocidad que así se obtiene, se encuentra muy próxima al incremento en la velocidad de proteolisis que se observa cuando se perfunde hígado intacto con un medio carente de aminoácidos (437, 670).

Otro método usado por Mortimore et al., se basa en el análisis de micrográficas obtenidas en el microscopio electrónico para realizar una estimación de carácter estereológico acerca de la fracción del volumen celular ocupado por las vacuolas lisosómicas. Asumiendo que la concentración de proteína contenida en las vacuolas es similar al contenido medio de proteína hepática, la cantidad de proteína lisosomal puede ser calculada y, a partir de ésta, las velocidades de degradación lisosómica. De nuevo, los valores calculados coinciden de forma cuantitativa con las velocidades totales de degradación proteica a lo largo de un determinado rango de concentración de aminoácidos (437, 584).

Un tercer método partió de información previamente obtenida, y que indicaba que las proteínas atrapadas en los lisosomas cuando éstos se encuentran en la célula intacta, pueden ser degradadas cuando estos lisosomas se aíslan e incuban *in vitro*. Si mediante una prolongada incubación se permite que todas las proteínas endógenas sean degradadas, y si la proteólisis se detiene debido a que se han consumido los substratos endógenos del lisosoma, se puede realizar un cálculo directo de la existencia intralisosomal de proteínas que van a ser degradadas. Mediante este método se obtuvieron valores para la velocidad absoluta de proteólisis lisosómica que concordaban con las velocidades de proteólisis total bajo diversos tratamientos, tales como perfusión con medio sin suplementar o con glucagón, aminoácidos o insulina (437, 442).

Todos los experimentos anteriormente descritos, dan una abrumadora evidencia de que, bajo condiciones de privación, toda la degradación intracelular de las proteínas se lleva a cabo por autofagia lisosómica. Además, y teniendo en cuenta que también se encuentra un depósito intralisosomal de proteínas que van a ser degradadas, incluso en condiciones basales, también se concluyó que los lisosomas están implicados en la degradación proteica bajo condiciones de estado estacionario (3). Correlaciones similares entre el nivel de proteólisis y el incremento en volumen de la fracción lisosomal, también se han encontrado en células cultivadas en ausencia de suero y/o en fase confluyente (115, 329). Asimismo, se han descrito diversas evidencias de la participación de los lisosomas en la degradación intracelular de proteínas, en otros tipos celulares (55, 131, 196, 400).

#### 1.4.- EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DEL SISTEMA LISOSOMAL.

Juntamente con los datos que acabamos de describir y las correlaciones que entre ellos existen, han aparecido en la literatura numerosos artículos que demuestran que, en células animales, los agentes que inhiben de forma específica la proteólisis lisosomal, también inhiben el aumento de proteólisis inducido por privación.

En primer lugar cabe citar a Poole et al., quienes demostraron que la cloroquina inhibía parcialmente la degradación de proteínas en fibroblastos cultivados (682). Este compuesto inhibe, entre otras, la actividad de la Cathepsina B lisosomal. Además, e incluso mucho más importante, hay que considerar que la cloroquina es un ejemplo de los llamados "agentes lisosomotrópicos". Estos son, generalmente, bases débiles que se acumulan en el interior del lisosoma incrementando, por tanto, el pH intralisosomal. Se supone que dentro del lisosoma la base queda protonada, y que esta forma no puede difundir a través de las membranas lisosomales. De hecho, la cloroquina se concentra alrededor de unas mil veces en el interior del lisosoma, y medidas directas del pH intralisosomal en macrófagos mostraron un marcado incremento tras una exposición a la

cloroquina. Este aumento (hasta alrededor de pH 6,5) sería suficiente para evitar una gran parte de la acción de las proteasas ácidas lisosomales. Asimismo, Poole et al. demostraron que la cloroquina inhibe principalmente la proteólisis acelerada por la ausencia de suero, y que su efecto es mucho menor sobre la proteólisis basal en presencia de suero. No obstante, la cloroquina también produce una inhibición importante de la degradación por lisosomas rotos (3), por lo que no está totalmente claro su mecanismo de acción. En este sentido, la ausencia de material no degradado en los lisosomas de células tratadas con aminos, al contrario de lo observado en células tratadas con leupeptina, puede indicar que la proteólisis intralisosomal no es un paso limitante en la degradación durante la inhibición por aminos (339). Otra posibilidad es que la inhibición por aminos se deba a una reducción en la velocidad de fusión de lisosomas y autofagosomas o en el proceso de microautofagia, ya que se ha observado que estas aminos inhiben funciones celulares tales como la pinocitosis, la fusión de endosomas y lisosomas y la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática (590).

Dado que el efecto de la cloroquina y otras aminos no es aditivo al de otros inhibidores lisosomales, se suele asumir que la inhibición que aquellas causan sobre la degradación lisosomal es casi completa. Así, se han tomado como referencia para decidir si un inhibidor de la degradación proteica actúa o no sobre el sistema lisosomal. El primero en utilizar un inhibidor específico de una proteasa lisosomal fue Dean (112), al estudiar la participación de los lisosomas en la degradación intracelular de proteínas. En sus experimentos utilizaba el pentapéptido pepstatina, que es el inhibidor reversible más poderoso que se conoce de la Catepsina D. Sin embargo, este compuesto no es capaz de penetrar a través de las membranas celulares y, por tanto, fue necesario introducirlo en el interior de liposomas multilamelares, los cuales al ser endocitados entran en el lisosoma. La adición de liposomas conteniendo pepstatina a hígado de rata perfundido, inhibió la proteólisis alrededor de un 50 %. Esto no sólo indicaba que los lisosomas participaban en la degradación intracelular de proteínas, sino que la Catepsina D juega un papel principal en este proceso, ya que se piensa que la pepstatina no inhibe a ninguna otra proteasa lisosomal del hígado de rata, excepto a la Catepsina D. Por otra parte, el hígado perfundido se encuentra en un estado de recambio proteico acelerado (a no ser que se le suplemente con insulina y altas concentraciones de aminoácidos), y por consiguiente no se puede concluir de estos estudios cuál es el tipo de proteólisis que se ve afectado por la pepstatina.

Knowles y Ballard (332) demostraron que la leupeptina y la antipafina inhibían la degradación de proteínas normales, pero no de las anormales que contenían canavanina, en células de hepatoma de Reuber. Libby y Goldberg (363) describieron la inhibición de la proteólisis a cargo de la leupeptina en el músculo cardíaco y en el esquelético, lo cual coincide con las observaciones de Stracher et al. (403, 615) de que la leupeptina, la antipafina y la pepstatina retrasan la degeneración del músculo distrófico.

Otros trabajos (461), han demostrado que la leupeptina, la antipafina y la quimostatina inhiben la degradación de proteínas de vida media larga en hepatocitos cultivados, pero no la de proteínas de vida media corta o proteínas anormales conteniendo análogos de aminoácidos; efectos bastante similares también han sido descritos por otros investigadores (196, 216, 268). Estudios más completos demuestran que la degradación de proteínas de vida media corta es insensible a los inhibidores lisosomales, excepto en hepatocitos, linfocitos, mastocitos y miocitos, cuya característica común es la de ser células no proliferantes. Se ha comprobado que la inhibición de la degradación de proteínas de vida media larga depende, especialmente, de las características de crecimiento de las células. Así, en células en crecimiento exponencial la degradación es insensible a los inhibidores lisosomales, mientras que la parada del crecimiento provoca un incremento en la velocidad de degradación, que es sensible a dichos inhibidores (259, 401). Por el contrario, en hepatocitos, miocitos, linfocitos, mastocitos, hígado y corazón perfundidos y músculo incubados *in vitro*, la carencia de nutrientes u hormonas también produce un aumento de la tasa degradativa aunque, al contrario que en células cultivadas y en crecimiento exponencial, el efecto de los inhibidores del sistema lisosomal sobre la degradación acelerada es del mismo orden que el producido sobre la degradación basal (259, 400). Por tanto, la eficacia de los inhibidores lisosomales depende, al menos, de tres factores: a) el tipo de proteínas bajo estudio; b) la estirpe celular, y c) las características del crecimiento de las células.

Ya que muchos de estos inhibidores, de carácter peptídico, pueden inhibir otras proteasas intracelulares, además de las lisosómicas (con excepción de la pepstatina que aparentemente solo inhibe a la Catepsina D), no se pueden obtener interpretaciones sencillas de los resultados alcanzados mediante su uso; más bien, incluso sugieren la existencia de múltiples rutas intracelulares de degradación.

### **1.5.- LA MULTIPLICIDAD DE RUTAS EN LA DEGRADACION PROTEICA INTRACELULAR.**

El hecho de que puedan operar distintos mecanismos en la proteólisis intracelular ha sido señalado por diversos autores. En primer lugar se deben de definir las diversas clases de proteínas celulares con distintas características de degradación:

- A) Proteínas de vida media larga ( $t_{1/2} > 24$  horas), que constituyen la masa principal de las proteínas de la célula y que presentan una velocidad de recambio relativamente lenta. Su degradación se puede estudiar a través de una exposición bastante prolongada ( $> 1$  día) de las células a un aminoácido marcado (lo que es suficiente para marcar

muchas de las proteínas celulares), seguida de un período de "caza" con el mismo aminoácido sin marcar, que permita la ruptura de las proteínas que se degradan en forma rápida y que evite la reutilización de las moléculas de aminoácido que contienen el isótopo radiactivo.

- B) Proteínas de vida media corta ( $t_{1/2} = 1-24$  horas), que forman una clase de proteínas celulares normales bastante limitada pero de una velocidad de recambio alta. Esta población proteica puede ser marcada, preferentemente, por un pulso muy corto ( $< 1$  hora) de un precursor radiactivo.
- C) Proteínas de vida media excepcionalmente corta ( $t_{1/2} < 1$  hora), que corresponde al recambio de las proteínas recién sintetizadas (nacientes) que todavía se encuentran en un estado "metaestable" y que son degradadas antes de alcanzar su estabilización mediante: modificaciones covalentes postraduccionales, ensamblaje de subunidades, incorporación a un orgánulo u otra estructura celular, etc. Las proteínas anormales, producidas por tratamientos con análogos de aminoácidos o con puromicina, o mediante mutaciones específicas, también se incluyen dentro de este grupo.

Esta clasificación es enteramente arbitraria y solo persigue fines operativos, siendo una forma útil de evidenciar la existencia de la multiplicidad en las rutas degradativas.

Muchos de los datos de que disponemos indican que la degradación de la gran parte de las proteínas de vida media corta o de las anormales no tiene una naturaleza lisosómica. La degradación de estos grupos apenas se ve influenciada por carencias nutricionales, hormonas, inhibidores de la síntesis proteica o inhibidores de proteasas lisosomales (115, 259, 437), al contrario de lo que ocurre con la degradación de las proteínas de vida media larga. Una reducción de la temperatura afecta en mayor grado a la degradación de las proteínas de vida media corta o las que contienen análogos de aminoácidos, indicando claramente que hay una desigualdad en la energía de activación de los pasos limitantes de velocidad en cada uno de estos procesos.

En relación con la degradación de proteínas de vida media larga, se puede distinguir entre dos estados: basal (o totalmente suplementado de nutrientes, insulina o factores de crecimiento), y acelerado (bajo condiciones de carencia nutricional). Mientras que no existe prácticamente duda de que casi toda la proteólisis acelerada en células de mamífero se lleva a cabo por medio del sistema lisosomal, hay resultados contradictorios con respecto a la participación de la ruta lisosómica en la degradación basal de las proteínas de vida media larga. Existe una fuerte evidencia que indica que, en condiciones basales, la proteólisis no se ve afectada por agentes inhibidores del sistema lisosómico. Como ya dijimos anteriormente, la cloroquina y diversos agentes lisosomotrópicos

inhiben en mucha mayor extensión la proteólisis acelerada (en ausencia de suero) que la proteólisis basal (en presencia de suero, aminoácidos y hormonas) en cultivos de fibroblastos de embrión de rata.

Se han estudiado los efectos de la cloroquina sobre la degradación de proteínas exógenas endocitadas y de proteínas endógenas celulares, en cultivos de macrófagos de peritoneo de ratón, y bajo condiciones de estado estacionario, es decir, basales. Dado que el macrófago es capaz de endocitar una gran variedad de proteínas, fue posible comparar la degradación de las endógenas y las exógenas en un mismo sistema celular. Se encontró que la cloroquina inhibe la degradación de proteínas exógenas en mucha mayor extensión que la de las endógenas. Esta diferencia persistía aún cuando la fuente de proteínas exógenas fueran proteínas de macrófago marcadas mediante un precursor radiactivo, lo que permitía estudiar y comparar la hidrólisis de poblaciones proteicas similares. La conclusión que se obtuvo fue que la degradación de las proteínas endocitadas o la de los constituyentes celulares, en condiciones de carencia de nutrientes, tiene lugar en compartimientos celulares diferentes de los que participan en la degradación intracelular de proteínas durante el proceso normal de recambio. No obstante, los mismos autores advierten de la posibilidad de que se trate de diferentes poblaciones de lisosomas (506).

Amenta et al. (10) encontraron que inhibidores de los microtúbulos, tales como la vinblastina, vincristina o colchicina, inhiben la proteólisis acelerada en cultivos de fibroblastos de embrión de rata incubados en medio exento de suero, pero no la degradación basal que tiene lugar con el medio completo. Estos compuestos eran conocidos por inhibir la función del sistema lisosómico-vacuolar y por detener la digestión de proteínas exógenas.

Tanto en hepatocitos como en fibroblastos de rata cultivados, el amonio inhibe la proteólisis acelerada pero no la basal (115, 259). El amonio es un potente inhibidor de la proteólisis actuando como agente lisosomotrópico, y puede ser usado para distinguir entre la ruta degradativa lisosómica y la no lisosómica en hepatocitos aislados. Estos presentan un marcado estado de recambio proteico y, por tanto, una gran proporción de la degradación que experimentan se asemeja a la que induce la carencia de nutrientes. El cloruro amónico es capaz de inhibir entre el 50 y el 90 % de la degradación de las proteínas de vida media larga en hepatocitos cultivados (115). Otros agentes lisosomotrópicos tales como la cloroquina, la metilamina, así como un gran número de otras aminas, inhiben la proteólisis en una cantidad semejante, pero no son capaces de eliminar por completo la degradación residual que permanece tras el tratamiento con amonio (216, 259). El hecho de que la leupeptina y la antipafina inhiban la proteólisis de los componentes que resisten la inhibición por amonio, en mucha menor cuantía de lo que lo hacen con la fracción de los componentes sensibles al mismo (216), se ha considerado como una evidencia de las rutas no lisosómicas de la degradación basal de proteínas.

En contraposición con los anteriores resultados, Dean (114) encontró que la proteólisis en macrófagos cultivados se inhibe por pepstatina en la misma cuantía tanto en presencia como en ausencia de suero. Análogamente, en hígado y corazón perfundidos, la adición conjunta de leupeptina y pepstatina inhibe la proteólisis acelerada por carencia de nutrientes y la basal en un grado similar (259), mientras que en hepatocitos cultivados, la leupeptina y la quimostatina también inhiben la proteólisis en magnitud semejante, tanto en presencia como en ausencia de suero (461). Por tanto, y como de aquí se desprende, el sistema lisosómico parece directamente implicado en ambos tipos de degradación.

Es muy difícil explicar, de forma satisfactoria, estas observaciones aparentemente contradictorias y obtenidas en distintos sistemas experimentales. Gran parte de la evidencia que se tiene acerca de la resistencia de la degradación basal a los inhibidores de las proteasas lisosomales se ha obtenido a partir de células cultivadas en crecimiento, condiciones en las que la ausencia de suero va acompañada de una parada de la multiplicación celular. Por tanto, es posible que la proporción de la ruta lisosómica sea mayor en tejidos que no presenten crecimiento, tales como el hígado o el músculo. Por otra parte, la definición de lo que se entiende por estado basal se realiza, de forma principal, empíricamente y depende de las condiciones empleadas en cada trabajo en particular.

La principal dificultad conceptual para aceptar que toda la proteólisis basal se lleva a cabo a través de una ruta lisosómica, estriba en cómo explicar la manifiesta heterogeneidad que presentan las velocidades de recambio de diferentes proteínas bajo condiciones de estado estacionario (198, 199, 575). A pesar de que se han postulado mecanismos en los que se produce una adsorción selectiva de proteínas a la membrana lisosomal, no existe más evidencia en favor de esta teoría que la correlación encontrada entre hidrofobicidad y vida media de las proteínas (64, 113, 589). Por el contrario, cuando la proteólisis se acelera debido a un severo ayuno o diabetes, tienden a desaparecer las correlaciones normales que se encuentran entre vidas medias y tamaño de subunidad o punto isoeléctrico de las proteínas (259). La explicación más simple de estos resultados consistiría en que el incremento de autofagia lisosomal asociado con estos estados es, esencialmente, no selectivo. Sin embargo, el mecanismo lisosómico parece más específico de lo que se le había considerado inicialmente. Así, en células cultivadas, la degradación lisosomal (medida en ausencia de suero y, por tanto, sensible a los inhibidores lisosomales) muestra una selectividad hacia las proteínas que poseen regiones KFERQ expuestas (ver apartado 1.6.2.1.). Además, la proteólisis asociada a la fracción lisosomal del hígado de rata, no sólo representa una fracción muy importante de la actividad proteolítica total, sino que muestra diferentes velocidades de degradación para los diversos grupos de proteínas (3). Otros datos que indican la presencia de distintas rutas de degradación a través del sistema lisosómico son: a) la existencia de dos procedimientos distintos de

captura de proteínas (ver apartado 1.1) cuya regulación por aminoácidos, hormonas, etc., es diferente (215, 439); b) el que en hepatocitos, donde la degradación proteica transcurre mayoritariamente a través de la vía lisosomal, la degradación de proteínas de  $t_{1/2}$  larga frente a las de  $t_{1/2}$  corta se vea inhibida en mayor grado por aminoácidos, hormonas, y otros inhibidores de la autofagia (590); c) el que en células cultivadas y en fase confluyente, la privación de suero no aumente la degradación de todas las proteínas que se recambian por mecanismos lisosómicos en condiciones basales (37); d) el que en células cultivadas, sean aditivos los aumentos de proteólisis debidos a la carencia de suero y a la confluencia de las células y, además, vayan acompañados de un incremento de tipos diferentes de lisosomas en cada caso (259, 329).

Por otra parte, varias evidencias apoyan la existencia de mecanismos no lisosomales de degradación intracelular de proteínas:

- El efecto parcial que, en muchas situaciones, presentan los inhibidores lisosomales sobre la degradación de proteínas (259, 400, 652)
- La identificación y caracterización de proteasas no lisosomales (ver apartados 1.6. a 1.11.)
- La existencia de mecanismos de degradación intracelular de proteínas en organismos procariotas y postcariotas (que también carecen de lisosomas) similares a los de los organismos eucariotas.

Por tanto, y a pesar de ciertas incertidumbres, la impresión general que resulta de contrastar todos los estudios, apunta claramente hacia la existencia de una multiplicidad de rutas degradativas intracelulares.

## **1.6.- REGULACION DEL PROCESO DE DEGRADACION DE PROTEINAS.**

La degradación intracelular de proteínas tiene una serie de características, ampliamente conocidas y descritas en la bibliografía, que son:

- Es un proceso general (tiene lugar en todas las células y está relacionado, directa o indirectamente, con otros muchos procesos celulares).
- Es un proceso selectivo (como lo demuestra la heterogeneidad en las vidas medias de las proteínas intracelulares).

- Es un proceso constante (está siempre activo y todas las proteínas tienen una cierta probabilidad de ser degradadas en un momento dado).
- Es un proceso completo (el producto final son los aminoácidos constituyentes de la proteína degradada).
- Tiene lugar al azar (la caída de radiactividad de una proteína marcada tras la administración de un aminoácido marcado, sigue una cinética de primer orden).
- Está controlado metabólicamente (las velocidades de degradación proteica se ven afectadas por drogas, hormonas, estados nutricionales, etc.).
- Requiere energía (esta característica la comentaremos más ampliamente en los apartados 1.7.- 1.11.).

Por todo ello, resulta evidente que el estudio de la regulación de un proceso tan complejo y trascendental para la célula, presenta un interés especial. No obstante, y a pesar del gran esfuerzo que se está realizando en este campo, que está viendo cómo surge una ingente cantidad de artículos, publicaciones e importantes descubrimientos, todavía estamos lejos de comprender la regulación de la proteólisis intracelular. Un concepto clásico al hablar de dicha regulación, es el aceptar que puede tener lugar a dos niveles:

- a) A nivel del sistema proteolítico, o sea de las proteasas. Esto constituiría el denominado nivel general de la degradación, ya que gran parte de las proteasas son inespecíficas, por lo que afectaría de la misma manera a la población total de las proteínas celulares.
- b) A nivel de la proteína sustrato. Esto supondría un nivel específico de regulación, dependiente de las propiedades intrínsecas de dichas proteínas sustrato y de los factores de su entorno molecular que puedan provocar cambios en tales propiedades. Este tipo de regulación serviría para explicar las diferentes vidas medias observadas en las distintas proteínas.

Pues bien, este tipo de clasificación se ha quedado hoy en día como un modelo excesivamente simplista y esquemático de lo que en la realidad ocurre y, así, todo lo que se puede hacer por el momento es una enumeración de los posibles factores que según los últimos resultados parecen estar implicados en la regulación de la proteólisis intracelular (para encontrar las citas bibliográficas originales, consultar la referencia 62):

- Cantidad y actividad de las proteasas y de sus inhibidores.
- Compartimentación.
- Modificaciones de las proteínas substrato.
- Niveles de aminoácidos libres.
- Insulina (la principal hormona que inhibe la proteólisis) y el glucagón (la principal hormona que estimula la proteólisis), pues ambas actúan sobre los niveles celulares de aminoácidos libres.
- Glucocorticoides.
- Tiroxina.
- Factores de crecimiento.
- Prostaglandinas.
- Interleukina 1.
- Iones calcio.
- Aminoacilación del tRNA.
- Requerimientos de ATP en reacciones de: unión covalente de la ubiquitina, fosforilación, glicosilación, proteólisis sensible a vanadato, represión de inhibidores, aumento de la susceptibilidad de la proteína substrato, mantenimiento del pH intralisosomal, incorporación de proteínas a los lisosomas, e incluso otros mecanismos para los que todavía no está claro cuán importante puede resultar el aporte de energía, tales como la síntesis de elementos del citoesqueleto o de receptores, la circulación intracelular, etc.

No obstante, esta separación en dos niveles de la regulación de los mecanismos de degradación de proteínas intracelulares es útil, pues permite hacer una exposición más didáctica de la cantidad de datos de que se dispone, tal y como se expone a continuación:

### 1.6.1.- REGULACIÓN A NIVEL DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO.

Para comprender cómo se puede modular o regular la actividad de los sistemas proteolíticos, describiremos en primer lugar las características de uno de sus principales componentes, es decir, de las enzimas que desempeñan el papel central en la degradación de proteínas, y que se conocen bajo la denominación de proteasas. El término proteasa es sinónimo de péptido hidrolasa o peptidasa, y se incluye en estos términos a todas las enzimas capaces de romper enlaces peptídicos. Este tipo de modificación irreversible tiene una gran trascendencia para la célula. Las proteasas permiten eliminar polipéptidos erróneos o producidos en exceso, y controlan así los niveles enzimáticos, desempeñan funciones nutritivas al crear nuevos acervos de aminoácidos y mantienen una constante renovación de los componentes celulares, lo que facilita a la célula su adaptación a las modificaciones ambientales. Aún más, las proteasas juegan un papel clave en procesos celulares tales como (67): reorganización del citoesqueleto, fusión de mioblastos, formación de moléculas reconocibles inmunológicamente, modelación morfogénica, coagulación sanguínea y posterior disolución del coágulo, fertilización, ovulación, reacciones del complemento, interacciones celulares, diferenciación celular, mecanismos de la memoria, síntesis proteica, metabolismo hormonal, crecimiento y envejecimiento celular, degradación de material endocitado y necrosis celular y tisular. Además, las proteasas participan también en determinados procesos patológicos, tales como: enfisema, invasión tumoral, artritis, distrofia muscular, diabetes, esclerosis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, etc.

Las proteasas se clasifican según las normas de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, bajo la nomenclatura EC 3.4., y se pueden agrupar de diversas formas, según sean los criterios escogidos. De forma general, se subdividen en:

- Exopeptidasas: aquellas que rompen enlaces peptídicos situados en los extremos N-terminal (aminopeptidasas) o C-terminal (carboxipeptidasas).
- Endopeptidasas: aquellas que cortan enlaces peptídicos internos a la molécula de la proteína sustrato. También se denominan proteinasas.

Las proteasas también pueden clasificarse, según su función en: a) aquellas que crean moléculas biológicamente activas; y b) las que destruyen péptidos y proteínas.

Todas las proteasas son intracelulares en algún estadio de su existencia. Algunas son sintetizadas claramente para ser exportadas a los espacios extracelulares (proteasas de secreción), y ejercen su acción biológica fuera de las células. Hay muchos ejemplos de proteasas extracelulares, desde las pequeñas y bien caracterizadas proteasas pancreáticas (tripsina y quimotripsina), a las

mayores y más complejas proteasas plasmáticas de la coagulación sanguínea y sistema del complemento. Otras proteasas de secreción permanecen un mayor espacio de tiempo en las células tras ser sintetizadas, generalmente almacenadas en gránulos, antes de ser secretadas al medio extracelular; ejemplos de estas proteasas son la quimasa y triptasa de los mastocitos (67).

Sin embargo, las proteasas sobre las que vamos a centrarnos en esta Introducción, y que tienen relación directa con el presente trabajo, son aquellas que son propiamente intracelulares, es decir, las que ejercen su acción dentro de las células, independientemente de que puedan actuar sobre proteínas o péptidos extracelulares. En concreto, nos referiremos a endopeptidasas o proteinasas, las cuales se clasifican (ver Tabla 1), según los residuos catalíticos esenciales presentes en su centro activo, en:

- Serínproteasas (EC 3.4.21.): tienen un residuo de serina en su centro activo y durante su mecanismo de catálisis se forma un enlace covalente del sustrato a dicho residuo. Constituye el grupo más estudiado, no necesitan cofactores - a excepción de algunas formas maduras que necesitan  $\text{Ca}^{2+}$ , pero sólo para estabilizar su estructura - y suelen tener una extensión N-terminal que debe ser procesada proteolíticamente para su activación, lo que podría suponer un posible mecanismo de su regulación. Se clasifican actualmente en dos familias: la de la quimotripsina y la de la subtilisina. Esta última sólo se ha encontrado en bacterias (ver proteasas La y Clp en el apartado 1.10.), sin embargo, la superfamilia de la quimotripsina está más extendida, aunque la mayoría actúan extracelularmente, siendo muy pocas las que ejercen su acción a nivel intracelular.
- Cisteínproteasas (EC 3.4.22.), antiguamente denominadas tiolproteasas: tienen un residuo de cisteína en su centro activo, que está implicado en la formación de un complejo covalente de carácter transitorio entre la proteasa y el sustrato. En su mayor parte son intracelulares, localizándose normalmente en el citosol o en lisosomas, y se supone que ciertos metabolitos y determinados estados fisiológicos u hormonales pudieran jugar un papel en su regulación (43, 67). Hay varias superfamilias, de las cuales la más importante es la de la Papaína, a la que pertenecen las Calpaínas y las Catepsinas lisosomales B, H, L y S.
- Aspárticoproteasas (EC 3.4.23.), antiguamente denominadas proteasas ácidas o carboxiproteasas: tienen dos residuos de ácido aspártico en su centro activo. Sólo se han encontrado en organismos eucariotas y presentan una estructura bilobular - posiblemente como resultado de una duplicación génica - en lámina  $\beta$ , con una concavidad donde se aloja el centro activo. Preferentemente, cortan los enlaces

**TABLA 1.- CLASIFICACION DE LAS PROTEASAS SEGUN SU MECANISMO DE ACCION.**

Clase de proteasa	Residuos en el centro activo	Inhibidores	
Serínproteasas	Asp · Ser · His	Diisopropil fluorofosfato	Clorometilcetonas: TosLysCH <sub>2</sub> Cl <sup>a</sup> TosPheCH <sub>2</sub> Cl
Cisteínproteasas	Cys · His · Asp	Agentes que reaccionan con grupos -SH: pHMB Agentes alquilantes: Yodoacetato Yodoacetamida N-etil maleimida E64	PheMeSO <sub>2</sub> F Benzamidina 3,4-dicloroisocumarina Quimostatina Leupeptina Antipaína Elastatinal
Aspárticoproteasas	Asp · Asp	Pepstatina Derivados de diazoacetil: diazoacetil nor-Leu metil ester diazoacetil L-Phe metil ester	
Metaloproteasas	Zn · Glu · Tyr Zn · Glu · His	EDTA 1, 10-fenantrolina Fosforamidón	

<sup>a</sup> Abreviaturas: E64, L-trans-epoxisuccinil leucilamida(4-guanidino)butano; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; PheMeSO<sub>2</sub>F, fluoruro de fenilmetanosulfonilo; pHMB, p-hidroximercuribenzoato; TosLysCH<sub>2</sub>Cl, N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona; TosPheCH<sub>2</sub>Cl, L-1-tosilamido-2-feniletilclorometil cetona.

peptídicos flanqueados por residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Sólo hay una superfamilia, dentro de la cual se encuentran las Catepsinas D y E.

- Metaloproteasas (EC 3.4.24.): Contienen iones metálicos (generalmente  $Zn^{2+}$ ) en su centro activo. El papel de los iones metálicos parece ser el de estabilizar a la proteasa en el caso del  $Ca^{2+}$ , o el de volver más lábil al enlace peptídico en el caso del  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . A este grupo pertenecen la termolisina y la colagenasa, pero aquí resultan más interesantes aquellas que procesan los precursores de las proteínas mitocondriales (491) y las que intervienen en el transporte desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi (617).
- Proteasas no clasificadas (EC 3.4.99.): Aquellas cuyo mecanismo de catálisis se desconoce o que claramente no encajan en ninguna de las otras categorías y que se asignan temporalmente a este grupo.

Esta gran diversidad de tipos de proteasas también se extiende a su rango de tamaños, que van desde 20 a 1.000 kDa. Esto equivale a decir que muchas proteasas son bastante más grandes que la mayoría de las proteínas celulares. Esto hecho puede tener su explicación en que, de esta forma, las proteasas poseen múltiples subunidades y dominios, lo que podría ser crítico para la selectividad y regulación de la proteólisis intracelular.

Todas estas proteasas desarrollan su acción a través de los dos mecanismos proteolíticos principales, el lisosómico y el no lisosómico que, como ya hemos visto en el apartado anterior, comprenden a su vez diversos sistemas degradativos. De entre éstos, los más importantes se pueden clasificar en función del tipo de proteasas que actúan en ellos, dando lugar a sistemas en los que participan:

- Proteasas lisosomales: se agrupan bajo la denominación común de Catepsinas, palabra que deriva de un término griego que significa "digerir". Se presentan en casi todos los tipos celulares y, aunque hay una gran heterogeneidad en el contenido de estas enzimas en los lisosomas de las diferentes estirpes celulares (118, 390), sus propiedades son muy similares. Se han descrito 17 Catepsinas distintas (desde la Catepsina A a la N y luego las Catepsinas R, S y T) (62, 67): 10 de ellas pertenecen al grupo de cisteínproteinasas (B, H, I, J, K, L, M, N, S y T), 2 son aspárticoproteinasas (D y E), dos son serínproteinasas (G y R), 2 exopeptidasas (A y C) y la Catepsina F que no ha sido clasificada todavía. Su tamaño varía desde 25 a 650 kDa, aunque la mayoría son enzimas de peso molecular entre 25 y 42 kDa. Muchas de estas proteasas lisosomales son glicoproteínas, sin embargo, su característica principal es que el pH óptimo para su actividad enzimática es ácido. Su especificidad de sustrato *in vitro*

varía según la proteasa. Así, la Catepsina L es la más activa sobre substratos proteicos nativos, mientras que la Catepsina D presenta mayor actividad contra proteínas desnaturalizadas (67).

- Proteasas dependientes de ubiquitina y ATP (se tratarán en el apartado 1.9.).
- Proteasas dependientes de ATP (se tratarán en los apartados 1.10. y 1.11.).
- Calpaínas o proteasas neutras activadas por calcio, cuya activación se produce por la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares. Existen dos especies moleculares diferentes, las Calpaínas I y II, que se activan por bajas (en el rango  $\mu\text{M}$ ) o por altas (en el rango  $\text{mM}$ ) concentraciones de calcio, respectivamente. Ambas isoformas de esta proteinasa son heterodímeros compuestos de dos subunidades, una de 75 kDa y otra de 25-30 kDa. Las subunidades mayores corresponden a productos de distintos genes, mientras que la subunidad pequeña es igual para ambas dentro de un mismo organismo. La subunidad mayor contiene el centro activo y cuatro sitios de unión de calcio similares a los de la Calmodulina, mientras que la subunidad menor posee también otros cuatro lugares de unión para calcio y una " cola " amino-terminal que parece ser la responsable de la asociación de la proteinasa con membranas. No parecen presentar una actividad proteolítica general, sino que más bien realizan una ruptura limitada de sus substratos, lo que provoca respuestas fisiológicas específicas. Las funciones que se les atribuyen (259, 504, 672) son: 1) degradación de proteínas citoesqueléticas y, por tanto, participación en la determinación de la morfología y locomoción celular, y movimiento intracelular de orgánulos; 2) degradación limitada de factores de crecimiento, receptores de membrana, o proteínas asociadas a las mismas; 3) modificación de la Proteína Kinasa C; 4) proteólisis limitada de proteínas solubles, lo que conduciría a la amplificación de estímulos externos o internos; 5) parecen intervenir también en la mitosis, colaborando en la desorganización del huso mitótico o en la eliminación de una proteína que detiene a los oocitos fecundados en meiosis.
- Proteasas señal y de procesamiento: esta clase de proteinasas catalizan la proteólisis limitada de proteínas sintetizadas en forma de precursores, denominados pre- o proproteínas, de mayor tamaño que las correspondientes proteínas maduras biológicamente activas en las cuales son convertidas (463). Este procesado proteolítico constituye un mecanismo postranslacional, rápido e irreversible, de regulación fisiológica .

- Otros sistemas proteolíticos: una gran cantidad de procesos metabólicos incluyen en alguno de sus pasos reacciones proteolíticas. Así, se han descrito proteasas en diversas estructuras celulares (mitocondrias, cloroplastos, gránulos, membrana plasmática, etc.) (ver apartado 2. y las referencias 67, 312, 689), en bacterias o codificadas por virus (341).

A partir de todos los datos que acabamos de exponer, se deduce que dada la incidencia de los procesos proteolíticos sobre la mayoría de las funciones celulares y la gran diversidad de proteasas existentes, la actividad proteolítica debe de estar muy regulada con objeto de evitar un caos degradativo incontrolado. A continuación, vamos a tratar los principales y más generales puntos de control de la actividad de las proteasas:

#### A) Localización celular y compartimentación de proteasas.

La acción de una proteasa puede estar regulada, o más bien limitada, por su localización intracelular. Así, la asociación de proteasas a membranas implica una pérdida de su grado de libertad que tiene dos efectos reguladores importantes: 1) limitar su accesibilidad a los sustratos, y 2) aumentar la concentración local de sustratos específicos que vayan a interactuar con componentes de la membrana, tales como receptores. En el caso de las proteasas señal o de procesamiento, que se encuentran estratégicamente localizadas en membranas o gránulos de secreción, su posición les permite tener acceso sólo a determinadas proteínas y en conformaciones muy específicas. No obstante, los lisosomas constituyen el caso más importante de regulación por compartimentación. La localización en el interior del lisosoma de las proteasas lisosomales, les proporciona un entorno ácido que favorece su actividad y contribuye a su estabilidad, al mismo tiempo que restringe su acción sólo a aquellas proteínas que hayan seguido un proceso de incorporación. Este, como ya vimos en los primeros capítulos de esta Introducción, está a su vez altamente regulado, puesto que la velocidad y especificidad de dicha incorporación varía en respuesta a alteraciones fisiológicas y patológicas.

#### B) Heterogeneidad en los contenidos celulares de las proteinasas.

Muchas proteinasas presentan una especificidad tisular, por lo que su expresión según los diferentes tipos celulares constituye un importante factor de regulación. Así, mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha confirmado que las concentraciones y actividades de las proteasas lisosómicas varían según el tejido e incluso dentro del mismo. Un ejemplo lo constituye el hígado, en el que junto con los hepatocitos coexisten células sinusoidales, como las células de Kupffer, que presentan un mayor

desarrollo del sistema lisosomal en comparación con aquellos. Además, dentro de los hepatocitos también se produce una variación del aparato lisosomal a lo largo del sinusoides hepático, presentando un mayor desarrollo de vacuolas autofágicas y una mayor actividad proteolítica los hepatocitos perivenosos que los periportales (651, 655).

#### C) Inhibidores y activadores de proteasas.

La presencia de inhibidores de proteasas de naturaleza peptídica, es una característica constante en todas las células y es de esperar que las variaciones de su concentración afecten a la actividad proteolítica (360). Se han descrito tres familias de inhibidores de proteasas lisosomales:

- Familia de la estefina: intracelulares, de pequeño tamaño (11 kDa) y carecen de puentes disulfuro.
- Familia de la cistatina: también intracelulares y de bajo peso molecular (13 kDa), pero contienen dos puentes disulfuro.
- Familia del kininógeno: proteínas extracelulares y con una mayor complejidad - contienen nueve puentes disulfuro - y variabilidad - su peso molecular oscila entre 50 y 120 kDa.

Para las proteasas no lisosomales, el caso más estudiado y conocido es el de las Calpaínas. Para estas proteinasas, se han descrito unos inhibidores específicos denominados calpastatinas, presentes en tejidos de mamíferos y aves, así como un activador aislado de cerebro. Este polipéptido produce una estimulación de la actividad de las Calpaínas de hasta 25 veces, pero no altera la sensibilidad al calcio de ninguna de las formas de la proteinasa.

#### D) Metabolitos de bajo peso molecular.

Las concentraciones intracelulares de iones y compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tales como ATP, aminoácidos, ácidos grasos, etc., pueden regular la actividad de determinadas proteasas. Ejemplos de este tipo de regulación se citan a lo largo de toda esta Introducción.

### E) Hormonas.

Son muchos los estudios que han demostrado un efecto hormonal sobre la actividad proteolítica del sistema lisosomal. Sin embargo, es posible que los efectos observados sean indirectos, ya que las hormonas regulan otros procesos metabólicos. Las hormonas mejor estudiadas en lo referente a su acción sobre la degradación intracelular de proteínas son:

- El glucagón: promueve la formación de vacuolas autofágicas y, por tanto, la proteólisis lisosomal.
- La insulina: sus efectos son opuestos a los del glucagón.
- Otras hormonas: las prostaglandinas  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  estimulan la proteólisis en músculo esquelético y cardíaco. También se ha observado en músculo una estimulación de la proteólisis por elevados niveles de tiroxina y glucocorticoides.

### 1.6.2.- REGULACIÓN A NIVEL DE LAS PROTEÍNAS SUBSTRATO.

Actualmente se conocen las velocidades de recambio de más de 100 proteínas celulares y los valores de vida media determinados varían en un intervalo muy amplio, que llega a presentar diferencias de hasta 1000 veces (ver Tabla 2). Estos datos plantean la cuestión siguiente: ¿Qué factor(es) determina(n) la vida media de una proteína?. Desde tiempo atrás se conoce que las proteínas cuya conformación se ha visto alterada por desnaturalización, mutación, incorporación de análogos de aminoácidos o terminación prematura de cadena, son rápidamente degradadas. Todos estos cambios alteran alguna o varias de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las proteínas, estructuras que son las que diferencian también a las proteínas individuales que poseen muy diferentes vidas medias. Todo esto ha conducido a pensar que, tal vez sean las propiedades intrínsecas de las proteínas substrato las que determinen su velocidad de recambio, en cooperación con una regulación más general a nivel del sistema proteolítico. Estas propiedades se pueden agrupar en dos principales categorías: aquellas que vienen determinadas por la propia estructura de la proteína, o las que son adquiridas con posterioridad debido a diversas modificaciones postraduccionales.

TABLA 2.- VELOCIDADES DE RECAMBIO DE LAS PROTEÍNAS CELULARES.

Vida media <sup>a</sup> $t_{1/2}$ (horas)	Localización intracelular			
	Núcleo	Citosol	Mitocondria, lisosoma y peroxisoma	Retículo endoplásmico y membrana plasmática
< 2	EIA <sup>b</sup> , fos, myc, myb, hsp70, p53, pNH120, RNAP I	hsp70, MT(Au), P730, PK-C, ODC, TAT, s-AMD	δ-ALAS	HMG-CoA-R
2 - 8	pNH32, pNH37, pNH39	cAMP-PK, cGMP-PK, TO, PEPC	PEPCK	α-2-M-R, Gjpml, g- GT, LIMP I
9 - 40	Ub, RNAP II	CAM, GK, MT (Cd), Ub, GluPD, DHO	AcCoAC, AIAT, CAT, UROX, GDH	AcR((ej), EGF-R, EH, LDL-R, LIMP II, Tf-R, GIT, LIMP III, PhMrf, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa, P450, P450 Red, Gjprl, IR
41 - 200	H1, HMG1, HMG2, pNH90	AAT, ACT, ADH, ADK, ALD, ARG, CAB, CAT, CIS, DHF, GAPD, LDH, Mb, MYO, PAR, PLA, PPA, P670, SOD, Vm, LIG, FU	β-GLUCmr, β-GAL, PC, GCBasa, OAT, ATPasa, δ-ALAD, Cyt c, CPS I, Cyt Ox, MDH, MAO, GPD, Cyt b5	Cyt b5 Red, Cyt b5, Glyp160, Glyp120, Glyp105, Glyp60, DPP IV, Cyt c Red
> 200	H2A, H2B, H3, H4	HEM, GP, PGK, PMIt	FU, β-GLUrt, OTC	AcR(j), NAD-GH

<sup>a</sup> Las referencias de las vidas medias de todas las proteínas de la Tabla 1 se pueden encontrar en las citas bibliográficas: 62, 198, 199, 222, 224, 370, 526, 544, 673.

<sup>b</sup> Abreviaturas: α-2-M-R receptor de la α-2-macroglobulina; AAT Aspartato Aminotransferasa; AcCoAC Acetil CoA carboxilasa; AcR(ej) receptor de acetilcolina (extrínseco); AcR(j) receptor de acetilcolina (sináptico); ACT Actina; ADH Alcohol Deshidrogenasa; ADK Adenilato Kinasa; AIAT Alanina Aminotransferasa; ALD Aldolasa; ARG Arginasa; ATPasa Adenosina Trifosfatasa; β-GAL β-Galactosidasa; β-GLUCmr β-Glucuronidasa de macrófago de ratón; β-GLUCrt β-Glucuronidasa de hígado de rata; CAB Anhidrasa Carbónica B; CAM Calmodulina; cAMP-PK cAMP Proteína Kinasa; CAT Catalasa; cGMP-PK cGMP Proteína Kinasa; CIS Citrato Sintetasa; CPS I Carbamil Fosfato Sintetasa I; Cyt Ox Citocromo Oxidasa; Cyt b5 Citocromo b5; Cyt b5 Red Citocromo b5 Reductasa; Cyt c Citocromo c; Cyt c Red Citocromo c Reductasa; δ-ALAD δ-Aminolevulinato Deshidratasa; δ-ALAS δ-Aminolevulinato Sintetasa; DHF Dihidrofolato Reductasa; DHO Dihidroacetasa; DPP IV Dipeptidil Dipeptidasa; EIA proteína temprana del adenovirus; EGF-R receptor del factor de crecimiento epidérmico; EH Epóxido Hidrolasa; FU Fumarasa; GAPD Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa; GCBasa Glucocerebrosidasa; GDH Ghatamato Deshidrogenasa; GIT Ghatido-Insulina Transhidrogenasa; GK Glucocinasa; GluPD Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa; Glyp 60, 105, 120, 160 parte proteica de la Glicoproteína de 60, 105, 120, 160 kDa; GP Glucógeno Fosforilasa; GPD Glicerofosfato Deshidrogenasa; γ-GT γ-Glutamil Transferasa; H1, H2A, H2B, H3, H4 Histonas; HEM Hemoglobina; HMG 1,2 Grupo de proteínas de alta movilidad; HMG-CoA-R Hidroximetilglutaril-CoA Reductasa; hsp70 proteína 70 de impacto térmico; IR receptor de Insulina; LDH Lactato Deshidrogenasa; LDL-R receptor de lipoproteínas de baja densidad; LIG Ligandina; LIMP proteína integral de la membrana lisosómica; MAO Monoamino Oxidasa; Mb Mioglobina; MDH Malato Deshidrogenasa; MT Metalotioneína; myc, fos, myb oncogenes; MYO Mioisina; NAD-GH NAD-Glicohidrolasa; OAT Ornitina Aminotransferasa; ODC Ornitina Descarboxilasa; OTC Ornitina Transcarbamilasa; P450 Citocromo P450; P450 Red P450 Reductasa; p53 proteína nuclear de 53 kDa; P670, P730 Fitocromo (estados espectrales 670 y 730); PAR Parvalbúmina; PC Piruvato Carboxilasa; PEPC Fosfoenol Piruvato Carboxilasa; PEPCK Fosfoenol Piruvato Carboxilasa; PGK Fosfoglicerato Kinasa; PhMrf receptor de Fosfomancosil en fibroblastos; PK-C Proteína Kinasa C; PLA Fosfolipasa A; PMIt Proteasa Multicatalítica; pNH 32, 37, 39, 90, 120 Proteína no-Histona de 32, 37, 39, 90, 120 kDa; PPA Fosforilasa A; RNAP I y II RNA Polimerasas I y II; s-AMD S-Adenosilmetionina Descarboxilasa; SOD Superóxido Dismutasa; TAT Tirixina Aminotransferasa; Tf-R receptor de Transferina; TO Triptófano Oxigenasa; Ub Ubiquitina; UROX Urato Oxidasa; Vm Vimentina.



### 1.6.2.1.- Características estructurales de las proteínas sustrato.

Se ha realizado una gran cantidad de estudios que intentan correlacionar la vida media y las características estructurales de una proteína. Hoy en día sigue sin conocerse qué parámetros estructurales determinan la velocidad de degradación, pero no es probable, a la vista de los resultados encontrados y que veremos a continuación, que se puedan asignar a una sola propiedad fisicoquímica.

La carga y el tamaño se encuentran entre las primeras propiedades estudiadas. Se encontró que las proteínas citosólicas de hígado de rata de mayor peso molecular o con mayor número de residuos de aminoácidos ácidos, es decir, de cargas negativas, se recambiaban más rápidamente (135, 199, 675). Posteriores estudios con proteínas mitocondriales (222, 468, 496), o mediante experimentos de microinyección de proteínas en células cultivadas (545, 551), no han confirmado estas hipótesis.

Las proteínas de vida media corta suelen presentar mayor número de residuos hidrofóbicos expuestos al medio (64, 65) y muestran mayor afinidad por superficies hidrofóbicas y membranas (113, 589). También se ha comprobado que las proteínas de vida media más corta *in vivo*, son más susceptibles al ataque proteolítico *in vitro* (55, 199), así como más sensibles a agentes desnaturizantes, tales como temperatura alta o pHs ácidos (55).

Sin embargo, todas estas correlaciones no llevan a la conclusión de que cada uno de estos factores sea por separado un determinante de la velocidad de degradación, sino que la interdependencia que existe entre ellos no permite discernir o escoger a ninguno como responsable directo o primario. Veamos algunos ejemplos: las proteínas citosólicas de alto peso molecular de hígado de rata son más ácidas que las de bajo peso molecular; la susceptibilidad proteolítica es una propiedad que se presenta en mucho mayor grado en las proteínas de alto peso molecular que en las de pequeño tamaño; existe una correlación entre la termolabilidad de una proteína y su susceptibilidad al ataque proteolítico, lo que junto con el hecho de que los sitios más flexibles de una proteína suelen ser los más vulnerables, parece indicar que las correlaciones entre vida media y estabilidad termodinámica son ciertas; en apoyo de esta hipótesis, se conoce que la hidrofobicidad está relacionada con la facilidad con que una proteína se puede desplegar y, además, se ha encontrado una buena correlación entre la hidrofobicidad de una proteína y su susceptibilidad a la desnaturización por fuerzas mecánicas provocadas por agitación (550); sin embargo, los cambios observados en la hidrofobicidad de una proteína no siempre se han podido relacionar directamente con un incremento en su susceptibilidad proteolítica (82).

En relación con la estructura secundaria de las proteínas, no se han encontrado correlaciones entre vida media y proporción de hélices  $\alpha$  o el enrollamiento al azar (550), pero sí que parece existir entre la proporción de conformación en lámina  $\beta$  y la vida media de algunas proteínas (550). Por otra parte, experimentos de microinyección de proteínas cuyas secuencias y estructuras eran conocidas, no han encontrado correlación alguna entre la vida media de dichas proteínas y una serie de características de las mismas, tales como: peso molecular, punto isoeléctrico, hidrofobicidad, estabilidad térmica, proporciones de conformación en hélice  $\alpha$  o lámina  $\beta$ , etc. (545, 551). Ahora bien, en este tipo de experimentos las proteínas no se sitúan en el entorno y localización celular que realmente poseen, y el número de las que se ensayan es muy limitado en comparación con el conjunto de las proteínas celulares. No obstante, estos resultados, junto con las numerosas excepciones a las reglas anteriores, indican que no existe suficiente soporte experimental que apoye el que las propiedades globales de la estructura de las proteínas determinen su estabilidad intracelular.

Mayor interés han despertado las correlaciones encontradas más recientemente entre vidas medias y la estructura primaria de una proteína, o más concretamente, con determinadas secuencias de aminoácidos. El hecho de que las proteínas puedan llevar en su secuencia la información necesaria para determinar su velocidad de recambio o su mecanismo de degradación, es una idea que venía apoyada por una serie de datos ya conocidos desde hace tiempo, como son:

- La propia secuencia de aminoácidos es la responsable de las características globales anteriormente citadas (hidrofobicidad, punto isoeléctrico, etc.). Además, cuando se ve alterada dicha secuencia por incorporación de análogos de aminoácidos o por una terminación prematura, la velocidad de degradación también se ve modificada.
- Los diferentes grupos de proteasas hidrolizan preferentemente cierto tipo de enlaces o de secuencias de aminoácidos.
- Los estudios sobre secreción de proteínas y biogénesis mitocondrial, han demostrado claramente que determinadas partes de la cadena polipeptídica contienen la información suficiente para dirigir a una proteína a su compartimiento celular correcto (469, 658).

Se han postulado tres reglas relacionadas con la secuencia de aminoácidos y que parecen determinar la degradación intracelular de las proteínas (131):

A) El aminoácido del extremo N-terminal.

Como veremos en el apartado 1.9., las proteínas que no tienen bloqueado el aminoácido N-terminal, se conjugan más eficientemente a la ubiquitina, lo que en un

principio se pensaba que era determinante para la degradación de dicha proteína mediante la ruta dependiente de ubiquitina. Sin embargo, estudios posteriores llevados a cabo por Bachmair et al. (34, 35, 208) han demostrado que, tal y como se pensaba, el aminoácido N-terminal de una proteína resulta de importancia para su reconocimiento por algún componente del sistema degradativo dependiente de ubiquitina, pero no necesariamente a causa de que ésta se una al extremo N-terminal. Bachmair et al., utilizando técnicas de ingeniería genética, construyeron fusiones entre la ubiquitina de levadura y la  $\beta$ -Galactosidasa de *E. coli*, variando cada vez, mediante mutagénesis dirigida, el aminoácido en el punto de unión. En todos los casos, excepto para la prolina, la ubiquitina era rápidamente liberada, dejando  $\beta$ -Galactosidasas intactas, pero con diferentes aminoácidos N-terminales. Se comprobó que la vida media de estas  $\beta$ -Galactosidasas variaba según el aminoácido N-terminal, dando origen a dos grupos:

- Aminoácidos estabilizadores (alanina, cisteína, glicina, metionina, serina, treonina y valina), los que iban aparejados con aquellas proteínas que presentaban una vida media larga ( $t_{1/2} > 20$  horas).
- Aminoácidos desestabilizadores (arginina, asparragina, aspártico, fenilalanina, glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, tirosina y triptófano), aquellos que daban lugar a proteínas de vida media corta ( $t_{1/2} = 2-30$  minutos).

Se concluyó que sólo el residuo aminoterminal era el responsable de la vida media de la  $\beta$ -Galactosidasa, pues aquellas construcciones cuyo extremo N-terminal era metionina-arginina eran estables, mientras que arginina-metionina eran rápidamente degradadas. También resulta interesante destacar que sólo las  $\beta$ -Galactosidasas que presentan residuos N-terminales desestabilizadores, son degradadas por una ruta dependiente de ubiquitina. La diferencia principal entre ambos grupos de aminoácidos reside en el tamaño de las cadenas laterales: la mayoría de los residuos estabilizadores son pequeños, mientras que los desestabilizadores tienden a ser de gran tamaño.

Estos resultados se han visto apoyados al comparar las secuencias de diversas proteínas de eucariotas y procariotas con sus vidas medias, y observar que aquellas proteínas que son intracelulares y de vida media larga poseen aminoácidos N-terminales estabilizadores, mientras que la mayoría de las proteínas de secreción presentan aminoácidos desestabilizadores (34). Estos resultados sugieren nuevos mecanismos por los que se podrían regular las vidas medias de las proteínas:

- Las proteínas serían de vida media larga o corta dependiendo del residuo de aminoácido situado en el extremo N-terminal.
- La degradación de las proteínas de vida media corta portadoras de un aminoácido desestabilizador, se realizaría a través del sistema dependiente de ubiquitina, mientras que para las proteínas de vida media larga, su degradación debería iniciarse mediante la acción de alguna endoproteasa o aminopeptidasa, que produjeran fragmentos o polipéptidos con aminoácidos desestabilizadores en su extremo N-terminal.
- En el caso de aquellas proteínas cuyas vidas medias no se corresponden con sus residuos aminoácidos N-terminales, sería necesaria la modificación postraduccional de las mismas mediante Aminoacil-tRNA Transferasas. Coincidiendo con esta hipótesis, los aminoácidos que se conoce que están implicados en estas reacciones (arginina, fenilalanina, leucina, lisina y tirosina) pertenecen al grupo desestabilizador. Además, también se ha comprobado que el sistema degradativo dependiente de ubiquitina necesita la presencia de aminoacil-tRNA para la degradación de ciertas proteínas, pero no para otras (166). Así, se ha demostrado que sólo las proteínas cuyos extremos N-terminales poseen ácido aspártico o glutámico, necesitan la presencia de aminoacil-tRNA, y que la arginina (y posiblemente también la histidina, ambas pertenecientes al grupo de los aminoácidos desestabilizadores) se adiciona antes de la degradación. Esto parece indicar que el efecto desestabilizador de algunos aminoácidos puede ser indirecto, posibilitando que se produzcan las modificaciones que acabamos de describir.

Sin embargo, también existen abundantes datos experimentales que no parecen concordar con esta " regla del extremo N-terminal ", como se la ha denominado. Por una parte, están las construcciones ubiquitina- $\beta$ -Galactosidasa con prolina en el punto de unión que, pese a que el residuo N-terminal es la metionina de la ubiquitina - pues ya hemos dicho que en esta construcción la ubiquitina no se libera - la vida media resultante es corta ( $t_{1/2} = 7$  minutos). Otra aparente contradicción se refiere al caso de la RNasa A, que presenta una vida media larga a pesar de la lisina de su extremo amino. Además, cuando se oxidan los residuos de metionina internos, la RNasa A se convierte en un sustrato del sistema ubiquitina y es rápidamente degradada (131).

Por otra parte, existen muchas observaciones experimentales (85, 96, 208) que sugieren que el residuo N-terminal no sólo no es la única señal de reconocimiento por

el sistema ubiquitina, sino que probablemente no es la principal. Así, otros resultados han demostrado que la degradación de una proteína por el sistema dependiente de ubiquitina, necesita la unión de cadenas de multiubiquitina a los residuos internos de lisina de dicha proteína sustrato (85). Finalmente, otras regiones de las proteínas también pueden modular la respuesta de los sistemas degradativos. Por ejemplo, la RNasa A desprovista de una región de veinte aminoácidos de su extremo N-terminal y microinyectada en células en cultivo, no es degradada por lisosomas en condiciones de privación de suero, al contrario de lo que sucede con la RNasa A completa (36). Además, se han identificado también secuencias carboxiterminales que podrían determinar la vida media de ciertas proteínas (190).

#### B) Las regiones PEST.

Rogers et al. (546) realizaron un análisis por ordenador de la estructura primaria de 12 proteínas de vida media corta y de 35 proteínas de vida media larga cuya secuencia era conocida. Sus resultados revelaron que las proteínas de vida media corta poseían múltiples secuencias internas ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), que denominaron regiones PEST. Estas suelen estar, aunque no siempre, flanqueadas por residuos de lisina, arginina o histidina. Dado que tanto la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -caseína poseen estas regiones, se marcaron y microinyectaron en células HeLa, observándose que su vida media era corta ( $t_{1/2} = 2-5$  horas) de acuerdo con la hipótesis de las secuencias PEST. Sólo 3 de entre las 35 proteínas de vida media larga, contenían estas regiones, lo que indica que no siempre su presencia confiere a las proteínas una rápida degradación. Además, existen otras cuestiones por aclarar en relación con las regiones PEST. En primer lugar, no parece existir una secuencia consenso o típica pues varían mucho, tanto en longitud (entre 12 y 46 residuos) como en porcentaje de aparición de cada uno de los 4 aminoácidos (P = 4-27 %; E = 5-42 %; S = 4-28 %; T = 0-10 %). Otro aspecto por investigar es el de la ruta de degradación para estas proteínas. Al ser de vida media corta, parecen ser un buen sustrato para el sistema dependiente de ubiquitina, pero entonces faltaría por aclarar si existe alguna conexión entre la regla del aminoácido N-terminal y las secuencias PEST. También se ha sugerido que las regiones PEST pueden ser el sitio de corte de endopeptidasas que reconozcan enlaces donde intervienen prolinas. Finalmente, se ha propuesto que las serinas y treoninas de determinadas secuencias PEST son lugares de fosforilación, que al quedar negativamente cargados pueden atraer iones  $Ca^{2+}$  y activar a las Calpaínas. Estas hidrolizarían dichas regiones liberando péptidos con extremos N-terminales desestabilizadores (pues están flanqueadas por residuos de lisina, arginina o histidina) que serían degradados por el sistema dependiente de ubiquitina. No obstante, todas estas especulaciones no han sido demostradas y, si bien en algún caso,

como el de la Ornitina Descarboxilasa (190, 524), se ha comprobado la importancia de estas secuencias en la degradación intracelular de proteínas, no hay una evidencia experimental (524) de que algún sistema degradativo esté directamente implicado en la degradación de las proteínas que contienen secuencias PEST.

C) Las regiones KFERQ.

Estas regiones son secuencias peptídicas de los aminoácidos lisina (K), fenilalanina (F), ácido glutámico (E), arginina (R) y glutamina (Q), que dirigen a las proteínas hacia los lisosomas para aumentar su velocidad de degradación durante condiciones de carencia nutricional. Estos resultados fueron conseguidos por el grupo de Dice (36, 37, 87, 131, 132, 401) al estudiar la degradación de la RNAsa A microinyectada en fibroblastos humanos cultivados. Estos autores encontraron que la degradación de la RNAsa A aumentaba en ausencia de suero y que la región responsable de dicha degradación era un fragmento aminoterminal de 20 aminoácidos que *per se*, también mostraba una degradación suero-dependiente. Estudios posteriores demostraron que la degradación de la RNAsa A se lleva a cabo en los lisosomas y que de entre los 20 aminoácidos N-terminales, el pentapéptido entre las posiciones 7 y 11, de secuencia KFERQ, era el responsable de dirigir a la RNAsa A a los lisosomas durante la ausencia de suero. Con objeto de conocer si existían regiones similares en otras proteínas intracelulares, estos investigadores obtuvieron anticuerpos contra dicho pentapéptido, que fueron capaces de inmunoprecipitar entre el 25 y el 35 % de las proteínas citosólicas de los fibroblastos. El total de las proteínas citosólicas presentaba una velocidad de recambio tal que su vida media promedio era de 80 horas en presencia de suero y de 32 horas en su ausencia. Sin embargo, la fracción de las proteínas citosólicas inmunoprecipitables presentaba una  $t_{1/2}$  de 80 horas en presencia de suero y de 12 horas durante el primer día de privación de suero, mientras que las proteínas celulares no inmunoreactivas presentaban la misma vida media ( $t_{1/2} = 80$  horas) tanto en presencia como en ausencia de suero. Se han encontrado proteínas inmunoreactivas en varios tejidos de la rata, tales como el hígado, músculo esquelético, riñón, testículos y cerebro. Sólo en los tres primeros se observa una pérdida de dicha población inmunoprecipitable durante el ayuno, concordando estos resultados con la capacidad que tienen dichos tejidos de aumentar la proteólisis durante el ayuno (54, 131).

La secuencia exacta KFERQ sólo se encontraba en la familia de la RNAsa A pancreática, aunque se han encontrado secuencias similares en otras proteínas (ver apartado 5.7. y ref. 132). Un análisis detallado de secuencias similares presentes en las proteínas de comportamiento semejante a la RNAsa A, ha permitido identificar

diversos patrones peptídicos que podrían funcionar análogamente. La primera novedad que presentan es que estos pentapéptidos parecen ser reconocidos en ambas direcciones, y podrían responder a los motivos siguientes:

- a)  $\_F\_RQ$  o  $QR\_F\_$ , donde  $\_ =$  cualquier aminoácido.
- b)  $(+, -, [ ], +/[ ])Q$  o  $Q(+, -, [ ], +/[ ])$ , siendo:  $+$  = aminoácido básico (K, R);  $-$  = aminoácido ácido (D, E);  $[ ]$  = aminoácido hidrofóbico (F, I, V, L,) y  $+/[ ]$  = aminoácido básico o hidrofóbico; y donde el paréntesis indica que el orden no es importante.

El principal punto para aclarar en relación con estas secuencias, es el mecanismo por el cual transcurre esta ruta proteolítica. En este sentido, se ha identificado una proteína citosólica de 73.000 daltons e inducible por choque térmico, que es capaz de unirse a estas regiones y que en ausencia de suero, al modificar su conformación, favorecería la interacción entre los lisosomas y las proteínas con secuencias KFERQ, promoviendo su degradación por macro o microautofagia (88).

#### 1.6.2.2.- Características adquiridas por las proteínas sustrato.

En relación con el control de la proteólisis intracelular, aquellos cambios reversibles o no que experimentan las proteínas sustrato y que alteran sus propiedades o les inducen cambios conformacionales, también pueden jugar un papel importante. Este tipo de modificaciones pueden ser de dos tipos: covalentes y no covalentes. Sobre las modificaciones covalentes (las más importantes se resumen en la Tabla 3), es cada vez mayor la evidencia experimental que indica su trascendencia en la degradación intracelular, actuando como " señales " que marcan a las proteínas para que sean reconocidas por los sistemas proteolíticos. Las modificaciones no covalentes son responsables de muchos de los distintos estados conformacionales de una proteína, por lo que varía su susceptibilidad a la proteólisis (ver apartado 1.12.). Estas modificaciones no covalentes se pueden producir:

- Por la localización intracelular de la proteína.
- Por su interacción con otras macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, polisacáridos, etc.).

**TABLA 3.- MODIFICACIONES COVALENTES QUE AFECTAN A LA DEGRADACION INTRACELULAR DE PROTEINAS.**

Modificación	Proteínas ( procedencia )
1. Fosforilación	Glutamato Deshidrogenasa $\text{NAD}^+$ dependiente ( levadura ) Fructosa 1,6 Bisfosfatasa ( levadura ) Glutaril CoA Reductasa ( hígado ) Piruvato Kinasa ( hígado ), Troponina ( músculo ) Proteínas fosforiladas del citosol ( hígado ) Proteínas de 70 kDa ( fibroblastos )
2. Glicosilación	Glicoproteínas lisosomales ( hígado ) Glicoproteínas citosólicas ( hígado ) Hemoglobina
3. Metilación	Isocitocromo c ( levadura )
4. Acetilación	Histonas ( timo )
5. Carbamilación	Histonas ( timo ), Glutamato Deshidrogenasa ( hígado ) Hemoglobina ( sangre )
6. Arginilación	Proteínas citosólicas ( hígado )
7. Deamidación	Triosa Fosfato Isomerasa ( hígado ) Proteínas de mamífero ( varios tejidos )
8. Oxidación de residuos de aminoácidos:	
a) Formación de disulfuros mixtos	Aldolasa ( músculo ), Tirosina Aminotransferasa ( hígado ) Fosfoenol Piruvato Carboxikinasa/GTP ( hígado ) Glucosa 6-fosfato Deshidrogenasa ( hígado, glándula mamaria ) Ornitina Decarboxilasa ( hígado )
b) Oxidación de residuos metionina	Proteínas de <i>E. coli</i>
c) Oxidación de centros Fe-S	Glutamina Fosforibosil pirofosfato Amidotransferasa ( <i>B. subtilis</i> )

TABLA 3.- ( continuación )

Modificación	Proteínas ( procedencia )
d) Oxidación de función mixta y modificación por radicales libres	Glutamina Sintetasa ( <i>E. coli</i> ), Enolasa ( levadura ) Piruvato Kinasa ( hígado ), Fosfoglicerato Kinasa ( levadura ) Creatina Kinasa ( hígado ), Colágeno, Albúmina ( suero ) Carbamil Fosfato Sintetasa I ( hígado ) Proteínas citosólicas oxidadas ( neutrófilos, eritrocitos ) Proteínas mitocondriales ( reticulocitos ) Ornitina Decarboxilasa ( hígado ) Proteína que une plastoquinona ( vegetales ) Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa ( músculo ) Lisozima ( huevo de pollo ) Otras proteínas de mamíferos ( varios tejidos ) Hemoglobina y otras proteínas de eritrocitos
9. Conjugación con ubiquitina	Proteínas eucarióticas anormales Proteínas de reticulocitos Proteínas con metioninas oxidadas Albúmina de suero bovino Lisozima ( huevo de pollo ) Caseína ( leche )
10. Conjugación con lípidos	
11. Racemización o isomerización de residuos de aspártico, asparagina o prolina	Proteínas del globo ocular o de los dientes ( hombre )  Proteínas de la membrana del eritrocito
12. Formación de bases de Schiff	Lipoproteínas de baja densidad ( sangre ) Ribonucleasa A
13. Conjugación con proteínas	

En la mayor parte de los casos, los efectos producidos por las diferentes modificaciones conducen a un incremento de la susceptibilidad proteolítica de las proteínas sustrato, aunque también hay ejemplos de protección contra la misma. Para más detalles sobre los diferentes efectos, consultar las referencias siguientes: 9, 63, 110, 245, 259, 264, 356, 362, 390, 395, 517, 534, 588, 609, 613.

- Por su interacción con metabolitos con bajo peso molecular (substratos, inhibidores, cofactores, coenzimas, agentes alostéricos, etc.).

En todos estos tipos de interacciones, la degradación se puede ver aumentada o disminuída según el caso. Ejemplos de este tipo de modificaciones no covalentes son muy abundantes en la literatura (198, 199, 217, 222, 264, 542, 608).

### 1.7.- DEPENDENCIA ENERGETICA DE LA PROTEOLISIS INTRACELULAR.

Una característica muy importante de la degradación intracelular de proteínas es su absoluta necesidad de energía metabólica en todos los organismos y sistemas celulares estudiados, ya que en todos ellos la proteólisis se puede reducir o bloquear completamente mediante el uso de inhibidores del metabolismo energético. El primero en descubrir este fenómeno fue Simpson en 1953 (600), quien observó que la liberación de aminoácidos, a partir de proteínas previamente marcadas, en cortes de hígado de rata se reducía o era inhibida en condiciones anaeróbicas o por la adición de inhibidores de la producción de energía celular, tales como el cianuro o el dinitrofenol. Análogamente, Rapoport et al. encontraron que la destrucción de proteínas en reticulocitos quedaba bloqueada por desacopladores o inhibidores de la fosforilación oxidativa (582).

Hallazgos similares, con estos u otros inhibidores, se han realizado con diversas células de mamífero, incluyendo hígado de rata, cortes de riñón, de tiroides, de diafragma, hepatomas de rata, corazón perfundido, fibroblastos de rata así como en *E. coli* y levadura. Asimismo, también se ha encontrado que tanto la degradación de proteínas normales como la de las anormales, o sea aquellas que contienen análogos de aminoácidos, necesita energía. Esta dependencia energética resultó en un principio muy curiosa, en gran parte por lo inesperado del fenómeno mediante razonamientos termodinámicos, ya que la proteólisis, o hidrólisis de los enlaces peptídicos, es *per se* una reacción exotérmica.

La inhibición del metabolismo energético no afecta a la proteólisis dañando irreversiblemente a la célula. Así, cuando a hepatomas que han sido tratados con azida y en un medio carente de nutrientes, se les añade glucosa, de forma que puedan regenerar ATP, la proteólisis vuelve rápidamente a niveles normales. Además, estos efectos no se deben a una necesidad de compuestos energéticos para la síntesis proteica. Así, tanto en células bacterianas como de mamífero, la degradación de polipéptidos aberrantes y de muchas proteínas celulares tiene lugar de forma normal, aun cuando la síntesis de proteínas haya sido bloqueada completamente;

incluso en tales condiciones, los inhibidores del metabolismo energético todavía pueden reducir la proteólisis (199).

No obstante, existen resultados que sugieren que la dependencia energética de la degradación no es consecuencia de una dependencia directa entre la concentración de ATP y la velocidad de hidrólisis. Esto fue demostrado claramente por Poole, al estudiar la proteólisis en cultivos celulares de fibroblastos de rata (507). Poole marcó estas células mediante una variación de la técnica del doble isótopo, de tal forma que pudo observar la degradación de las proteínas de recambio rápido y lento. El ion fluoruro y el iodoacetato inhibían la ruptura de ambas clases de proteínas, pero la magnitud de dicha inhibición no se correlacionaba con el efecto que cada inhibidor ejercía sobre la concentración de ATP. Así, vemos que la fuente de energía para el recambio proteico puede implicar a otros compuestos diferentes del ATP y altamente energéticos. En cualquier caso, este requerimiento energético es difícil de estudiar *in vivo*, ya que cuando se consigue una inhibición de la producción de ATP, otros procesos celulares se ven también afectados en mayor o menor medida. Así, por ejemplo, un descenso del 20 % en los niveles de ATP inhibe la síntesis proteica en un 40 %, mientras que la degradación casi no se ve afectada (223). Habría que bajar los niveles de ATP en un 80 % para obtener un descenso de un 50 % en la tasa de proteólisis, e incluso con un descenso del 90 % en el nivel de ATP aún resta un 20 % de la proteólisis basal (198, 199, 230, 264). Así pues, antes de que se detenga la degradación proteica, los niveles intracelulares de ATP deben verse enormemente reducidos. Por tanto, las reacciones ATP-dependientes que actúan sobre los mecanismos proteolíticos, parecen presentar una relativa alta afinidad para este compuesto. En este sentido, existen datos recientes que apuntan hacia diversas explicaciones de este requerimiento energético:

- Se han identificado procesos proteolíticos ATP-dependientes en los que el ATP no aporta energía, sino que actúa a nivel de sustrato. Una posibilidad sería que el ATP se uniera a la proteína que va a ser degradada, alterara su conformación o su estabilidad y favoreciera su degradación (542). Otra vía de actuación del ATP a nivel del sustrato, consistiría en la fosforilación de determinados residuos de aminoácidos, lo que marcaría a la proteína para su degradación (356).
- La existencia de proteasas ATP-dependientes o activadas por ATP, que trataremos en los apartados 1.9. a 1.11.
- Los requerimientos energéticos para el mantenimiento funcional del lisosoma, que se estudian en el epígrafe siguiente.

## 1.8.- REQUERIMIENTOS ENERGETICOS DE LA PROTEOLISIS LISOSOMICA.

En principio, parece razonable pensar que la ruta de degradación lisosómica también puede necesitar energía celular, bien directa o indirectamente. El trabajo de Mego (409) sugiere que el ATP está implicado de forma específica en el mantenimiento de las funciones normales del lisosoma. Este investigador demostró que, cuando se inyecta por vía intravenosa a ratas albúmina desnaturalizada y yodurada con  $^{131}\text{I}$ , ésta es rápidamente incorporada por vacuolas del hígado, riñón y bazo. Estas partículas, que él denominó fagolisosomas, al ser incubadas *in vitro*, presentaban actividad proteolítica, medida como liberación de [ $^{131}\text{I}$ ] monoyodotirosina. Actividad que era mayor cuando las partículas se incubaban a pH 5, y que se veía reducida cuando la incubación se realizaba a un pH fisiológico (alrededor de 7,3), aunque quedaba de nuevo restaurada al añadir ATP. Otros nucleótidos capaces de presentar también un cierto efecto, aunque pequeño, fueron GTP e ITP.

Mego interpretó estos resultados como la necesidad de mantener un pH ácido en el interior de las partículas, y postuló para ello la intervención del ATP a través de una bomba protónica. También sugirió que la generación de protones durante la hidrólisis de polipéptidos y ésteres fosfóricos o sulfúricos, junto con un mecanismo dependiente de energía que evitase la entrada de iones  $\text{OH}^-$ , podría ser suficiente para mantener la acidez; no obstante, tal sistema no sería capaz de llevar a cabo la hidrólisis de sustancias básicas, tales como las histonas. Mego también estudió la degradación, por cortes hepáticos, de albúmina marcada con  $^{125}\text{I}$ , y demostró que era inhibida por desacopladores e inhibidores de la fosforilación oxidativa, por iones fluoruro y por cloroquina. Por tanto, la necesidad de una fuente de energía en la proteólisis lisosomal a pH alcalino que él observaba *in vitro*, también aparecía en el tejido intacto. La importancia de la cloroquina en estos estudios proviene de que esta sustancia se incorpora en grandes cantidades a partículas de aspecto lisosómico pertenecientes a fibroblastos. Probablemente, se debe a que es una base débil y se acumula en un compartimento ácido. Sin embargo, el gradiente de concentración de cloroquina entre el lisosoma y el resto de la célula solo puede deberse a una continua secreción de protones hacia el interior del lisosoma, para lo cual se requiere una bomba protónica.

Hayashi et al. (250) propusieron un papel para el ATP en la incorporación de proteínas al interior de lisosomas. Estos investigadores estudiaron el efecto del ATP en la actividad proteolítica de lisosomas intactos de hígado de rata sobre hemoglobina y proteínas citoplasmáticas de hígado marcadas radiactivamente. El ATP, particularmente en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , estimulaba la proteólisis en los lisosomas intactos y resuspendidos en sacarosa 0,25 M. Sin embargo, no había activación por ATP cuando se utilizaban lisosomas rotos o sus extractos de polvo de acetona. Además, demostraron que el ATP no estimulaba la liberación de Catepsina D al medio de incubación. A partir de estos resultados concluyeron, que el ATP aumentaba la velocidad de penetración de las proteínas sustrato al interior del lisosoma. Además, después de una incubación de treinta minutos

con proteínas marcadas, la cantidad de radiactividad sedimentada junto con los lisosomas era un 33 % mayor que cuando se añadía ATP y  $Mg^{2+}$  (456).

Todos estos efectos del ATP sólo se observaron a pH 4,5; por tanto, si este efecto se produjera *in vivo*, es bastante sorprendente que no se observase a pH neutro, el pH que prevalece en el exterior del lisosoma.

Un grupo de investigadores holandeses ha discutido y refutado los resultados anteriores (279-281), y ha presentado evidencia experimental que sugiere que, a pH ácido, el ATP estimula de hecho la proteólisis, pero lo hace al facilitar la ruptura del lisosoma. La demostración se llevó a cabo midiendo la liberación de Catepsina D a partir de lisosomas intactos. Esta tenía lugar mucho más rápidamente cuando se añadía ATP a pH 4,48. Muy probablemente, el grupo japonés no pudo probar la liberación de Catepsina D de los lisosomas al añadir ATP, debido al hecho de que, a pHs bajos, algunas enzimas lisosomales son fuertemente adsorbidas a la membrana del lisosoma (254). Así, el aumento aparente de incorporación en presencia de ATP, es el resultado de un incremento en la unión de las proteínas marcadas a los lisosomas rotos. Dean ha demostrado que cuando se incuban lisosomas intactos con proteínas citoplasmáticas en presencia de ATP, y se tiene cuidado en soltar las proteínas unidas a la membrana, no hay ninguna evidencia que indique la incorporación de aquellas, tanto en presencia como en ausencia de ATP (113).

Shelbourne et al. (592, 593) observaron que en el hígado de ratas tratadas con glucagón, la inhibición de la síntesis de proteínas no lleva aparejada la del desarrollo de las vacuolas autofágicas. Por tanto, éstas tienen que provenir de enzimas y membranas lisosomales preexistentes. Además, cuando el glucagón era administrado a ratas que habían sido tratadas con etionina (que atrapa adenina y provoca una caída del 90 % en la concentración de ATP) no se producía autofagocitosis. Todo ello sugiere que hay una dependencia energética en el proceso de formación de vacuolas autofágicas, aunque la naturaleza de este requerimiento de ATP no ha sido aclarada. Shelbourne et al., formularon la hipótesis de que las transformaciones que tienen lugar en la membrana durante la formación de lisosomas secundarios necesitan ATP. Una segunda posibilidad es que el ATP sea preciso para la formación de cAMP, del cual es un precursor, ya que los cambios que provoca el glucagón en lisosomas secundarios transcurren vía cAMP; éste, no obstante, no es el único factor implicado, puesto que se observan cambios en el sistema lisosomal del hígado perfundido, acompañados de un aumento de proteólisis, sin que se vea incrementada la concentración de cAMP (capítulo 3 de la ref. 673). Estas hipótesis vienen apoyadas por el hecho de que los agentes que afectan a los microtúbulos, tales como la colchicina y la vinblastina, afectan la degradación intracelular de proteínas (10, 115, 215, 502), y refuerzan la hipótesis de que el ATP actúe proporcionando energía para la formación de las vacuolas y captura del material por autofagia

### 1.9.- EL SISTEMA PROTEOLITICO ATP-DEPENDIENTE DE LOS RETICULOCITOS.

El reticulocito es una célula altamente especializada, de estructura celular muy simple pues carece de núcleo, de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, y que sintetiza, de forma predominante, una proteína: la hemoglobina.

Rapoport et al. (582), observaron que al incubar reticulocitos en suero fisiológico se producía una masiva liberación de aminoácidos que no tenía lugar en el eritrocito maduro. Esta degradación de las proteínas del reticulocito era, además, dependiente de energía, pues resultaba bloqueada por anaerobiosis o por el 2,4-dinitrofenol.

El sistema proteolítico del reticulocito es extraordinariamente activo en la degradación de cadenas anormales de globina, mientras que la hemoglobina normal es perfectamente estable; por otra parte, cuando se marca el reticulocito con un aminoácido radiactivo, apenas se produce degradación de las proteínas marcadas, a menos que se hayan sintetizado proteínas anormales durante el marcaje. Esto indica que, en condiciones normales, muchas de las proteínas degradadas han sido sintetizadas en una etapa mucho más temprana de la diferenciación de la célula eritroidea.

La función fisiológica de este sistema proteolítico tan activo no se conoce con una certeza absoluta. Puede servir para eliminar moléculas de globina que contengan errores biosintéticos, o cantidades excesivas de alguna especie de globina que no se ensamble para producir hemoglobina (aunque la síntesis de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de globina se encuentra normalmente equilibrada).

Rapoport et al. (445) sugieren que la mayor parte de los polipéptidos endógenos objeto de la degradación son proteínas del estroma (principalmente mitocondriales), y que este tipo de degradación juega un papel en la maduración del reticulocito, que se caracteriza por la desaparición de los ribosomas, las mitocondrias y otras muchas enzimas y proteínas celulares que carecen de función en el eritrocito maduro. Su afirmación se basa en que las velocidades absolutas de proteólisis en reticulocitos incubados - medidas por una técnica que se basa en la dilución isotópica de lisina - concuerdan cuantitativamente con la cantidad de proteína que desaparece de la fracción mitocondrial a lo largo de igual período de incubación. Según estos autores, el paso inicial en la destrucción de la mitocondria es la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial por una Lipoxigenasa específica, lo que conduce a la lisis mitocondrial. La inhibición de la degradación de las proteínas mitocondriales por el ácido salicilhidroxámico, el cual inhibe la Lipoxigenasa, concuerda con la anterior hipótesis. Sin embargo, queda por aclarar el mecanismo por el cual el sistema degradativo reconoce de forma específica a las proteínas de origen mitocondrial. Además,

como la actividad de este sistema proteolítico dependiente de energía disminuye bruscamente durante la maduración del reticulocito, y se encuentra completamente ausente en la célula roja madura, se ha especulado sobre si es un mecanismo que se autodestruye durante la inducción o bien existen factores que llevan a cabo su inactivación.

Etlinger y Goldberg (153) fueron los primeros en demostrar la existencia de un sistema proteolítico libre de células y ATP-dependiente a partir de lisados de reticulocitos. El sistema no parecía de origen lisosómico, puesto que era soluble y poseía un pH de actividad óptima ligeramente alcalino; además no se veía afectado por inhibidores específicos de proteasas lisosomales. No sólo se necesitaba ATP, sino que éste estuviera en presencia de iones magnesio. La evidencia de que este sistema libre de células es similar al responsable de la degradación de proteínas anormales proviene de:

- a) El sistema necesita compuestos ricos en energía, al igual que la degradación en las células intactas.
- b) Degrada proteínas anormales pero no hemoglobina normal.
- c) Se inhibe por los mismos agentes que inhiben la degradación de proteínas en el reticulocito intacto.
- d) La bestatina, un inhibidor de las aminopeptidasas que causa la acumulación de los productos intermedios de la degradación de proteínas anormales, provoca el mismo patrón proteolítico de péptidos acumulados, tanto en extractos libres de células como en reticulocitos intactos.

Otro grupo de investigadores que ha trabajado intensamente con este sistema proteolítico es el de Hershko et al. (257-259). Comenzaron analizando la distribución de tamaños que presentaba la hidrólisis de polipéptidos marcados y conteniendo análogos de aminoácidos. Vieron que gran parte del marcaje se encontraba en las cadenas completas de globina, mientras que no se encontraban cantidades significativas en fragmentos más pequeños que ésta a lo largo de un experimento de pulso y caza. Además, cuando la degradación se bloqueaba por carencia de energía, no se producía acumulación alguna de fragmentos proteolíticos. Concluyeron que las reacciones iniciales de la degradación de globina deberían ser fuertemente limitantes de la velocidad, en relación con la rápida proteólisis que subsiguientemente sufren los fragmentos intermedios, y que la energía se requiere para, o antes de, las reacciones iniciales de la proteólisis.

Para aclarar el papel del ATP y de las reacciones de este mecanismo dependiente de energía, separaron los lisados de reticulocitos, una vez desprovistos de ATP, en una columna de DEAE-celulosa. La fracción no adsorbida (o fracción 1) tenía como componente activo un polipéptido estable al calor de peso molecular 8.500, denominado APF-1, que no presentaba actividad proteolítica por sí mismo, pero que era necesario para la degradación de proteínas junto con ATP y la fracción que eluye de la columna a una alta concentración salina (o fracción 2).

A continuación se encontró que el polipéptido APF-1 marcado con  $^{125}\text{I}$  forma conjugados covalentes con las proteínas del reticulocito o con sustratos exógenos, en una reacción que requiere ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  y la fracción 2. También se ha demostrado que varias moléculas de APF-1 se conjugan por medio de uniones amida entre los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de las proteínas sustrato y el residuo carboxiterminal del polipéptido APF-1. Estos conjugados entre APF-1 y proteínas, que se forman al añadir la fracción 2 y el ATP, se encuentran en un estado dinámico de continua síntesis y destrucción. Cuando se elimina el ATP se observa una rápida degradación de los conjugados, que va seguida de una liberación cuantitativa de APF-1, que puede volver a conjugarse de nuevo al añadir ATP y fracción 2. Basándose en estos resultados, se propuso un modelo para este sistema proteolítico ATP-dependiente, según el cual la unión covalente entre el polipéptido APF-1 y una proteína iba seguida de una destrucción proteolítica del sustrato modificado.

La composición en aminoácidos de APF-1 es muy similar a la de la ubiquitina, así como su resistencia al calor y punto isoeléctrico. La única, pero notable, diferencia estriba en el extremo carboxiterminal. Mientras que el polipéptido APF-1 contiene dos residuos de glicina, y solo las especies que contienen esta terminación son activas, se ha descrito que la ubiquitina presenta una arginina como aminoácido carboxiterminal.

A partir de la fracción 2 se ha purificado por cromatografía de afinidad covalente sobre ubiquitina-Sepharose, una enzima activadora de la ubiquitina, que no es capaz de catalizar por sí sola la formación de los conjugados, sino que requiere la presencia de otras dos enzimas, que también han sido aisladas a partir de la fracción 2.

Todos los pasos precedentes sugieren que la conjugación con APF-1 es un paso intermedio en la degradación de la proteína sustrato. Parece, por tanto, razonable proponer que la conjugación sirve como una señal de reconocimiento, que proporciona un mecanismo específico y selectivo de degradación y que existen también enzimas proteolíticas específicas que reconocen y degradan de forma selectiva los conjugados entre proteína y ubiquitina. Es muy probable que la unión de varias moléculas de APF-1 provoque una gran alteración en la conformación de la proteína sustrato, y la convierta en una forma altamente susceptible al ataque por dichas proteasas.

Se ha propuesto un mecanismo consistente en cuatro etapas secuenciales (ver Figura 1):

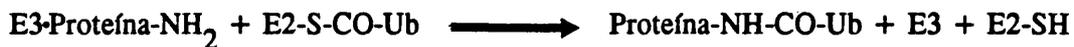
- 1º) La activación inicial de la glicina carboxiterminal de la ubiquitina (Ub) en forma de aciladenilato, con posterior transferencia del polipéptido activado a un grupo tiol de la enzima activadora (E1).



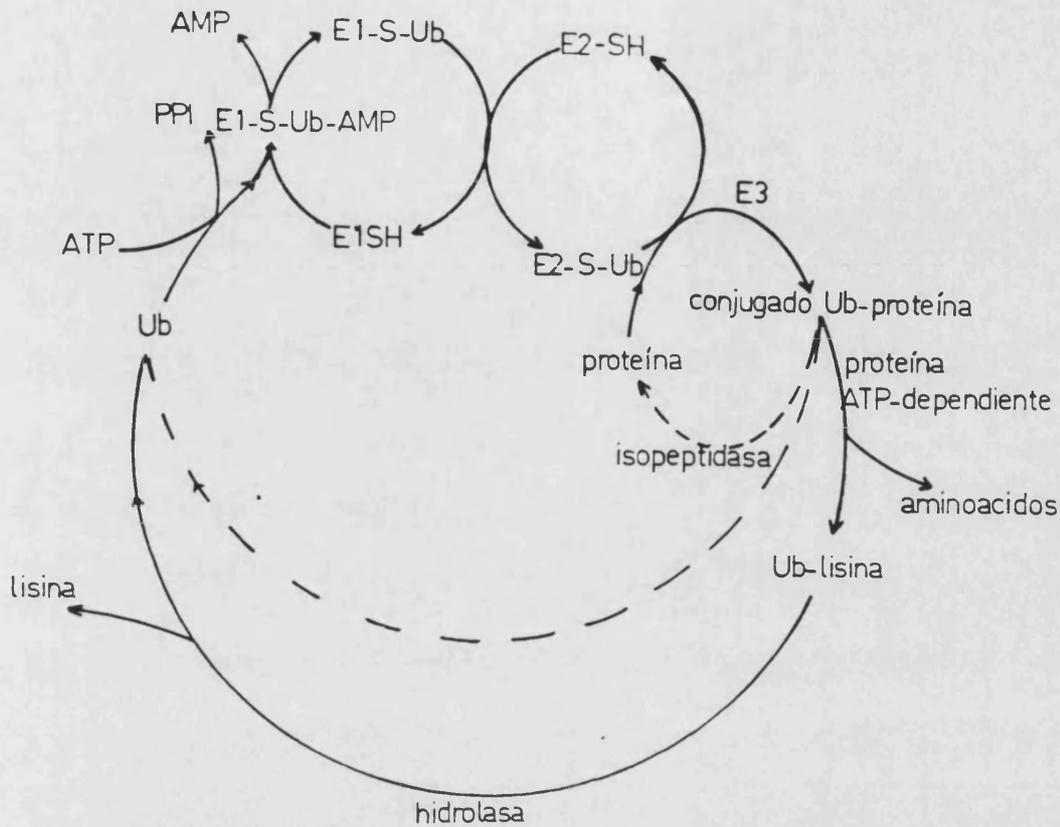
- 2º) Una vez activada, la ubiquitina es transferida desde la enzima activadora (E1) a un grupo tiol de una de las diversas proteínas transportadoras de ubiquitina (E2).



- 3º) Transferencia del extremo carboxiterminal activo de la ubiquitina a los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína sustrato, formando un enlace isopeptídico. Esta reacción tiene una gran preferencia por proteínas ya conjugadas a ubiquitina, puesto que bajo condiciones en las que existe un gran exceso de proteína sustrato, aparecen conjugados que contienen múltiples moléculas de ubiquitina, uniéndose cada cadena adicional de ubiquitina al residuo de lisina de la posición 48 de la cadena anterior (85). Esta unión ubiquitina-proteína tiene lugar, en la mayor parte de los casos, en dos etapas: primero, las proteínas sustrato adecuadas se unen a una enzima ligasa (E3) que es la responsable de catalizar la posterior unión entre la proteína sustrato y la ubiquitina activada, que es transferida desde sus proteínas transportadoras (E2).



- 4º) Ruptura de los conjugados mediante un ataque endoproteolítico y ATP-dependiente sobre la parte de la proteína sustrato, lo que produciría pequeños péptidos todavía unidos a la ubiquitina. En esta última fase, una amidasa rompería el enlace isopeptídico y liberaría, por un lado pequeños péptidos y por otro ubiquitina en forma libre y reutilizable.



**FIGURA 1.- MODELO DEL POSIBLE FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA UBIQUITINA EN LA DEGRADACION INTRACELULAR DE PROTEINAS.**

La ubiquitina (Ub) se une por su extremo carboxiterminal a una enzima activadora (E1) por un enlace tiol-éster rico en energía. La transferencia de ubiquitina a las proteínas es catalizada por una enzima ligasa (E3), que ha su vez ha recibido la ubiquitina de otro intermediario, la proteína transportadora de ubiquitina (E2). Las proteínas que forman conjugados son degradadas por una o varias proteasas, posiblemente ATP-dependientes, hasta originar aminoácidos. La acción de una hidrolasa libera la ubiquitina de los conjugados ubiquitina-lisina (Ub-lisina) resultantes de la degradación anterior.

A pesar de que este modelo concuerda con todos los datos de que se dispone, muchas de las etapas necesitan una mayor investigación. Por ejemplo, todavía no se conoce qué características debe reunir una proteína para convertirse en sustrato de E2, cómo son y de qué forma actúan las isopeptidasas que permiten reciclar la ubiquitina o por qué no siempre es necesaria la participación de E3 para la degradación de proteínas mediante esta ruta (237). También se ha puesto en evidencia que la conjugación de la ubiquitina con la proteína sustrato no es esencial para que se produzca una degradación ATP-dependiente y que, por tanto, el ATP juega diferentes papeles, aparte de consumirse para activar la ubiquitina y en la proteólisis de la proteína sustrato, en los múltiples pasos del proceso de degradación proteica en el reticulocito (154, 636).

Otra hipótesis alternativa de la función de la ubiquitina en la proteólisis ATP-dependiente ha sido formulada por Speiser y Etlinger (607), proponiendo que la ubiquitina reprime un inhibidor de proteasas en el reticulocito. Además, también se ha demostrado que moléculas de Lisozima, cuyos grupos amino han sido bloqueados por guanidación, previniendo por tanto la conjugación de la ubiquitina, también son degradadas de forma ATP-dependiente y activada por la ubiquitina (89). Es decir, muy probablemente la ubiquitina desempeña otras funciones en el proceso degradativo que van más allá del marcaje directo del sustrato. Así, se ha descubierto que la propia ubiquitina tiene una actividad de endoproteasa intrínseca y dependiente de iones calcio (174). Además de sus múltiples funciones en la degradación, la ubiquitina desempeña otros papeles en la célula (422), tales como:

- Regulación de la expresión génica, tal y como lo demuestra el hecho de que se la encuentre conjugada específicamente con las histonas H2A y H2B (290).
- Control del ciclo celular, pues interviene en la degradación de las ciclinas (proteínas que impiden la progresión del ciclo celular) (347).
- Respuesta celular al choque térmico; la misma ubiquitina es una proteína cuya síntesis es inducida por choque térmico (492).
- Modificación de la función de receptores (85).
- Reparación del ADN (291).
- Biogénesis de ribosomas (154, 422).
- Regulación de la interacción entre inhibidores y proteasas (154).

Recientemente, se ha localizado por técnicas inmunocitoquímicas, la presencia de ubiquitina en lisosomas, lo que parece sugerir un papel de estos orgánulos en la degradación bien de la ubiquitina o bien de los conjugados ubiquitina-proteína (581). Incluso se la ha encontrado en la membrana celular externa (598), donde las proteínas substrato son totalmente inaccesibles al sistema proteolítico, que es de localización citosólica. Además, la posibilidad de que exista una interrelación entre la ubiquitina y otros sistemas proteolíticos, se ha visto reforzada por los últimos resultados del grupo de Ciechanover (231), que demuestran que la degradación acelerada de las proteínas celulares que se produce al someter células cultivadas a altas temperaturas, y que tiene lugar principalmente en los lisosomas, necesita la presencia de la enzima activadora de ubiquitina (E1).

La unión de la glicina C-terminal de la ubiquitina al resto N-terminal de la proteína substrato es importante, aunque no es la única señal reconocible por el sistema proteolítico ni la más esencial (96, 323). Así, la ubiquitina es capaz de unirse a otros grupos amino libres (lisinas y argininas) de la proteína substrato, formando incluso cadenas de varias moléculas de ubiquitina, que parecen ser esenciales para la degradación de numerosas proteínas de vida media corta a través de este sistema proteolítico (85). Incluso se ha propuesto que, en aquellos casos en que la ubiquitina puede tener dificultades para conjugarse con los extremos N-terminales, se añadiría a éste un residuo de arginina en una reacción catalizada por una Aminoacil-tRNA Transferasa (96).

También existe una considerable evidencia de una ruta proteolítica ATP-independiente en los reticulocitos (408). La eliminación del ATP en los lisados de reticulocitos, seguida por una diálisis y un fraccionamiento con sulfato amónico, conduce a la aparición de una actividad proteolítica ATP-independiente. Rechsteiner et al. (273) sugieren que dicho tratamiento separa un componente que sería el responsable de la dependencia de ATP de la reacción proteolítica, habiendo propuesto que las dos actividades no se presentan simultáneamente, sino que son formas alternantes del mismo complejo proteolítico. También es posible que las dos formas sean responsables de la degradación de diferentes tipos de substratos. Por ejemplo, Hipkiss et al. (408) han demostrado que fragmentos peptídicos producidos por tratamiento con puromicina o bromuro de cianógeno, son degradados en lisados de reticulocitos en ausencia de ATP. Además, Goldberg et al. (160) han encontrado que la degradación de la hemoglobina modificada mediante agentes oxidantes se produce, en ausencia de ATP, tanto en reticulocitos como en eritrocitos. Por el contrario, proteínas anormales de longitud de cadena correcta pero en las que se han substituido las lisinas con el análogo aminoetilcisteína, son degradadas por un proceso ATP-dependiente (260). Por tanto, de los trabajos publicados hasta la fecha sólo podemos concluir que existe un mecanismo muy complejo de degradación proteica en el reticulocito, con más de una ruta ATP y ubiquitina-dependiente, así como otros mecanismos ATP-dependientes (y ubiquitina-independientes) y ATP-independientes.

Aunque el sistema proteolítico de la ubiquitina está claramente descrito en el reticulocito, operando sobre todo en los últimos estadios de maduración de los reticulocitos a eritrocitos y en las células de eritroleucemia, es menos conocida su presencia en otros tipos celulares. Haas et al. (236) han encontrado que, en hígado de conejo, una cisteínproteínasa rompe el enlace que une las dos glicinas terminales de la ubiquitina eliminando, por tanto, su conjugación a los grupos amino. La inhibición de esta proteasa produce la aparición de una proteólisis ATP- y ubiquitina-dependiente. Además, el sistema de la ubiquitina también se ha encontrado en carcinomas de mama de ratón, en levadura, músculo e hígado de mamíferos, en fibroblastos cultivados, en células vegetales, etc. (94, 155, 659).

#### 1.10.- SISTEMAS PROTEOLITICOS ATP-DEPENDIENTES EN *ESCHERICHIA COLI*.

En muchos aspectos, nuestro conocimiento acerca de la degradación de proteínas está mucho más avanzado en *E. coli* que en células de mamíferos (205). Este microorganismo ofrece, además de su mayor simplicidad, las ventajas de disponer de una gran cantidad de mutantes y de permitir más fácilmente un análisis completo, tanto bioquímico como genético, del proceso degradativo.

Entre los sistemas proteolíticos mejor caracterizados se encuentra el responsable de la inactivación proteolítica del represor del bacteriófago lambda, estudiada principalmente por Roberts et al. Se sabía que este represor, que previene la expresión de los genes víricos necesarios para el crecimiento lítico, era inactivado por tratamientos que afectan al DNA, tales como irradiación con luz ultravioleta o la mitomicina C. Roberts et al. encontraron que, en células tratadas con mitomicina C, el represor es cortado en pequeños fragmentos. Este mecanismo proteolítico para inactivar al represor difiere fundamentalmente de la forma clásica, en la que la inducción ocurre por una unión reversible de una molécula pequeña a la proteína represora. Su importancia en la inactivación del represor se demostró al encontrar que mutaciones que previenen la inducción del fago (como la mutación bacteriana *recA*<sup>-</sup> o la mutación *ind* del fago), también evitan la ruptura del represor (539).

A continuación, Roberts et al. reprodujeron este mecanismo *in vitro*. Encontraron que extractos de una cepa de *E. coli*, en la que el represor es inactivado de forma constitutiva, son capaces de llevar a cabo la ruptura *in vitro* del mismo en presencia de ATP y Mg<sup>2+</sup> (541). El ATP no se podía sustituir por otros nucleótidos y la enzima responsable de esta reacción fue purificada e identificada como el producto del gen *recA* (540). La proteína *recA*, una vez purificada, también era capaz de cortar el represor, pero a una velocidad bastante reducida. Sin embargo, su velocidad

se podía restablecer añadiendo DNA de simple cadena o diversos nucleótidos (107), lo que sugiere que la formación de un complejo ternario entre la proteína *recA*, un polinucleótido y el ATP es necesaria para la activación de la función proteolítica de la enzima.

El producto del gen *recA* es una proteína multifuncional de considerable importancia reguladora en *E. coli*. Es esencial en la recombinación genética y también en la expresión de las denominadas respuestas SOS, que son un conjunto de funciones que ayudan a la supervivencia de la célula en respuesta a agentes que lesionan el DNA, y que incluyen la inducción de la reparación del DNA, mutagénesis inducida, inhibición de la división celular e inducción del profago. Además de su acción como proteasa altamente específica, la proteína *recA* purificada también es capaz de promover el apareamiento *in vitro* de secuencias homólogas de DNA. La función como proteasa parece estar implicada en la inducción de algunas, si no todas, de las respuestas SOS, ya que es capaz de cortar no sólo al represor del fago lambda y del fago P22 de *S. typhimurium*, sino también a la proteína *lexA*, que parece ser el represor de la formación de la proteína *recA*. Su acción catalítica en el apareamiento de DNA de simple cadena en DNA de doble cadena, probablemente explica su papel en la recombinación genética. La activación *in vitro* de su función proteolítica por DNA de simple cadena, puede representar el mecanismo fisiológico que desencadena la expresión de las funciones SOS; puede ser que lesiones en el DNA expongan regiones de DNA de simple cadena, o liberen fragmentos que puedan llevar a cabo la activación de la enzima. No obstante, el papel exacto del ATP al promover esta asociación, y el cambio conformacional en la enzima que activa su función proteolítica, todavía no se han aclarado.

También se ha descubierto en *E. coli* una proteasa ATP-dependiente que puede estar implicada en la degradación de proteínas anormales. Goldberg et al. (449) demostraron que, en extractos solubles de *E. coli*, el ATP estimula la proteólisis de un fragmento sin sentido de la  $\beta$ -Galactosidasa y la degradación de [ $^{14}$ C] metil-globina. Anteriormente, diversos laboratorios habían intentado demostrar una estimulación por ATP de la degradación en *E. coli*, pero todos fracasaron. El éxito de Goldberg et al. parece deberse al procedimiento de lisis de las bacterias, que al ser más suave no inactivaba la proteasa. Además, la actividad proteolítica ATP-dependiente permanecía asociada con la membrana celular. Sin embargo, esta asociación con la membrana no parece ser esencial para la estimulación por ATP, ya que se obtiene el mismo efecto con preparaciones más purificadas que son completamente solubles. Como este grupo ha logrado separar, de entre otras enzimas proteolíticas ATP-independientes, una proteasa ATP-dependiente en forma soluble, puede ocurrir que ésta haya sido liberada de la membrana o bien que ambas representen dos sistemas enzimáticos diferentes, que desempeñan funciones fisiológicas distintas.

La enzima, que se purificó parcialmente, ha sido denominada proteasa La y tiene una necesidad absoluta de ATP y  $Mg^{2+}$  (625); asimismo, también se demostró que era similar al

producto del gen *lon* de *E. coli* (690). La relación entre la función de este gen y la degradación de proteínas anormales ya había sido descubierta por Zipser et al., al aislar mutantes que presentaban una deficiencia en la degradación de los fragmentos sin sentido de la  $\beta$ -Galactosidasa y demostrar que dicha mutación era idéntica a la que ya se conocía previamente como mutación *lon* (259).

Las mutaciones en el gen *lon* no tienen efecto alguno en la degradación de la inmensa mayoría de las proteínas normales de *E. coli*, pero disminuyen la velocidad de degradación de polipéptidos sin sentido, proteínas inertes o proteínas conteniendo canavanina o puromicina, aunque en ninguno de estos casos la inhibición es completa. Además, dicha mutación también produce una variedad de efectos pleiotrópicos, incluyendo una superproducción de polisacáridos de la cápsula, un aumento de sensibilidad a la irradiación y una división celular anormal. Sin embargo, quedaba por explicar si estos efectos eran secundarios y debidos a una lesión principal en la degradación, o bien era ésta la que se inhibía como resultado de otras alteraciones que interferían con una amplia gama de procesos.

Este punto fue aclarado por Markovitz et al., quienes identificaron el producto del gen *lon* mediante técnicas de clonaje, y que resultó ser un polipéptido con una actividad proteolítica ATP-dependiente (84). Al comparar sus propiedades con las de la proteasa La, se encontraron muchas características similares, tales como la especificidad en cuanto a nucleótido y sustrato, susceptibilidad a inhibidores, inactivación por calor y peso molecular aparente. Hoy se conoce, sin ninguna duda, que esta enzima tetramérica es el producto del gen *lon*, que su expresión está ligada a la exposición de las células a un choque térmico y es inducida por la presencia de grandes cantidades de proteínas anormales, en cuya degradación juega un papel clave, así como en la degradación de ciertos polipéptidos normales (90, 642).

Aunque el producto del gen *lon* es diferente de la proteína *recA*, también tienen características comunes. Así, ambos se unen al DNA y tienen una actividad ATPasa que es estimulada por DNA y otros polinucleótidos. Sin embargo, una diferencia notable estriba en el hecho de que, mientras que la hidrólisis del ATP no resulta esencial para la actividad proteolítica de la proteína *recA*, sí que lo es en el caso de la proteasa La. Por otra parte, *recA* sólo es capaz de llevar a cabo una proteólisis limitada y sobre proteínas muy específicas. Para la proteasa La se ha observado una estimulación de su actividad ATPasa por medio de la proteína sustrato, y sólo la degradación de proteínas es la que requiere la hidrólisis del ATP, mientras que la degradación de pequeños péptidos no. Además, la adición de proteínas desnaturalizadas como sustratos es capaz de estimular la actividad proteolítica contra los péptidos de pequeño tamaño, y éstos pueden inhibir la actividad ATPasa de dicha proteasa (200). Así pues, la proteasa La parece actuar a través de un mecanismo en el que las proteínas sustrato y el ATP se unen a sitios alostéricos, que al ser

ocupados activan el centro activo responsable de la proteólisis (411, 412). Este complejo mecanismo parece que pudiera resultar una ayuda para evitar una excesiva o inadecuada proteólisis.

Más recientemente se ha aislado otra proteinasa ATP-dependiente en *E. coli*, que ha sido denominada Clp (o también proteasa Ti, dependiendo del grupo de investigación) (282). Esta enzima tiene un tamaño similar al de la proteasa La, está formada por dos componentes, ClpA y ClpP - influyendo la actividad de uno sobre el otro - y ambos se necesitan para la proteólisis ATP-dependiente. El componente ClpA, cuyo gen *ClpA* ha sido clonado y secuenciado (206), es la subunidad reguladora, contiene dos sitios de unión de ATP y es lábil en su ausencia. Curiosamente, este componente se degrada a través de un proceso dependiente de ClpP, y presenta una vida media *in vivo* alrededor de 1 hora. Esta subunidad forma parte de una familia de proteínas muy conservadas y ampliamente difundidas en una gran variedad de sistemas celulares, que van desde *E. coli* hasta el tomate o los tripanosomas (207), y cuya función se desconocía hasta conocer su homología con ClpA. El gen *ClpP* que codifica el componente ClpP, también ha sido clonado (396). Esta subunidad es la responsable de la proteólisis y contiene el centro activo con el residuo de serina. Aunque el tamaño del péptido codificado es de 21.679, su peso molecular nativo se encuentra alrededor de 240.000 y, al microscopio electrónico presenta una estructura similar a la de los proteosomas. Además, muestra una alta homología con una proteína codificada por el DNA cloroplástico que está muy conservada en los cloroplastos de distintas especies vegetales, y los anticuerpos contra ClpP dan reacción cruzada con proteínas de tamaño similar en bacterias, eucariotas inferiores, plantas y células animales (397). Por tanto, el hecho de que ambas subunidades estén muy conservadas y difundidas tanto en organismos procariotas como eucariotas, indica que proteasas similares a Clp son elementos muy importantes de los procesos proteolíticos dependientes de energía.

En el caso de Clp, la actividad ATPasa se ve también estimulada por la presencia de proteínas sustrato, al igual que con la proteasa La, aunque la hidrólisis de pequeños péptidos no necesita la presencia de ATP, al contrario de lo que ocurre con la proteasa La (689). En el funcionamiento de estas dos proteasas ATP-dependientes, la hidrólisis de este nucleótido no parece ligada termodinámicamente a la ruptura del enlace peptídico, sino que la reacción dependiente de energía parece permitir, en un caso (proteasa Clp) el acceso al centro activo responsable de la proteólisis, y en el otro (proteasa La) la formación del mismo (635). La especificidad en cuanto a sustrato es diferente en ambas proteasas. Pero estas diferencias muy probablemente no residen tan sólo en los distintos centros activos de ambas enzimas, sino que al contener éstas lugares de unión de proteínas, que son los que controlan la hidrólisis del ATP, debe ser la interacción con dichos sitios de regulación los que determinan las velocidades de degradación.

### 1.11.- OTROS SISTEMAS PROTEOLITICOS ATP-DEPENDIENTES.

Todas las proteinasas ATP-dependientes que han sido, al menos parcialmente, purificadas y caracterizadas hasta la fecha, se citan en la Tabla 4. Según se puede observar en la misma, estas enzimas se pueden dividir en dos grandes grupos: el primero está formado por enzimas de localización citosólica y se compone de cisteínproteinatas; el segundo está constituido por serínproteinatas cuyo origen es bacteriano o mitocondrial. Ambos grupos tienen tres características en común, como son el estar integrados por enzimas que son proteinas oligoméricas, de alto peso molecular y con valores alcalinos para el pH óptimo de su actividad enzimática.

Las principales diferencias entre ambos grupos estriban en el residuo de aminoácido situado en el centro activo y en el mecanismo de acción del ATP. Las cisteínproteinatas no requieren la presencia de iones magnesio para su actividad, no se inhiben por el vanadato y son estimuladas tanto por el ATP, como por los análogos no hidrolizables del mismo. Todo ello indica que la hidrólisis del ATP no se necesita para la actividad proteolítica, y que el papel que desempeña el ATP es más bien el de efector alostérico que regula la actividad de la proteinasa. Así, la función del ATP parece consistir en estimular una actividad proteolítica basal (122, 123, 125), o bien estabilizar la proteasa contra la desnaturalización térmica (109, 285).

Por el contrario, las serínproteinatas sí que necesitan iones magnesio para su actividad - con excepción de la proteasa Clp de *E. coli* - se inhiben por vanadato y no son activadas por los análogos no hidrolizables del ATP. Por tanto, la hidrólisis del ATP es necesaria para la actividad proteolítica, y son este grupo de enzimas las que verdaderamente son proteinasas ATP-dependientes, cuyo ejemplo mejor caracterizado lo constituye la proteasa La que acabamos de comentar en el apartado anterior.

Una proteinasa que parece presentar propiedades comunes a ambos grupos, ha sido purificada a partir de eritrocitos de ratones leucémicos (676). Esta enzima es de localización citosólica, necesita de la hidrólisis del ATP para su actividad y es totalmente inhibida por N-etilmaleimida, aunque es posible que en realidad se trate de una mezcla de proteinasas. Así, a partir de la misma fuente, también se ha purificado otra proteinasa ATP-dependiente distinta de la anterior (533).

También se ha demostrado la existencia de enzimas proteolíticas estimuladas por ATP en diversas células de mamíferos. Así, se ha purificado parcialmente una proteasa alcalina ATP-estimulada a partir de hígado, riñón, cerebro, músculo estriado y corazón de rata, que degrada

TABLA 4.- PROTEINASAS ATP-DEPENDIENTES.

Procedencia	Clase <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa)	pH óptimo	Inhibidores <sup>b</sup>	Ref.
Músculo esquelético de rata, citosol	Cys	500	7,5	NEM, pHMBS	285
Músculo esquelético de rata, citosol	Cys	750	8 - 9	IAA, pHMBS	109
Hígado de rata, citosol	Cys	550	7,5 - 9,5	IAA(parcial)	124
Corazón de rata, citosol	Cys	500	7 - 10	NEM, IAA	123
Hígado de ratón, citosol	Cys	400	7,5 - ?	NEM, pHMB	67
Cortex adrenal bovino, mitocondria	Ser	650	8,2	PheMeSO <sub>2</sub> F, NEM, vanadato	67
Hígado de rata, matriz mitocondrial	Ser	550	7,5 - 10	DFP, PheMeSO <sub>2</sub> F, vanadato	127
Músculo esquelético de pollo, citosol	Ser	600	8	NEM, DFP	159
<i>Escherichia coli</i> ( Proteasa La )	Ser	370	9 - 9,5	DFP, pHMB, vanadato	411, 412, 635
<i>Escherichia coli</i> ( Proteasa Ti )	Ser	370	8	DFP, NEM	282, 689
<i>Escherichia coli</i> ( Proteína recA )	Ser (?)	230	7,5	?	205
Hígado de rata, membrana interna mitocondrial	?	?	7,6	EDTA	520
Células eritroleucémicas de ratón, asociada a partículas citoplasmáticas	?	600	7,8	NEM, hemina, vanadato	676
Mamíferos, complejo 20S ( Proteasa multicatalítica )	?	700	7 - 10	NEM, pHMB, hemina	138, 536
Reticulocitos de conejo, complejo 26S ubiquitina-dependiente, citosol	?	?	7,8	NEM, EDTA, hemina	183, 273, 274

<sup>a</sup> Cys indica que la proteinasa se ha clasificado como cisteínproteinasa, Ser como serínproteinasa y el signo de interrogación que el dato en cuestión se desconoce o, si está entre parentesis, que no ha sido confirmado.

<sup>b</sup> Abreviaturas: DFP, diisopropil fluorofosfato; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; IAA ácido yodoacético; NEM, N-etilmaleimida, pHMB, p-hidroximercuribenzoato; pHMBS, ácido p-hidroximercuribenzenosulfónico, PheMeSO<sub>2</sub>F fenil metil sulfonil fluoruro.

[<sup>14</sup>C] globina (122). Esta enzima se diferencia de otras proteasas hepáticas ya conocidas, y en particular de las Catepsinas lisosomales, porque:

- 1) Se encuentra en la fracción soluble de los homogeneizados, incluso utilizando métodos de lisis celular muy suaves.
- 2) Tiene un pH óptimo alcalino y es inactivada por debajo de pH 7.
- 3) Su peso molecular excede en mucho al de cualquier proteasa lisosomal conocida, pero es similar al de la proteasa ATP-estimulada de los reticulocitos.

Presenta particular interés el hecho de que la proteasa hepática se estimula tanto por ATP como por pirofosfato (122). Aunque el significado del efecto del pirofosfato no se ha aclarado, puede que ambos factores actúen alostéricamente sobre la actividad proteolítica. Por otra parte, existen precedentes en los que la hidrólisis de pirofosfato puede reemplazar la rotura del ATP en reacciones que necesitan energía (690). Además, hay resultados contradictorios acerca de la necesidad de la hidrólisis del ATP en la estimulación de la actividad proteolítica (122, 259).

Rapoport et al., al indagar sobre la posibilidad de que las mitocondrias de otras células distintas del reticulocito, fueran objeto de degradación por sistemas ATP-dependientes, han caracterizado uno en la membrana interna de la mitocondria de hígado de rata (520). Es capaz de utilizar el ATP producido intramitocondrialmente, así como el añadido exteriormente. El sistema es dependiente de iones  $\text{La}^{2+}$  y se le ha atribuido como posible función fisiológica, la ruptura selectiva de la membrana interna mitocondrial.

Goldberg et al. (127) también han demostrado la existencia de una ruta ATP-dependiente para la degradación de proteínas mitocondriales. Han purificado, a partir de mitocondrias de hígado de rata, una endoproteasa ATP-dependiente que es activa contra [<sup>3</sup>H] metil-caseína y [<sup>14</sup>C] metil-globina, pero no contra [<sup>125</sup>I] insulina. Esta proteasa se encuentra en la matriz mitocondrial, tiene un peso molecular aparente de 55.000, y es activa sólo a valores de pH alcalinos. El ATP, en concentraciones fisiológicas, estimula la actividad proteolítica entre 10 y 40 veces, aunque sólo en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . Además, se necesita la hidrólisis del ATP en los pasos iniciales del proceso degradativo. La enzima también contiene una actividad ATPasa, sensible al vanadato (un inhibidor de ATPasas solubles). Estudios llevados a cabo mediante inhibidores de proteasas demuestran que, esta endoproteasa ATP-dependiente, contiene probablemente una serina en su centro activo. Todas estas características parecen diferenciarla claramente, tanto del producto del gen *recA* de *E. coli*, como de la proteasa estimulada por ATP y descrita en el citosol de las células animales. Asimismo,

también parece diferir considerablemente del sistema degradativo ATP-dependiente del reticulocito descrito por Hershko et al., puesto que no necesita ubiquitina para su funcionamiento.

Sin embargo, esta endoproteasa sí que parece extraordinariamente similar a la proteasa La de *E. coli*, siendo tanta la semejanza que incluso se ha sugerido como una posible evidencia del origen bacteriano de las mitocondrias de las células eucariotas.

Más recientemente, se ha descubierto una proteasa de alto peso molecular (700.000), de origen no lisosómico y prácticamente presente en la totalidad de los organismos eucariotas, desde las arqueobacterias hasta la células de mamíferos (108), que se ha denominado proteasa multicatalítica. Está ausente en los organismos procariontes, pero los anticuerpos producidos contra la proteasa Clp de *E. coli* reconocen a esta proteasa multicatalítica, lo que sugiere una similitud estructural entre ambas (635). No sólo está ampliamente distribuida, sino que es relativamente abundante y presenta una compleja estructura de múltiples y distintas subunidades (unas 20, y de un tamaño que oscila entre 21.000 y 34.000 daltons) dispuestas formando una estructura cilíndrica hueca (27), y propiedades catalíticas hasta ahora inusuales. Este complejo, de coeficiente de sedimentación 20S, es similar, si no idéntico, a las partículas 19S-20S denominadas prosomas y presentes en todas la células eucariotas (161), y por ello se ha denominado también proteosoma. Esta proteinasa posee al menos dos centros catalíticos y puede hidrolizar enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de residuos de aminoácidos básicos, hidrofóbicos o ácidos (535). Los estudios con inhibidores no han podido aclarar si se trata de una cisteín- o serínproteínasa y también se desconoce su mecanismo de catálisis. El ATP no parece tener efecto en la mayoría de las preparaciones purificadas, pero recientemente se ha aislado en un forma ATP-dependiente (404, 536). En cuanto a las funciones propuestas para esta proteinasa, cabe señalar que su vida media es muy larga (12-15 días) (633), lo que parece indicar su importancia en las funciones de mantenimiento celular.

Existe un segundo tipo de proteasa de alto peso molecular y compuesta de múltiples subunidades, que cataliza la degradación ATP-dependiente de los conjugados de proteína-ubiquitina (274). El funcionamiento y regulación de ambos complejos de proteinasas en la proteólisis intracelular es uno de los temas de investigación más actuales. Así, se ha demostrado que este complejo 26S ATP-dependiente que degrada proteínas unidas a ubiquitina, está integrado por tres componentes distintos denominados CF-1, CF-2 y CF-3 (183). El ensamblaje de estos tres factores para formar el complejo multienzimático 26S activo necesita  $Mg^{2+}$ -ATP, y también se requiere ATP para su actividad proteolítica. El factor CF-3 ha sido identificado como el complejo enzimático 20S de la proteasa multicatalítica (139, 156), que además parece constituir el núcleo catalítico del complejo 26S (175, 251, 301), aunque es un tema objeto de controversia, puesto que otros investigadores han encontrado resultados opuestos (324).

Finalmente, en el músculo esquelético de pollo se ha descrito una proteasa ATP-dependiente que hidroliza proteínas no unidas a ubiquitina y que se inhibe por los inhibidores de serínproteinasas (159). Sin embargo, hay que resaltar que algunas de las proteinasas descritas en la Tabla 4 podrían, bien ser la misma que se ha descrito en diferentes tejidos, o bien ser fragmentos o subunidades tanto de la proteasa multicatalítica como del complejo 26S.

### 1.12.- LA HIPOTESIS DE LA PLASTICIDAD MOLECULAR.

Un concepto en enzimología, hoy en día ya clásico y con abundancia de ejemplos en la literatura, es el hecho de que una proteína puede ser protegida contra la desnaturalización por substratos o cofactores. Sin embargo, el fenómeno contrario, es decir, el efecto labilizador o inactivador que pueden tener los distintos ligandos de una enzima, tardó más en ser aceptado. El primero en darse cuenta de la importancia de estos resultados, en agruparlos y resaltarlos, fue Grisolia en una amplia revisión elaborada hace veinte años (217) y que proporcionó una vasta fuente de información sobre este tema, sorprendentemente inadvertido hasta entonces.

A la hora de comprender la interpretación que de estos efectos estabilizadores y desestabilizadores se ha dado, es preciso hacer un poco de historia y observar el contexto en el que surgen. Para explicar el mecanismo y la especificidad de la acción de las enzimas, Fischer (170) sugirió en 1894 los conceptos de la cerradura y la llave, y de la plantilla; ambos requerían la existencia de una complementariedad en las superficies del substrato y de la enzima, y atribuían la falta de reactividad de moléculas geoméricamente diferentes del centro activo de la enzima a impedimentos estéricos.

Sesenta años más tarde, la teoría de la " adaptación inducida ", propuesta por Koshland (338), supuso la más clara y definitiva afirmación del papel que la flexibilidad del centro activo juega en el funcionamiento de las enzimas. Así, hoy en día está totalmente aceptada la idea de que la unión de ligandos específicos (substratos, cofactores, etc.) va acompañada de transiciones conformacionales en las enzimas. Por tanto, es incorrecto el concepto teórico de una única conformación " nativa " para una proteína, como también lo es el uso indiscriminado de la " adaptación inducida " para indicar y explicar cualquier cambio inducido por un ligando en la conformación de una proteína. Sin embargo, el término " adaptabilidad conformacional ", utilizado por Theorell (639), resume muy claramente el punto de vista actual sobre el significado biológico de la naturaleza flexible de las proteínas.

No obstante, esta evidencia dio lugar a una amplia gama de expresiones, tales como flexibilidad, elasticidad, plasticidad, adaptabilidad, etc., que venían a querer describir, en lugar de definir, el fenómeno. Todo ello, junto con una abundante documentación y evidencia experimental de la importancia biológica de la respuesta conformacional, condujo a Grisolia a formular en 1964 su hipótesis de la plasticidad molecular (217, 223, 224, 228) y que puede resumirse en los siguientes apartados:

- 1.- Las enzimas son elásticas y están sujetas a isomerización estructural durante la catálisis. Por tanto, tras finalizar la conversión del sustrato en producto, deben de volver a su conformación inicial para comenzar un nuevo ciclo enzimático.
- 2.- La conformación enzimática está influida por el medio catalítico. Las diferencias conformacionales que puede adoptar una molécula de proteína, como las de cualquier otra, deben seguir la distribución energética predicha por la ecuación de Boltzman:

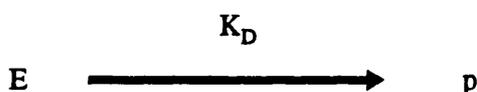
$$N_i = A e^{\epsilon_i/kT}$$

donde  $N_i$  es la concentración de conformeros de un nivel de energía dado ( $\epsilon_i$ ),  $k$  la constante de Boltzman,  $T$  la temperatura y  $A = (N_i)/(e^{\epsilon_i/kT})$ .

- 3.- Las distintas conformaciones de la enzima pueden responder de forma diferente a agentes químicos, físicos o biológicos. Consiguientemente, la estabilidad vendrá determinada por la altura de la barrera energética que separa el cambio reversible (elástico) del irreversible (plástico), y de la distribución de las moléculas de proteína entre las diversas conformaciones y sus correspondientes niveles energéticos. El término plástico implica, no sólo la capacidad de la proteína de ser moldeada o alterada por ligandos o factores ambientales, sino también la de retener la forma después de la modificación, puesto que al traspasar el límite de elasticidad, el cambio plástico que tiene lugar conduce a un menor grado de libertad.
- 4.- Actividad y estabilidad están relacionadas y son, probablemente, muy similares desde un punto de vista mecánico. Todo lo necesario, pues, para explicar los cambios en estabilidad inducidos por sustratos, es que las conformaciones con diferente energía, producidas por las uniones con ligandos, conducen a una mayor o menor facilidad en la desnaturalización.

### 1.13.- MEDIDA DEL RECAMBIO PROTEICO.

El recambio o " turnover " de una proteína es un término que se utiliza para describir el proceso global de renovación que experimenta la masa de una proteína. Por tanto, el concepto de " velocidad de degradación proteica ", puede tener distinto significado según su contexto. Cuando se refiere al recambio de una proteína específica, puede expresar la velocidad de pérdida de actividad enzimática, o de antigenicidad de dicha proteína. En cambio, cuando se considera la degradación de grupos de proteínas celulares, el término indica la velocidad de producción de aminoácidos libres a partir de dicho grupo de proteínas. Este proceso de recambio puede implicar la producción de nueva materia, la desaparición de parte de la presente o incluso el intercambio de la misma entre dos o más compartimientos. Por tanto, el uso de este concepto pretende enfatizar el hecho, hoy en día ya profundamente demostrado y aceptado, de que el nivel intracelular de una proteína está controlado, tanto por su velocidad de síntesis como por su velocidad de degradación, y que cualquier cambio en el mismo proviene de un cambio en alguna o en ambas velocidades. En condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la masa total de una proteína no experimenta ningún cambio, su velocidad de síntesis y de degradación deben ser iguales. La reacción de degradación se puede describir como:



siendo E la enzima nativa, p el producto del paso irreversible y limitante de la velocidad en la degradación de E y  $K_D$  la constante de velocidad para dicha reacción. La ecuación de velocidad para la reacción anterior es:

$$dE_{(t)}/dt = -K_D \cdot E_{(t)}$$

puesto que se ha observado que el proceso degradativo sigue cinéticas de primer orden, mientras que la síntesis de proteínas se ajusta a cinéticas de orden cero. Al integrar la ecuación anterior obtendremos:

$$E_{(t)} = E_{(0)} e^{-K_D \cdot t}$$

o bien:

$$\ln [E_{(0)}/E_{(t)}] = K_D \cdot t$$

siendo  $E_{(0)}$  el número inicial de moléculas de proteína presentes, y  $E_{(t)}$  el número de las restantes después de un tiempo  $t$ .

La vida media de una proteína ( $t_{1/2}$ ) se define como el tiempo requerido para que la mitad de las moléculas inicialmente presentes sean degradadas. Por tanto, su relación con la constante de velocidad de la degradación es:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_D$$

y constituye un parámetro útil cuando se quieren comparar velocidades de degradación entre diferentes proteínas.

Obviamente, tanto la síntesis como la degradación de una proteína son procesos celulares complejos, que implican diferentes pasos, muchas veces todavía desconocidos, por lo que este tratamiento matemático resulta de una simplificación. Así, en experimentos de determinación de velocidad de recambio, la síntesis proteica se observa tan sólo como aparición de nuevas moléculas, mientras que la degradación se mide, usualmente, en forma de pérdida o desaparición de proteína a partir de un acervo intracelular de moléculas semejantes.

Esencialmente, todas las aproximaciones a la medida de la degradación proteica implican alguno de los métodos siguientes:

- 1.- Medida de: a) pérdida de proteína, o b) liberación de aminoácidos, después de la inserción intracelular de una proteína marcada.
- 2.- Medida de: a) pérdida de proteína, o b) liberación de aminoácidos después del marcaje con precursores radiactivos.
- 3.- Medida de la velocidad de producción de un producto no metabolizable y que puede relacionarse directamente con una proteína en particular.
- 4.- Cálculos indirectos a partir de medidas de la velocidad de síntesis y de cambios en el contenido intracelular de una determinada proteína.

La elección de un método dependerá del sistema sobre el que se vaya a trabajar y de la proteína sometida a estudio. Los resultados que se obtengan, siempre se aplicarán al cálculo, en la forma más precisa posible, de la constante de velocidad de la degradación. Por ello, las medidas

que se deben llevar a cabo descansan, en gran parte, en el uso de los métodos isotópicos. En nuestro caso, y al haber elegido la OTC como modelo para el estudio de los procesos de recambio de las proteínas mitocondriales hepáticas, dos son las alternativas que se presentan:

A) Administración de un precursor marcado con un único isótopo.

Este procedimiento, que es el más simple para la determinación de la constante de velocidad, consiste en seguir la pérdida del marcaje que experimenta la proteína o fracción celular en cuestión, en función del tiempo transcurrido desde una única administración de un aminoácido radiactivo. La representación del logaritmo de la cantidad de radiactividad que permanece en la proteína frente al tiempo transcurrido, debe dar una línea recta cuya pendiente es igual a  $-K_D$ , puesto que el proceso de degradación proteica intracelular sigue una cinética de primer orden.

Bajo condiciones de estado estacionario se suele medir la pérdida de radiactividad específica, mientras que en condiciones no estacionarias, en las que el nivel de proteína esté cambiando, se determina la pérdida del total de la radiactividad incorporada. Uno de los principales problemas de esta técnica, es el uso frecuente de precursores radiactivos que sean susceptibles de sufrir una extensa reutilización. Esta es consecuencia del recambio proteico, que provoca que nuevas moléculas del aminoácido radiactivo aparezcan de nuevo en el acervo intracelular de aminoácidos, conduciendo a un aumento en el marcaje de la proteína a lo largo del tiempo en el que las medidas se están realizando. El resultado es una sobrestimación del valor real de la vida media, tanto mayor cuanto menor es el tiempo de recambio de la proteína.

Existen diversas aproximaciones para minimizar el problema de la reutilización. Una de ellas hace uso de arginina marcada con  $^{14}\text{C}$  en el grupo guanidino, como precursor para el marcaje de las proteínas hepáticas. La alta concentración de Arginasa en el hígado, hidroliza rápidamente el carbono del grupo guanidino a urea, que desaparece del acervo intracelular. Una modificación de este método consiste en utilizar como precursor radiactivo  $[^{14}\text{C}]$  carbonato. Puesto que solamente el hígado tiene un notorio ciclo de la urea, sólo en este tejido se produce una apreciable incorporación al grupo guanidino de la arginina. No obstante, el  $[^{14}\text{C}]$  carbonato también se incorpora al grupo carboxilo de la arginina y de otros aminoácidos, aunque en estos casos, la posibilidad de reutilización es muy baja (626).

## B) Administración de dos isótopos.

Arias et al. (25) introdujeron el método denominado del doble isótopo para la determinación de  $K_D$ . En esta técnica se administra un aminoácido marcado con un isótopo (por ejemplo, [ $^{14}\text{C}$ ] leucina) y se deja que vaya decayendo por un período determinado de tiempo. Una vez transcurrido éste, se da una segunda forma isotópica del mismo aminoácido (por ejemplo, [ $^3\text{H}$ ] leucina) - aunque también puede emplearse otro precursor cualquiera, siempre que esté marcado con un isótopo distinto del primero - al mismo animal, que es sacrificado tras un breve intervalo de tiempo. La relación entre las actividades radiactivas del segundo y el primer isótopo (o sea, el cociente entre [ $^3\text{H}$ ] dpm./[ $^{14}\text{C}$ ] dpm.), incorporadas en cualquier proteína, da una indicación relativa de su velocidad de degradación. Esa relación es, además, equivalente al cociente  $E_t/E_0$ , siendo  $t$  el intervalo entre las dos dosis de precursor radiactivo y, por tanto, constante para cada experimento. Luego la representación del  $\ln$  ([ $^3\text{H}$ ] dpm./[ $^{14}\text{C}$ ] dpm.) frente a  $K_D$  para varias proteínas debe dar una línea recta, cuyo valor es función de las cantidades que se administren de los precursores radiactivos y del intervalo entre ambos.

La facilidad experimental con que se obtienen los datos de incorporación de cada isótopo, proporcionaba un gran valor potencial al método en el estudio de la degradación proteica. Sin embargo, era difícil valorar su precisión, así como establecer comparaciones con otros métodos, pues éste sólo da una relación entre actividades radiactivas y no una constante de velocidad de degradación.

Posteriormente, Glass y Doyle (195) mostraron que se podía construir una curva estándar representando los valores conocidos de  $K_D$  (calculados por otros procedimientos, como el marcaje con [ $^{14}\text{C}$ ] arginina), frente a los valores experimentales que se obtienen al calcular el logaritmo del cociente entre la radiactividad incorporada para cada uno de los isótopos. La pendiente de esta recta es igual al valor de la constante de proporcionalidad y, por tanto, dada una relación cualquiera entre actividades radiactivas incorporadas a una proteína, se puede obtener la  $K_D$  correspondiente a partir de la mencionada curva estándar.

La validez de la aplicación de ésta técnica reside en las siguientes condiciones:

- Las velocidades de síntesis y degradación son idénticas entre la primera y la segunda inyección de isótopos.
- Las proteínas bajo estudio siguen una cinética exponencial de degradación.

- En el momento en que se sacrifica el animal, las cinéticas de degradación de las proteínas marcadas con  $^3\text{H}$  y con  $^{14}\text{C}$  deben decrecer a la misma velocidad.

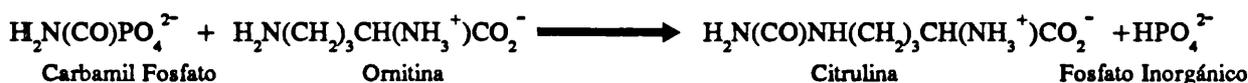
Por tanto, en esta técnica es importante la elección de un adecuado intervalo de tiempo entre ambas administraciones de los isótopos, que deberá variar dependiendo del rango de vidas medias examinado. Para cálculos precisos de constantes de velocidad de proteínas de recambio muy rápido, se necesitará utilizar un intervalo corto. Además, en estos casos también es importante emplear precursores radiactivos que presenten una mínima reutilización, sobre todo en el caso del primer isótopo.

## **1.14.- ORNITINA TRANSCARBAMILASA.**

### **1.14.1.- PERSPECTIVA HISTÓRICA.**

La Ornitina Transcarbamilasa fue descubierta en 1948 por Grisóla y Cohen, cuando demostraron la fijación enzimática de anhídrido carbónico y amonio a la ornitina para formar citrulina (100, 218, 219). Posteriormente, localizaron el proceso en una fracción particulada del hígado y vieron que tenía lugar en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes, la primera de ellas daba origen a un compuesto intermedio, fosforilado e inestable, al que denominaron compuesto X y en el segundo paso se formaba citrulina mediante la transferencia del " grupo carbamil activo " de dicho compuesto X, al grupo  $\delta$ -amino de la ornitina. Más adelante, Jones, Spector y Lipmann (295) sintetizaron químicamente el carbamil fosfato y demostraron su identidad con el compuesto X, tal y como había sido previamente propuesto por Korzehevsky (citado en 172). Ulteriormente, cuando se purificaron y aislaron ambas enzimas, fueron identificadas como la Carbamil Fosfato Sintetasa I y la Ornitina Transcarbamilasa.

Por tanto, la Ornitina Transcarbamilasa cataliza el segundo paso en la biosíntesis de urea que tiene lugar en el hígado de los animales ureotélicos. Su primera purificación parcial fue realizada también por Grisóla y Cohen (220) al separarla, mediante inactivación térmica, de la CPS I. Otras purificaciones parciales fueron realizadas en 1957 por Reichard (527), para la enzima de hígado de rata, y por Burnett y Cohen (77), para la de hígado bovino; a partir de las mismas, se determinó la estequiometría de la reacción que cataliza la Ornitina Transcarbamilasa y que quedó establecida de la siguiente forma:



La enzima de hígado bovino fue purificada totalmente por Marshall y Cohen (380), quienes proporcionaron un método de purificación sencillo, fácilmente reproducible y que partía de una fuente muy adecuada para obtener suficientes cantidades de enzima y poder estudiar sus propiedades con detalle. Es por esta razón por lo que, hasta la posterior aparición de métodos de purificación para la enzima de rata, ha sido la enzima de hígado bovino la más estudiada y de la que más datos, en cuanto a propiedades físicas, cinéticas y mecanismo de reacción enzimática, se dispone (379-387). Posteriormente a Marshall y Cohen, se han descrito preparaciones de Ornitina Transcarbamilasa pura a partir de riñón de pollo (644), de hígado de conejo (485), de rata (97, 121, 267, 375), de ratón (72), humano (301, 499), así como de diversos microorganismos - resulta interesante destacar que, en bacterias, se encuentran dos OTC distintas: una anabólica, que participa en la biosíntesis de arginina, y otra catabólica, que está implicada en la degradación de dicho aminoácido - (1, 45, 151, 191, 359, 380, 455, 464, 543, 671), peces (695) y vegetales - donde se suele presentar como un tetrámero (2), aunque con subunidades de tamaño similar al del resto de las otras OTC - (320, 388, 632), e incluso ha sido cristalizada (58). Los diversos métodos de purificación que se han descrito en la bibliografía, y que mejoran considerablemente, en cuanto a pureza y rendimiento, los resultados iniciales obtenidos por Reichard con la enzima de hígado de rata, han utilizado técnicas muy variadas, como por ejemplo: fraccionamientos con sulfato amónico (380), cromatografía de intercambio iónico (375), cromatografía de interacción hidrofóbica de alto rendimiento (413) o cromatografía de afinidad (121, 267). Sin embargo, es esta última estrategia la más versátil, puesto que la enzima proveniente, en principio, de cualquier fuente, se puede purificar por cromatografía de afinidad mediante su interacción con un ligando inmovilizado: el  $\delta$ -N(Fosfoacetil)-L-Ornitina ( $\delta$ -PALO), que es un potente inhibidor de la Ornitina Transcarbamilasa, por ser un análogo del estado de transición de la reacción que cataliza esta enzima (265, 423, 495).

Por otra parte, casi todo cuanto se conoce acerca de su biosíntesis y de la influencia que sobre ésta ejercen los factores nutritivos y hormonales, proviene de estudios llevados a cabo con material procedente de hígado de rata. No obstante, todas las enzimas procedentes de mamíferos se han mostrado muy semejantes en cuanto a propiedades físicas y composición en aminoácidos, aunque se han descrito algunas diferencias en los residuos aminoterminales y en la actividad específica de las diversas preparaciones, incluso procedentes de una misma fuente (119). Ultimamente, ha sido posible conocer la estructura primaria de diversas OTC, pues han sido clonados y secuenciados los cDNA correspondientes a la OTC de hígado humano (269), de rata (344, 630) y de ratón (657), así como los genes completos que codifican para la enzima humana

(247), de rata (631), de ratón (570), las enzimas anabólica (287) y catabólica (45) de *Pseudomonas aeruginosa*, las dos enzimas anabólicas de *E. coli* (52, 348, 650) y las pertenecientes a levadura (106), *Aspergillus niger*(78) y *Pachysolen tannophilus* (603). La semejanza bioquímica observada entre las enzimas de mamíferos se ha visto confirmada a nivel molecular. Así, por ejemplo, la OTC humana y la de rata presentan una homología del 95 % a nivel de DNA y del 90 % en aminoácidos, mientras que la homología entre las enzimas de rata o humana y de *E. coli* es del 39 % en aminoácidos.

#### 1.14.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES.

La OTC se encuentra en la matriz mitocondrial (182) de las células hepáticas de los animales ureotélicos (80, 225, 515). Esta enzima también se ha encontrado en la mucosa intestinal (143, 241, 453, 515), en las células blancas de la sangre (452, 688) y en riñón (21, 604, 645, 646), de los mismos animales ureotélicos, aunque en todos estos casos en niveles muy bajos, pero metabólicamente significativos y siempre localizada en la mitocondria. Se postula que el papel de la presencia extrahepática de esta enzima, sería el de participar en la biosíntesis de arginina. Así, la citrulina producida por la acción de la CPS I - que también se encuentra en todos los órganos mencionados para la OTC - y de la OTC, circularía hacia otros tejidos donde sería convertida en arginina. Más recientemente se ha sugerido, mediante un análisis bioquímico e inmunocitoquímico, la posibilidad de que la OTC y la CPS I estén formando un complejo enzimático parcialmente asociado a la membrana interna mitocondrial (512), aunque otros estudios no han confirmado esta hipótesis (241).

La enzima no tiene otros requerimientos específicos más que los substratos, y ni ácidos carboxílicos, ni nucleótidos ni otros cofactores se ha visto que tengan efecto sobre su actividad *in vitro* (375). Una propiedad común a todas las enzimas que se han estudiado, incluyendo las que proceden de bacterias o de plantas, ha sido su relativa estabilidad térmica, soportando temperaturas entre 60° y 65° C. La OTC de mamíferos es codificada por genes nucleares situados en el cromosoma X (120, 532, 597), sintetizada en los ribosomas 80S en forma de un precursor de 39.400 daltons, 32 aminoácidos mayor que la subunidad madura (36.000 daltons) y transportada, en asociación con un procesado proteolítico postranslacional y dependiente de energía, al interior de la mitocondria, donde se ensambla en un homotrímero enzimáticamente activo (ver epígrafe 1.14.4.).

### 1.14.3.- ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HÍGADO BOVINO.

Como ya se ha indicado, la primera preparación totalmente homogénea la consiguieron Marshall y Cohen a partir de una extracción, mediante detergente, de toda la fracción particulada del hígado bovino. La enzima era homogénea con respecto a su peso molecular (108.000, determinado a partir de su posición de equilibrio de sedimentación en un medio no desnaturante, y 36.000 en hidrocloreuro de guanidina 6 M), y daba lugar a una única banda, de peso molecular 37.000, en una electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Sin embargo, el enfoque isoeléctrico en geles de poliacrilamida demostró que la preparación de OTC estaba formada por varias especies, todas ellas con actividad enzimática y, muy probablemente, provenientes de la hidrólisis de grupos amida en subunidades que eran en origen idénticas. Esta población heterogénea estaba presente en cantidades progresivamente decrecientes conforme aumentaba la carga negativa neta, y tenían puntos isoeléctricos acordes con la interpretación dada (pI del componente principal 6,8). Además, cuando se separaron mediante técnicas cromatográficas (379) se demostró que todas tenían la misma actividad específica. Por otra parte, en todos los casos se pudo recuperar cuantitativamente a partir de los extremos amino y carboxiterminales, asparragina y lisina-fenilalanina respectivamente, demostrando que la falta de homogeneidad no era debida a proteolisis.

La enzima forma complejos binarios muy estables con carbamil fosfato, pero no con ornitina ( $K_d > 5 \text{ mM}$ ), ni con su inhibidor competitivo, la norvalina. La unión del carbamil fosfato es un proceso completamente reversible y que no va acompañado de su hidrólisis o de la carbamitación de la enzima, resultados que coinciden con los que ya describiera Reichard para la enzima de rata, al observar que ésta no catalizaba un intercambio entre carbamil fosfato y [ $^{14}\text{C}$ ] citrulina (527).

En presencia de norvalina, el carbamil fosfato se une más fuertemente que en el complejo binario, permitiendo por tanto medir la estequiometría del enlace directamente. Los resultados que se obtuvieron - 1 mol de carbamil fosfato unido por cada 38.000 g - indicaban un lugar de enlace por cada subunidad. Las curvas de valoración para el enlace del carbamil fosfato presentaron, tanto en presencia como en ausencia de norvalina, más de un punto de inflexión, y fue necesario hacer uso de, por lo menos, tres constantes de disociación para interpretar los resultados, probablemente debido a una interacción anticooperativa entre los centros activos. Por otra parte, los resultados de la unión de norvalina en presencia de carbamil fosfato dan lugar a una sola constante de disociación, que a pH 7,9 es de  $20 \mu\text{M}$ . La ornitina, pero no la norvalina, es capaz de unirse al complejo que forman la enzima y el fosfato inorgánico.

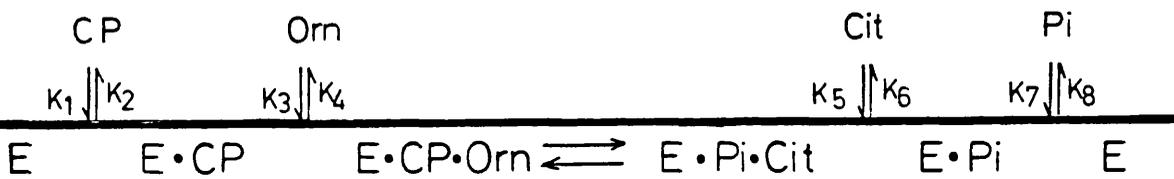
Los estudios cinéticos con la enzima bovina se realizaron a 25° C y la determinación de  $V_m$  y  $K_d_{ORN}$  se realizó a concentraciones saturantes de carbamil fosfato y en función del pH.  $K_d_{ORN}$  varía con el pH y de forma muy similar a la variación en la concentración de las formas isoelectricas de la ornitina. Snodgrass obtuvo esencialmente los mismos resultados con la enzima humana (605). Si la forma reactiva de la ornitina es aquella cuya carga neta es 0, ésta debe ser, muy probablemente, aquella que presenta el grupo  $\delta$ -amino sin ionizar (10 % del total de la forma isoelectrica), ya que solamente son efectivos como inhibidores competitivos aquellos análogos que presentan un grupo  $\alpha$ -amino cargado (381).  $K_d_{CP}$  disminuye conforme lo hace el pH. La variación de la velocidad máxima se ajusta a la de una curva de valoración para un grupo que posea un  $pK = 6,65$ .

El fosfato inorgánico es un inhibidor competitivo con respecto al carbamil fosfato, bien a través del complejo binario enzima-fosfato, bien a través del complejo terciario enzima-fosfato-ornitina, el cual predomina a altas concentraciones de ornitina. El enlace ordenado y secuencial de los substratos ha dado lugar al mecanismo propuesto en la Figura 2.

La combinación del efecto inhibidor de la ornitina y del enorme desplazamiento del equilibrio en la dirección de síntesis de citrulina ( $K_{Eq} = [cit] [HPO_4^{2-}] / [Orn^+] [CP]$  es 7 mM a 25° C y, por tanto, a pH 7,9 tendremos que:  $K_{pp Eq} = 6 \cdot 10^5$ ) han hecho muy difícil el estudio de la reacción inversa. Sin embargo, la arsenolisis de la citrulina, que fue descubierta por Grisolfá y Marshall (226) con la OTC de hígado de rata, se ha utilizado como método clínico para ensayar la enzima (528).

A pH 8 ningún análogo de la ornitina de los que se han ensayado, incluyendo el ácido L-2,4-diaminobutírico, L-lisina y D-ornitina, se carbamila. Sin embargo, a pH > 9 se sintetiza, aunque muy lentamente, homocitrulina a partir de lisina. Grisolfá y Harmon (221) demostraron, utilizando una preparación cruda de la enzima de rata, síntesis de  $\delta$ -N-acetilornitina a partir de L-ornitina y acetil fosfato. Este es capaz de substituir como substrato al carbamil fosfato, aunque no es un inhibidor efectivo del mismo a altas concentraciones de ornitina, muy probablemente debido a que no proporciona un lugar adecuado para la misma.

La OTC de hígado bovino contiene tres clases de grupos sulfhidrilo, cuya estequiometría indica la existencia de un grupo de cada clase por subunidad (382). Los residuos SH de la primera categoría, denominada " no esencial ", se caracterizan por reaccionar rápidamente sin afectar a la actividad enzimática y son fácilmente oxidados, dando lugar a la formación de dímeros. Los residuos de la segunda categoría, denominados " esenciales ", reaccionan de forma mucho más lenta y selectiva que los " no esenciales ", dando lugar a una pérdida de la actividad que es totalmente evitable por la presencia de carbamil fosfato; también se pueden proteger, de manera reversible, por oxidación con cistamina. Los residuos de la tercera categoría, denominados



**FIGURA 2.- MECANISMO DE LA REACCION CATALIZADA POR LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.**

**E:** Enzima; **CP:** Carbamil fosfato; **Orn:** Ornitina; **Cit:** Citrulina; **Pi:** Fosfato inórganico.

" inmersos ", solo reaccionan en presencia de agentes desnaturalizantes. Además, se han determinado las posiciones aproximadas de los residuos de cisteína en la estructura primaria de la enzima y se ha identificado la cisteína " esencial " (ver Figura 3).

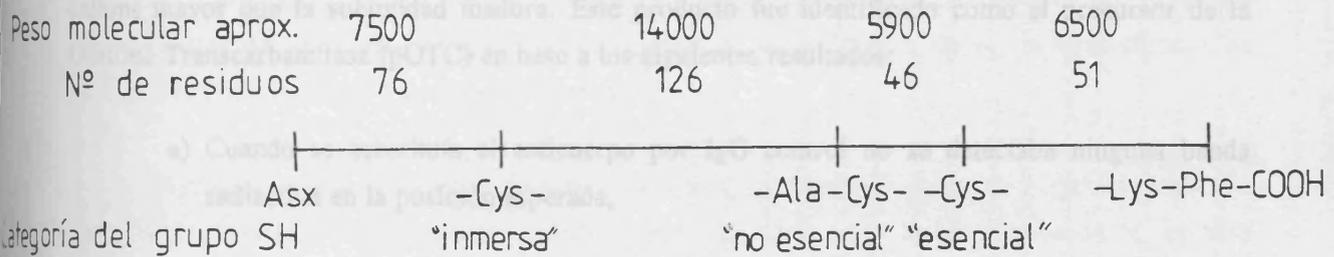
El fosfato de piridoxal - que origina de forma selectiva bases de Schiff con residuos de lisinas que se encuentran en los centros activos de las enzimas que utilizan organofosfatos como sustratos (102) - reacciona con un residuo de lisina situado en el fragmento peptídico aminoterminal de 76 residuos, dando lugar a un derivado que es totalmente inactivo (383). La presencia de carbamil fosfato en concentraciones saturantes evita dicha inactivación, indicando que esa lisina " esencial ", que se encuentra en un entorno hidrofóbico, es parte del lugar de enlace del carbamil fosfato o se encuentra junto al sitio de unión del grupo fosforilo que está constituido, principalmente, por un residuo de arginina excepcionalmente reactivo. Tanto la lisina - que reacciona específicamente con el fosfato de piridoxal - como la arginina - que reacciona con butanodiona y fenil-glioxal, dando lugar a derivados también inactivos - se encuentran junto al grupo sulfhidrilo " esencial " en la estructura cuaternaria de la enzima, pues al bloquear éste con p-hidroximercuribenzoato se evita la formación de cualquiera de los derivados inactivos, aunque los grupos lisina y sulfhidrilo se encuentran en los extremos opuestos de la cadena polipeptídica (384-387).

#### 1.14.4.- ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HÍGADO DE RATA.

Las propiedades físicas de esta enzima son muy similares a las de origen humano, bovino o de ratón. A pesar de que, en un principio, también se describieron para las enzimas bovina y de rata cinéticas que no corresponden a la simple ecuación de Michaelis-Menten (265, 380), más adelante se comprobó que la enzima de rata sí que respondía a esta ecuación, incluso a muy altas concentraciones de carbamil fosfato (267, 375). Además, se ha postulado la existencia de un factor en el hígado de rata responsable de esta falta de correspondencia con la ecuación de Michaelis-Menten (267). Análogamente a lo que sucede con la enzima bovina, no parece estar regulada su actividad por modificaciones alostéricas, sino por las concentraciones mitocondriales de carbamil fosfato y ornitina (375). Sin embargo, muy recientemente se ha demostrado que la proteína hepática que une con mayor afinidad cadmio es la OTC (19, 20). El cadmio es un agente citotóxico que se acumula principalmente en hígado y riñón, e intracelularmente se concentra sobre todo en la mitocondria (444). Por tanto, aunque su mecanismo de toxicidad no se conoce, parece que la OTC constituye el blanco de su acción, pues inhibe fuertemente su actividad, así como la producción de urea en hepatocitos cultivados (20)

En los últimos diez años se ha trabajado intensamente en la ruta biosintética de esta proteína, pues constituye, como vamos a ver a continuación, un magnífico modelo para el estudio de las enzimas mitocondriales y de la biogénesis mitocondrial.

Se comenzó por llevar a cabo la síntesis de la GTC de hígado de rata en un sistema libre de células, o sea *in vitro*, con objeto de determinar el tamaño del producto primario resultante de la traducción del correspondiente mRNA (104, 425). Para ello se tradujo, en un lisado de hepatocitos de conejo tratado con metilazina, el rRNA total o poli (A)<sup>+</sup> o rRNA de hígado de rata y en presencia de [<sup>35</sup>S] metionina. El polipéptido sintetizado se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo específico contra la enzima madura y células de *Staphylococcus aureus* portadoras de anticuerpo A. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en gels de poliacrilamida/SDS, y posterior fluorografía. Se encontró que el producto de la síntesis se despiézaba más lentamente que la subunidad de la enzima madura. El tamaño aparente era de 39,400 daltons, es decir, 3,400



**FIGURA 3.- SITUACION APROXIMADA DE LAS CISTEINAS EN LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA BOVINA.**

En los últimos doce años se ha trabajado intensamente en la ruta biosintética de esta proteína, pues constituye, como vamos a ver a continuación, un magnífico modelo para el estudio de las enzimas mitocondriales y de la biogénesis mitocondrial.

Se comenzó por llevar a cabo la síntesis de la OTC de hígado de rata en un sistema libre de células, o sea *in vitro*, con objeto de determinar el tamaño del producto primario resultante de la traducción del correspondiente mRNA (104, 425). Para ello se tradujo, en un lisado de reticulocitos de conejo tratado con nucleasa, el RNA total o poli (A)<sup>+</sup> H<sup>+</sup> RNA de hígado de rata y en presencia de [<sup>35</sup>S] metionina. El polipéptido sintetizado se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo específico contra la enzima madura y células de *Staphylococcus aureus* portadoras de proteína A. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS, y posterior fluorografía. Se encontró que el producto de la síntesis se desplazaba más lentamente que la subunidad de la enzima madura. El tamaño aparente era de 39.400 daltons, es decir, 3.400 daltons mayor que la subunidad madura. Este producto fue identificado como el precursor de la Ornitina Transcarbamilasa (pOTC) en base a los siguientes resultados:

- a) Cuando se sustituía el anticuerpo por IgG control no se detectaba ninguna banda radiactiva en la posición esperada,
- b) Se obtuvo el mismo producto utilizando el sistema de traducción del germen de trigo,
- c) La enzima madura competía, de forma efectiva, con el precursor por el anticuerpo,
- d) El precursor producía fragmentos proteolíticos similares a los de la enzima madura.

Todos estos resultados indican que la Ornitina Transcarbamilasa es inicialmente sintetizada en forma de un precursor de mayor tamaño, el cual debe ser transportado al interior de la mitocondria y procesado proteolíticamente para dar lugar a la forma madura de la enzima. Estudios anteriores a la obtención de estos resultados ya habían demostrado que muchas de las proteínas mitocondriales, tanto de la matriz como de la membrana interna, del espacio intermembranas y de la membrana externa, de los animales superiores así como de levadura y *Neurospora*, son sintetizadas en forma de precursores de mayor peso molecular y conteniendo segmentos peptídicos extras comprendidos entre 2.000 y 6.000 daltons, que casi siempre son N-terminales (para una revisión consultar las refs. 469 y 658).

No obstante, las proteínas mitocondriales se distribuyen en cuatro compartimientos (membranas interna y externa, matriz y espacio intermembranas), para lo cual no sólo es necesaria

la presencia del péptido señal, sino probablemente también la existencia de otro(s) dominio(s) de la proteína, distante(s) del primero, que lleva(n) la información necesaria para decidir la distribución de la proteína en cuestión dentro de la mitocondria, y que parece(n) funcionar como señal(es) de parada de transferencia, por lo que las proteínas de la matriz carecerían de ellos (467).

Polisomas libres y unidos a membranas de hígado de rata fueron incubados de forma separada y los productos resultantes ensayados en busca de síntesis de albúmina y pOTC (432). Los polisomas unidos a membranas incorporaron el 1,2 % de la radiactividad total  $Cl_3AcOH$ -insoluble en la albúmina (probablemente prealbúmina), mientras que los polisomas libres sólo incorporaron el 0,06 %, confirmando la especificidad de los polisomas unidos a membranas para la traducción de dicha proteína. Por el contrario, la incorporación de radiactividad de pOTC, fue en promedio 8 veces superior con polisomas libres que con los unidos a membranas. Se obtuvieron resultados similares utilizando el RNA total de polisomas libres y polisomas unidos a membranas. Todo ello indica que la OTC se sintetiza de forma preferencial, y muy probablemente de forma exclusiva, en polisomas libres. Estos resultados concuerdan con otros muchos que indican que las proteínas mitocondriales de los animales superiores se sintetizan en polisomas libres, aunque algunas se pueden sintetizar en ambas clases de polisomas.

También se pudo detectar el precursor de la enzima utilizando cortes de hígado de rata. Un posterior fraccionamiento subcelular, demostró que dicho precursor se encontraba en la fracción citosólica. Por otra parte, la enzima madura marcada se encontraba de forma casi exclusiva en la fracción mitocondrial, siendo la radiactividad específica del pOTC en la fracción citosólica mucho mayor que la de la enzima madura en la fracción mitocondrial. En experimentos de pulso y caza el precursor desaparecía rápidamente del citosol.

Se llevaron a cabo estudios cinéticos más detallados acerca de la síntesis, transporte intracelular y procesado del pOTC, utilizando hepatocitos de rata (428). Estos se incubaron con [ $^{35}S$ ] metionina durante diversos tiempos y fueron, posteriormente, divididos en dos fracciones: la citosólica y la particulada. El precursor sólo se encontró en la fracción citosólica, y la radiactividad que incorporaba aumentaba de forma lineal durante los primeros diez minutos, y luego más lentamente hasta alcanzar un máximo entre los diez y veinte minutos de pulso. Asimismo, la enzima madura sólo se encontraba en la fracción cruda mitocondrial, y tardaba algunos minutos en incorporar radiactividad, la cual aumentaba, posteriormente, de forma casi lineal con el tiempo. El precursor marcado mediante un pulso desaparecía del citosol, de forma casi completa, tras diez minutos de la posterior caza, y presentaba una vida media aparente entre uno y dos minutos. Estos resultados indican que la OTC se sintetiza en forma de un precursor de mayor tamaño que existe en un "pool" citosólico, a partir del cual es transportado al interior de la mitocondria, con una vida

media entre uno y dos minutos, donde es procesado a la forma madura al mismo tiempo que que se transporta o inmediatamente después.

Se han obtenido resultados similares para la Carbamil Fosfato Sintetasa I (522), la primera enzima en la síntesis de urea y que también se encuentra localizada en la matriz. Estos datos contrastan con los obtenidos para la  $\delta$ -Aminolevulinato Sintetasa (700), otra enzima de la matriz mitocondrial para la que, bajo condiciones en las que es enormemente inducida su síntesis, se observa cómo una gran cantidad del precursor se acumula en la fracción citosólica y es subsiguientemente transferida a la mitocondria.

Marcando el precursor en el extremo amino-terminal con N-formil [ $^{35}$ S] metionina, y procesándolo por medio de mitocondrias, no se encontró radiactividad alguna en la enzima madura. Esto demuestra que el fragmento peptídico extra, que es característico del precursor y que se elimina durante su procesado mitocondrial, es una extensión del extremo aminoterminal (342). Además, este fragmento juega un papel crítico en el transporte del precursor hasta la mitocondria, así como en el proceso de su incorporación al interior de ésta, como veremos más adelante.

Cuando se estudia la hidrofobicidad, tanto del precursor como de la subunidad madura, por cromatografía con Octyl-Sepharose y Phenyl-Sepharose, se encuentra que ambos presentan un comportamiento muy similar (419). El punto isoeléctrico de la enzima madura, preparada al incubar el precursor con mitocondrias aisladas de hígado de rata, es de 7,2 que es un valor exactamente igual al descrito para la enzima de rata purificada (13, 375), mientras que el pI del pOTC es de 7,9. Por otra parte, diversas proteínas básicas, tales como histonas y protaminas, inhiben fuertemente la incorporación y el procesado del pOTC por mitocondrias aisladas.

Todo lo anterior sugiere que la naturaleza básica de la secuencia señal del precursor, es un requisito indispensable para una correcta interacción del pOTC con la mitocondria. Sin embargo, los últimos resultados sugieren que, aunque la carga positiva neta juega un papel crítico - muy probablemente por una interacción electrostática selectiva con el potencial de la membrana mitocondrial - no es suficiente para determinar el transporte. Más bien, la evidencia experimental apunta hacia la conformación del precursor como responsable de la traslocación; dicha conformación podría estar regulada por proteínas citosólicas (494), o bien ser modulada por la secuencia señal (493).

Cuando se someten tanto el precursor como la enzima madura a centrifugación en gradientes de sacarosa (418), aquella sedimenta con un valor de 6,0S, que concuerda con el descrito anteriormente (97) y corresponde a la forma trimérica. Por otra parte, el precursor, tanto sintetizado en el sistema de reticulocitos de conejo como en el sistema de germen de trigo,

sedimenta en forma de un pico ancho con un valor de 14S. Análogamente, el precursor de la CPS I también sedimenta con un valor de 13S mayor que el de la enzima madura, 7,8S.

Estos estudios sobre el estado de agregación del pOTC se complementaron con análisis por filtración sobre gel. Mientras que la enzima madura elufa en una columna de Sephacryl S-200 con un peso molecular aparente de 110.000, alrededor de la mitad del precursor aparecía en el volumen vacío de la columna, y la porción restante elufa en forma de un ancho pico cuyo peso molecular aparente era de 400.000 (169). En los mismos experimentos, la CPS I elufa con un peso molecular de 150.000, mientras que más de la mitad de su precursor era eluído con el volumen vacío. Todos estos resultados indican que los precursores sintetizados *in vitro* forman, bajo las condiciones empleadas, agregados de un tamaño superior al de sus respectivas enzimas maduras. Es probable que estos agregados sean homooligómeros más que complejos formados con otras proteínas, puesto que el pOTC sintetizado en dos sistemas libres de células diferentes sedimentaba de forma semejante. De cualquier forma, los datos presentados nada indican sobre si los precursores existen en dichos estados de agregación en el interior de la célula. En este sentido, Zimmermann y Neupert (711) demostraron que, en *Neurospora*, el transportador de ADP/ATP, proteína de la membrana interna mitocondrial, se encuentra en forma de un complejo oligomérico, a pesar de que no se sintetiza en forma de un precursor de mayor peso molecular. En cualquier caso, sí que parece claro que los precursores tienen conformaciones diferentes de las que poseen sus respectivas enzimas maduras. Esta conclusión se ve apoyada por algunas diferencias descritas entre el pOTC y su correspondiente enzima madura. Así, aquél es más susceptible al ataque por proteasas que ésta (424), y se han encontrado diferencias en la antigenicidad de ambos al trabajar con detergentes iónicos (342).

El pOTC sintetizado *in vitro*, es convertido en la forma madura de la enzima por mitocondrias aisladas de hígado de rata (105, 342, 425, 426, 429, 430, 627). Además de la forma madura, se observa la formación de un producto intermedio de 37.000 daltons (iOTC), que se produce por un corte entre los residuos de aminoácidos 24 y 25 del péptido señal. La forma madura se recupera exclusivamente en las mitocondrias una vez sedimentada, y no se puede extraer con KCl 1 M, pero sí con digitonina. La concentración de ésta que se necesita es mayor que la requerida para extraer la enzima Adelinato Kinasa, perteneciente al espacio intermembranas, pero menor que para la Ornitina Transcarbamilasa endógena (92, 284, 429). Estos resultados indican que el precursor de la OTC es transportado al interior de mitocondrias aisladas, aunque no totalmente hasta la matriz, y en asociación con un procesado proteolítico que da lugar a la enzima madura. Este proceso no se ve afectado por la presencia de la misma (425). El transporte al interior de la mitocondria se confirma mediante la pérdida de susceptibilidad del producto de la síntesis, una vez procesado, a la adición de proteasas exógenas (425, 430).

También se han estudiado los requerimientos energéticos para el transporte del pOTC (424, 429, 430). Desacopladores de la fosforilación oxidativa, tales como el dinitrofenol y el carbonilcianuro 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) e ionóforos tales como la valinomicina y nonactina, inhibían fuertemente el transporte y procesado. La inhibición por FCCP no era reversible por adición de ATP más oligomicina, en las condiciones en las que el ATP puede entrar en la mitocondria y ser utilizado. Por otra parte, ni KCN,  $\text{NaN}_3$ , antimicina A ni oligomicina presentaban efecto inhibitorio. Sin embargo, el transporte y procesado se inhibían fuertemente cuando, junto con oligomicina, se añadía o bien KCN o bien antimicina A. Estas condiciones inhiben la formación de un potencial de membrana, bien por transporte de electrones, bien por ATP. Estos resultados sugieren que el potencial de membrana es el que aporta, de forma directa, la energía para el transporte y procesado del pOTC. Probablemente, el paso dependiente de energía sea el transporte antes que el procesado, puesto que el pOTC se recupera de forma casi exclusiva en el medio tras la incubación con mitocondrias y en presencia de desacopladores o ionóforos. Existen datos análogos para las proteínas mitocondriales de *Neurospora* (577), y contradictorios para los precursores de las proteínas mitocondriales de levadura, cuyo transporte y/o procesado parece depender de ATP (462). Asimismo, se ha descrito que la Rodamina 123, un colorante láser fluorescente que tiñe de forma selectiva las mitocondrias de células vivas (294), inhibe bien la unión de los precursores de OTC y CPS I, o bien su transporte al interior de la mitocondria (431).

Aunque vemos que el proceso de biogénesis mitocondrial está bastante estudiado, no ocurre igual con la maquinaria biológica responsable de llevarlo a cabo. Además de los receptores mitocondriales, del aparato de traslocación y de las proteasas responsables del procesado, se ha encontrado que existen varios componentes pertenecientes a la mezcla que forma el sistema de traducción libre de células, para un transporte y procesado óptimo del pOTC. Uno de los factores es el ion potasio, cuya concentración óptima se encuentra alrededor de 120 mM, y que no puede ser reemplazado por el ion sodio. Un segundo factor es el ion magnesio, cuya concentración debe hallarse alrededor de 1,6 mM, e igualmente otros iones metálicos divalentes carecen de efectividad. Otro factor contenido en el lisado de eritrocitos de conejo no es dializable, y se inactiva totalmente por un tratamiento térmico a 100° C durante dos minutos, o mediante la adición de tripsina. También sirve un lisado de eritrocitos de conejo, pero no la hemoglobina. Finalmente, un cuarto factor parece ser un componente sensible a un tratamiento con RNAsa - en concentraciones tan altas como las que se necesitan para atacar moléculas de RNA asociado a proteínas - y que se encuentra unido o como parte integrante del complejo de alto peso molecular que forma el precursor. Se ha sugerido que este componente puede ser una ribonucleoproteína citoplasmática que contenga el 7SL RNA (169).

Resultados más recientes demuestran que existen al menos dos actividades solubles e independientes, que resultan importantes en el transporte de los precursores de las proteínas

mitocondriales: un factor denominado HSF (518) que es estable al calor, pero sensible a N-etilmaleimida (NEM); y otro denominado hsp70 (128) que pertenece a la familia de las proteínas inducidas por choque térmico, tiene un peso molecular cercano a 70.000 y parece emplear ATP. A partir del lisado de reticulocitos de conejo, se ha purificado un factor de unión a presecuencias (447), denominado PBF, y consistente en una proteína oligomérica de peso molecular 390.000 formada por subunidades idénticas de unos 50 kDa. Este factor, que es capaz de formar un complejo con el pOTC, pero no con OTC madura, y que estimula en gran medida el transporte, parece ser el responsable de mantener al pOTC en una conformación competente para el transporte y, además, ve aumentada su estimulación por la adición de hsp70. Queda, sin embargo, por aclarar si los diferentes factores proteicos descritos, HSF, PBF y otro de peso molecular 200.000 (486), que también se purificó a partir de un lisado de reticulocitos de conejo y que se unía al precursor de la Ornitina Aminotransferasa, son o no la misma proteína. Asimismo, la espermidina y la espermina, en concentraciones que se encuentran dentro del rango fisiológico de estas poliaminas, estimulan el transporte del precursor de la OTC al interior de la mitocondria (203, 415). Este efecto se ha observado tanto al utilizar lisados de reticulocitos, como sobrenadantes postmitocondriales de hígado de rata, que resultan tan efectivos como aquéllos (415).

Mitocondrias procedentes de otros tejidos no hepáticos de la rata, tales como el riñón, bazo, corazón y células ascíticas, todas las cuales carecen de OTC, son capaces de incorporar y procesar a la forma madura el pOTC. Incluso la mitocondria hepática de una paloma, animal uricotélico que también carece de OTC, es capaz de realizar el mismo proceso. Todo ello parece indicar que el sistema de transporte y procesado es, muy probablemente, común a más de un precursor y que se encuentra altamente conservado en mamíferos, pájaros y anfibios, puesto que mitocondrias de hígado de rana y de ratón también son capaces de llevar a cabo el proceso (424). Además, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que el apocitocromo c, precursor citosólico del Citocromo c, compite con el pOTC por la entrada en la mitocondria (202). Sin embargo, también existen múltiples resultados experimentales que demuestran que el sistema de transporte presenta especificidad en cuanto orgánulos y también entre diversos organismos (para un revisión consultar la ref. 309).

La conversión a la enzima madura es fuertemente inhibida por quimostatina, N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TosLysCH<sub>2</sub>Cl), L-1-tosilamido-2-feniletilclorometil cetona (TosPheCH<sub>2</sub>Cl) y o-fenantrolina, y de forma moderada por leupeptina, ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica) (EDTA) y globomicina. La inhibición por EDTA y o-fenantrolina parece deberse a su efecto quelante sobre los iones magnesio. El transporte queda totalmente bloqueado cuando se adiciona un péptido sintético que contiene los primeros 27 aminoácidos del pOTC, inhibiéndose también la entrada de otros precursores de proteínas de la matriz o de la membrana interna mitocondriales (193).

Es necesario el uso de mitocondrias con un alto grado de integridad para que se produzca el procesado del precursor. Cuando se someten las mitocondrias hepáticas a una ruptura por sonicación, se pierde la capacidad de formar la enzima madura, mientras que se aumenta la actividad que produce la forma intermedia de 37.000 daltons. Se obtienen resultados similares cuando se rompe la mitocondria mediante Triton X-100 o deoxicolato sódico, ambos al 1 %. En este sentido, se ha demostrado que el péptido sintético que contiene los 27 primeros aminoácidos del pOTC interacciona específicamente con un polipéptido, situado en la membrana externa mitocondrial, que se ha denominado p30 (192).

Al fraccionar la mitocondria, se encuentra que la proteasa responsable de la formación del producto intermedio se localiza de forma principal en la matriz y parcialmente en el espacio intermembranas (426). Esta proteasa se ha purificado 140 veces a partir de la matriz (416, 417). Su peso molecular se ha calculado en 108.000, y presenta un punto isoeléctrico aparente de 5,5. Tiene un pH óptimo de actividad entre 7,5 y 8,0 al utilizar como sustrato el pOTC, y no se ve inhibida por la presencia de la enzima madura. El patrón de inhibición que presenta difiere del que se encuentra para el procesado del precursor por mitocondrias aisladas. Esta proteasa no corta a ninguna otra proteína o péptido ensayado, incluidos los precursores de las proteínas de secreción, que también contienen un péptido señal, ni tampoco al precursor de la CPS I. Sin embargo, esta proteasa es capaz de convertir el precursor de la Serina Piruvato Transaminasa, en una forma aparentemente madura de la enzima. Böhni et al. (66), también han identificado y purificado parcialmente una proteasa responsable del procesado de los precursores de las proteínas mitocondriales de levadura y de hígado de rata, que es muy similar a la anteriormente descrita.

Conboy et al. (103), han localizado y estudiado una proteasa mitocondrial, diferente de la descrita por Mori et al. y que acabamos de comentar, que procesa el pOTC y lo convierte en la subunidad madura. La principal característica de esta proteasa es su dependencia de iones cinc (se necesita 0,1 mM de  $Zn^{2+}$  para alcanzar la máxima actividad catalítica) y en concentraciones dentro del rango fisiológico descrito para este catión divalente.

Además de la diferencia en cuanto a la especificidad para el lugar de corte de ambas proteasas, sus actividades también se distribuyen de forma diferente entre las distintas subfracciones mitocondriales, así como poseen requerimientos marcadamente dispares de iones metálicos. Posteriormente, se cuestionó si la forma intermedia del precursor, que se obtiene de forma constante, y la proteasa responsable del origen de aquella, poseen algún significado o papel biológico (24). Se puso en duda la participación real de la proteasa descrita por Mori et al., en el transporte y procesado del pOTC debido a que:

- a) La forma intermedia sigue siendo susceptible a proteasas exógenas, bajo condiciones en las que la enzima totalmente procesada se encuentra protegida.
- b) Esta forma no cosedimenta con las mitocondrias una vez realizados los ensayos *in vitro*.
- c) No se detecta en el interior de la mitocondria ninguna "caza" cuando este polipéptido intermedio se recupera después de un ensayo *in vitro* y se añade a una preparación fresca de mitocondrias.

Todas estas observaciones, a veces contradictorias, han sido finalmente aclaradas por Kalousek et al. (302) al purificar parcialmente y caracterizar las dos actividades proteolíticas responsables de la formación de la forma intermedia y de la forma madura de las subunidades de la OTC. La principal diferencia entre ambas proteasas I y II, estriba en que la segunda es inhibida por EDTA e inactivada por NEM. Además, la proteasa I es capaz de procesar a su forma madura al precursor de la Propionil-CoA Carboxilasa, mientras que la proteasa II sólo es capaz de convertir a la forma madura las dos especies intermedias de las dos únicas enzimas para las que se ha podido demostrar la existencia de dicha forma intermedia de sus precursores: la Ornitina Transcarbamilasa y la Mállico Deshidrogenasa. También se ha purificado de *Neurospora crassa* (249) una proteasa que procesa proteínas de la matriz mitocondrial, y que necesita, además, la presencia de otras dos proteínas, de 52.000 y 57.000 daltons, respectivamente; esta proteasa parece desempeñar las mismas funciones que la proteasa I de la matriz mitocondrial de hígado de rata.

El último paso en la biogénesis de la enzima madura consiste en el ensamblaje de las subunidades para dar origen a la enzima homotrimérica. Se ha demostrado que las formas oligoméricas del pOTC, una vez procesadas *in vitro* por una preparación de mitocondrias intactas, dan lugar al ensamblaje de las subunidades maduras recién incorporadas, cosa que no ocurre cuando el procesado se realiza mediante una fracción de la matriz mitocondrial, aún cuando se produzcan grandes cantidades de monómero (303). Esto puede significar que la concentración crítica de las subunidades maduras sólo se alcanza cuando el pOTC se procesa por mitocondrias intactas, y no en las condiciones mucho más diluidas que se presentan cuando se utiliza una fracción soluble de matriz. También es posible que sea necesaria la estructura tridimensional de la mitocondria intacta, la cual, a través de sus membranas y espacios, proporcione un andamiaje adecuado para el reconocimiento y ensamblado de las subunidades maduras; alternativamente, éstas pueden adoptar una nueva estructura tridimensional, absolutamente esencial para formar el trímero, al atravesar las membranas mitocondriales. Por otra parte, a través de la construcción de proteínas híbridas entre pOTC o pCPS I y proteínas citosólicas (465), y el análisis de deleciones y mutagénesis dirigida del pOTC (270), se ha comprobado que, si bien el péptido señal es suficiente



para dirigir una proteína a la mitocondria, también juega un papel la secuencia o la estructura conformacional del polipéptido maduro a la hora de atravesar las membranas mitocondriales, probablemente porque la proteasa responsable del procesado posea una especificidad que se extienda más allá del sitio de corte (465).

En relación con la estructura y conformación del péptido señal de la OTC y la información contenida en ambas, se han realizado últimamente muchos estudios con ayuda de la ingeniería genética. Así, mediante mutaciones de todo tipo (delecciones, sustituciones o construcción de secuencias artificiales) se ha podido realizar un rápido análisis *in vitro* de los elementos críticos de la secuencia señal. La región del péptido señal que contiene los diez primeros residuos es la más conservada entre diferentes especies, aunque se ha podido comprobar que no es suficiente para dirigir al pOTC a la mitocondria (345). Se ha demostrado que la secuencia entre las posiciones 11-15: Ala - Ala - Leu - Arg - Lys, es esencial para la unión del pOTC a la mitocondria (91, 92), y que la leucina desempeña un papel crítico (92, 93, 602). No obstante, los residuos de leucina de las posiciones 2, 5, 8 y 9 también son muy importantes, pues proporcionan una estructura secundaria en forma de hélice  $\alpha$  crucial para la incorporación del pOTC y su procesado a la forma intermedia (345). Alternativamente, también se ha sugerido que el péptido señal puede sufrir cambios conformacionales durante su interacción con una proteína que estimula el procesado, y cuya aparente función es la de presentar el precursor a la proteasa (249). De hecho, la existencia de una estructura específica parece más importante que la presencia de una determinada secuencia, pues la sustitución de la arginina-15 por una glicina bloquea el transporte (270), mientras que una delección del pentapéptido situado entre los residuos 15 a 19, no produce este efecto (369).

El residuo de arginina en la posición 23 y la región a su alrededor, son trascendentales para un correcto procesado, pues una delección entre los residuos 22 y 30 (466), la sustitución de dicha arginina-23 (627) o la sustitución de la asparragina-24 o de la arginina-26 (271), bloquean la formación de la OTC madura.

Sin embargo, el análisis *in vivo* de diversos mutantes del pOTC ha resultado contradictorio con respecto a algunos resultados de los estudios *in vitro*, aunque ha permitido aclarar otros aspectos del proceso de la biogénesis mitocondrial. Así, se ha demostrado que un mutante del pOTC de rata, portador de una delección de los residuos 20 a 26 de su secuencia señal, es procesado *in vitro* a una forma de peso molecular similar a la iOTC (210) - aunque no puede ser la misma, pues el sitio de corte que origina la verdadera iOTC ha desaparecido - e importado al interior de la mitocondria. Células humanas de fibrosarcoma, transformadas con un plásmido portador de la anterior construcción, presentan actividad enzimática de OTC, lo que indica que se ha producido un ensamblaje de subunidades que da origen a una enzima mutante, pero catalíticamente activa. Por tanto, una delección que produce un procesado incorrecto, no afecta a la

unión al orgánulo, a la traslocación de la proteína ni a la constitución del homotrímero activo. Sin embargo, la proteína mutante, aunque activa, resulta ser mucho más susceptible a la degradación proteolítica (210).

Por otra parte, se ha estudiado el comportamiento de otro grupo de precursores mutantes en células HeLa (284). Estos mutantes son: dos con sustituciones de residuos (glicina por la arginina-23, y glicinas por las argininas 15, 23 y 26), y otros dos portadores de deleciones (uno carente de los residuos 8 al 22 y otro sin los residuos 17 al 32). En experimentos *in vitro*, ninguno de ellos son transportados por mitocondrias ni procesados proteolíticamente por preparaciones de matriz mitocondrial. En concordancia con estos resultados, ninguno de estos mutantes son procesados a las especies intermedia o madura de la OTC en las células en cultivo. Sin embargo, el precursor mutante con un residuo de glicina en lugar de la arginina-23, sí que es transportado al interior de la matriz mitocondrial, aunque no produce ningún trímero activo y es rápidamente degradado ( $t_{1/2} < 4$  horas). Es decir, *in vivo* no es preciso el procesado para que se produzca el transporte, aunque sí que lo es para el ensamblaje de la enzima catalíticamente activa. Además, también parece deducirse que los sistemas *in vitro* son deficientes en algún componente del proceso global, hipótesis que se ve apoyada por la observación de que entre el 20 y el 50 % del precursor nativo no se convierte en la enzima madura utilizando sistemas *in vitro*, frente al 100 % *in vivo* (284).

En cualquier caso, sí que se ha demostrado, mediante experimentos de inhibición *in vitro* con péptidos señal sintéticos, nativos o mutantes, que en ellos reside la información necesaria para la unión, transporte y procesado de los precursores al interior de la mitocondria (93). Ahora bien, aunque el precursor contenga la información requerida, no es el péptido señal el único elemento que participa en el transporte hasta la mitocondria, por varias razones. En primer lugar, la presecuencia *per se* no es capaz de evitar que la porción madura del pOTC se pliegue y adquiera su estructura tridimensional, ya que se ha demostrado (448) que se pueden obtener trimeros enzimáticamente activos a partir del pOTC desnaturalizado. Por otra parte, están los distintos factores proteicos (128, 169, 447, 486, 518) que estimulan el proceso de transporte de los precursores y también se postula la existencia de receptores de los precursores que estarían situados en la membrana externa mitocondrial (284, 658).

### 1.15.- NIVEL MITOCONDRIAL DE LA OTC.

El nivel mitocondrial de la OTC depende de las velocidades relativas de síntesis y degradación de dicha enzima. Schimke demostró que, en la rata, las actividades de las enzimas empleadas en la biosíntesis de urea, aumentaban de forma coordinada conforme lo hacía la cantidad de proteína incorporada a la dieta (571-573). Por otra parte, una alimentación exenta de proteína

conducía a una disminución de dichas actividades enzimáticas, mientras que el ayuno provocaba un aumento. También se han encontrado cambios similares de adaptación al contenido de proteína de la dieta en primates (476). Se ha demostrado que todos estos cambios se deben a variaciones en la cantidad de proteína por peso de hígado (405, 427, 446, 574, 643).

Nicoletti et al. (468), utilizando la técnica del doble isótopo, han calculado que la vida media de la CPS I de rata se encuentra alrededor de 7,7 días para una dieta normal, 3,3 días para una dieta con un alto contenido de proteína y 4,6 días para una dieta totalmente carente de proteína. Estudios llevados a cabo con preparaciones hepáticas de *Rana catesbeiana* dan una vida media para la CPS I alrededor de 3,5 y 2,3 días, en ausencia y presencia de tiroxina respectivamente (591). Utilizando el mismo sistema anfibio, se ha calculado que la vida media de la OTC se encuentra alrededor de cuatro días, aunque en este caso no se han presentado ni documentado tales resultados (99).

Se han determinado los efectos que, sobre los niveles de mRNA traducibles de la CPS I y OTC, tiene el contenido proteico de la dieta (427). Las ratas alimentadas con una dieta de alto contenido proteico, presentan mayores niveles hepáticos de mRNA traducible de ambas enzimas que en el caso de los animales sometidos a una dieta de bajo contenido proteico. Las diferencias en los niveles de mRNA se correlacionan muy bien con los niveles de la actividad enzimática y de cantidad de proteína. Estos resultados indican que los cambios, dependientes del contenido proteico de la dieta, en los niveles de CPS I y OTC se deben principalmente a cambios en los niveles de mRNA traducible de estas enzimas. Por el contrario, se ha visto que el incremento en la actividad de estas enzimas que se observa en animales sometidos a ayuno, va asociado con una disminución de su velocidad de degradación, antes que a un aumento de su velocidad de síntesis.

También se ha demostrado que los niveles de actividad de la CPS I y de la OTC, en ratones portadores de tumores, están disminuidos así como las correspondientes cantidades de proteína enzimática y que dicha disminución se debe a un descenso en los niveles de sus mRNA traducibles (28).

Las actividades de OTC en el intestino delgado, se encuentran entre el 10 y el 20 % de las hepáticas, dependiendo de si la muestra analizada es la mucosa intestinal o el intestino delgado en su conjunto (143, 453, 561, 562 693). Sin embargo, cuando se comparan los niveles de expresión génica de la OTC en el hígado y la mucosa intestinal de la rata o del ratón, se encuentra que los niveles de mRNA del pOTC correspondientes al intestino delgado son aproximadamente el 50 % de los hepáticos (91, 143). Las razones de esta discrepancia se han atribuido a las siguientes causas:

- Existe un mayor contenido de proteína mitocondrial en hígado que en intestino. De hecho, determinaciones estereológicas al microscopio electrónico, encuentran que el área mitocondrial representa el 30 % del área total de las células hepáticas, mientras que en el intestino delgado es sólo del 10 % (241).
- El 90 % del tejido hepático está compuesto por hepatocitos, mientras que menos del 50 % del tejido de la mucosa intestinal está formado por células epiteliales (241).

No obstante, en intestino delgado también deben de existir otros factores de regulación distintos de los hepáticos, ya que en ratones portadores de la mutación *spf<sup>ash</sup>* (ver apartado 1.15.), los niveles de actividad de OTC en el intestino delgado no se ven tan reducidos como en el caso de los ratones normales (143).

Asimismo, durante el periodo de gestación de la rata, se ha podido demostrar la presencia en el feto del mRNA correspondiente a la OTC, que alcanza un máximo alrededor del día 20. El nivel de éste mRNA desciende abruptamente alrededor del momento del nacimiento, y vuelve a aumentar durante las dos semanas siguientes hasta alcanzar valores iguales o ligeramente superiores a los que se encuentran en la rata adulta (406). Resultados similares se han descrito en el ratón (143, 436).

Los estudios sobre la regulación de la expresión de la OTC han continuado mediante el análisis molecular de su ADN genómico. Así, el gen de rata, y el humano o el de ratón son altamente homólogos a aquel, carece de los elementos reguladores típicos, como la caja TATA o la secuencia CCAAT. No obstante, en el caso del gen procedente del hígado de ratón, primeramente se identificó una región de 800 bp junto al extremo 5' del gen, responsable de su expresión específicamente hepática (656). Con posterioridad, se han obtenido ratones transgénicos (451), portadores de una construcción que contenía el gen de la OTC de rata y 1,3 Kb de su región 5'. El gen introducido se expresó exclusivamente en hígado e intestino delgado, lo que indicaba que dicha región 5' era capaz de dirigir la transcripción del gen. Sin embargo, el nivel de expresión del gen introducido era muy inferior al de la OTC endógena del ratón. Por tanto, se concluyó que debían existir otros elementos fuera de los 1,3 Kb de la región 5', que también debían jugar un papel regulador. En estudios muy recientes (450), se ha podido comprobar que:

- La región de 1,3 Kb que flanquea el extremo 5' del gen, produce expresión selectiva de un gen sonda (se utilizó un gen híbrido que contenía parte del gen de la OTC ligado en fase con el gen de la Cloranfenicol Acetiltransferasa) en líneas celulares de hepatoma humano, pero no de ovario de hamster.

- En dicha región existen, al menos, dos elementos reguladores positivos y uno negativo en la zona de 220 bp antes del comienzo de la transcripción del gen; además, se ha comprobado la presencia de factores nucleares, tanto hepáticos como de cerebro, que interaccionan con los elementos reguladores negativos, mientras que para los positivos los factores que se unen parecen ser específicos del hígado.
- Existe una región activadora de unas 230 bp situada a 11 Kb del extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen de la OTC. Esta región presenta especificidad en cuanto al tipo celular, y a la misma parecen unirse múltiples factores, algunos sólo existentes en hígado y otros ubicuos.

El papel de estos elementos reguladores y factores de unión que actúan en cis y trans, todavía está por aclarar. Así, si bien la presencia de un elemento regulador negativo no es nueva en genes de expresión específicamente hepática (256, 421), son varias las funciones que podría desempeñar. Una posibilidad sería que funcionara reprimiendo la transcripción en tejidos extrahepáticos, o ser específico del hígado y actuar en según qué etapas del desarrollo, o bien mediante su interacción con los elementos reguladores positivos, contribuir a un control muy preciso de la transcripción en hígado e intestino delgado.

#### **1.16.- DEFICIENCIAS ENZIMATICAS Y ASPECTOS PATOLOGICOS DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.**

Los casos más severos de hiperamonemia se deben a deficiencias genéticas en las enzimas del ciclo de la urea (235, 275, 594). De entre éstas, las lesiones hereditarias más frecuentes que provocan la intoxicación por amonio, se producen en la Ornitina Transcarbamilasa (73, 266, 595). Desde que se describió el primer caso, en 1962, hasta la fecha, se han descrito diferentes tipos de mutaciones, que conducen a diversos grados de anomalías enzimáticas en los varones homocigóticos y en las hembras heterocigóticas afectadas.

Actualmente se están llevando a cabo estudios (246, 475, 554, 677,) que permiten establecer una mejor correlación entre las observaciones clínicas y las características bioquímicas, así como para comprobar las bases moleculares que subyacen al defecto enzimático y provocan la vasta heterogeneidad de esta enfermedad.

En esta importante tarea, es de gran utilidad el hecho de que existen dos mutantes de OTC, originados de forma espontánea en la descendencia de un ratón irradiado en Oakridge (120, 212,

513). Las dos mutaciones se denominan " *sparse-fur* " o *spf*, y " *sparse-fur with abnormal skin and hair* " o *spf<sup>ash</sup>*. Ambos genes mutantes están relacionados con el cromosoma X, son alelos y producen, al igual que la deficiencia humana de OTC, hiperamonemia, altas concentraciones de ácido orótico en orina y bajas concentraciones de citrulina y arginina en suero. Además, se transmiten de la misma manera como lo hace la deficiencia hereditaria de OTC en humanos, y presentan unas características bioquímicas muy similares a las producidas por mutaciones de la OTC humana. Por tanto, constituyen un modelo animal muy útil para el estudio y comprensión de las bases moleculares responsables de los cuadros clínicos que presenta dicha enfermedad en humanos.

Los ratones portadores de *spf* presentan una mayor cantidad de enzima (alrededor de un 150 % del control) pero con propiedades cinéticas anormales, pues se ha producido un cambio en el pH óptimo y la afinidad por los sustratos está alterada, lo que conduce a una menor actividad de OTC. Los ratones portadores del gen *spf<sup>ash</sup>* tienen una menor cantidad de enzima (alrededor del 10 % del control) con propiedades cinéticas aparentemente normales. Los niveles hepáticos de mRNA traducibles que codifican para la OTC, y su velocidad de síntesis en cortes hepáticos de ratones *spf* son el 58 y 60 % de los controles, respectivamente. En el caso de los ratones *spf<sup>ash</sup>* la actividad de mRNA traducible es el 10 % de los controles. Estos resultados indican que mientras que la disminución de proteína enzimática en los ratones *spf<sup>ash</sup>* se debe principalmente a una disminución en el nivel de mRNA de la enzima, el incremento en la cantidad de proteína enzimática en los ratones *spf* tiene que ser el resultado de una disminución en la velocidad de degradación de la enzima (74, 143).

Se han sintetizado *in vitro* los precursores de las enzimas presentes en las mutaciones (74, 549). Ambos son transportados y procesados proteolíticamente a una forma aparentemente madura. En el caso de la enzima procedente de la mutación *spf<sup>ash</sup>*, se observan dos precursores citoplasmáticos; uno que presenta un tamaño normal y el otro que se desplaza más lento en los geles de poliacrilamida/SDS y que por tanto presenta una mayor elongación. Sólo la subunidad madura procedente del precursor del tamaño normal es capaz de formar el trímero activo (549).

Las bases moleculares de ambas mutaciones también han sido establecidas (262, 657). En los ratones *spf* se ha producido una mutación puntual por sustitución de una única base, en la posición 348 a partir del sitio de inicio de la traducción. La sustitución de una C por una A origina un cambio en el aminoácido 117, que en la proteína normal corresponde a un residuo de histidina y en la proteína mutante es reemplazado por un residuo de asparragina (657). En el caso de la mutación *spf<sup>ash</sup>* también se ha producido una mutación puntual, siendo substituida una G por una A en el último nucleótido del cuarto exón del gen de la OTC (262). El efecto de este cambio da origen a dos alteraciones: primero una deficiencia en los niveles de mRNA traducible, pues el

nucleótido mutado juega un papel importante en el reconocimiento de uno de los sitios de maduración del pre-mRNA. Así, un 90 % del mismo es degradado, produciéndose sólo un 5 % del mRNA correctamente procesado y un 5 % de un mRNA que ha sido cortado en un sitio incorrecto y que contiene 48 bases del cuarto intrón. En segundo lugar, la traducción de estos dos mRNA da lugar a dos pOTC. Uno, en el que el aminoácido 129 sufre un cambio del residuo de arginina por uno de histidina, y que es portador de una mutación sin sentido, ya que no se ven inhibidos ni el transporte ni el procesado del precursor, así como tampoco el ensamblaje de la subunidad madura, ni se aprecia ningún efecto sobre la actividad enzimática. El segundo precursor contiene una inserción de 16 aminoácidos que, aunque no afecta al proceso de transporte mitocondrial, evita el ensamblaje de las subunidades maduras correspondientes, que son rápidamente degradadas ( $t_{1/2} < 2$  horas) en el interior de la mitocondria (262).

La deficiencia provocada por la mutación *spf<sup>ash</sup>* ha podido ser corregida mediante la obtención de ratones transgénicos por microinyección del cDNA de la OTC de rata, colocado bajo el control del promotor temprano del SV40, en óvulos de ratón fecundados (81). A su vez, la deficiencia que origina la mutación *spf* también ha sido corregida mediante la introducción del cDNA de la OTC humana bajo el control del promotor de la OTC de ratón (296). Recientemente (596), también se ha podido corregir la deficiencia en OTC de los ratones *spf<sup>ash</sup>* mediante el cruzamiento de ratones *spf<sup>ash</sup>* heterocigóticos, con ratones transgénicos portadores del promotor de la OTC de rata fusionado con su cDNA, obteniéndose una descendencia *spf<sup>ash</sup>* hemizigótica portadora del gen transgénico y que presenta un fenotipo normal. Por tanto, se ha demostrado que la transferencia génica en la línea germinal de cDNA heterólogo, puede ser una terapia eficaz para la corrección de estos defectos enzimáticos hereditarios.

En el síndrome de Reye, - una enfermedad que se manifiesta en niños y se caracteriza por un deterioro de las funciones hepáticas, una marcada hiperamonemia, una aguda encefalopatía y, a menudo, una fatal evolución - también se ha demostrado una deficiencia de la actividad de la OTC, en ocasiones transitoria (194, 669).

## **2.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

El presente trabajo forma parte y se engloba dentro de una de las principales líneas de investigación del Instituto de Investigaciones Citológicas que, desde hace ya más de trece años, viene estudiando los procesos proteolíticos intracelulares, y más concretamente los mecanismos de degradación de las proteínas mitocondriales.

El tema está siendo objeto de un estudio muy intensivo en otros muchos laboratorios, puesto que la elucidación de las vías y mecanismos por los que transcurren estos procesos, permitiría poder abordar su regulación en los seres vivos, abriendo una vía de innumerables posibilidades, debido a que las reacciones proteolíticas juegan un papel clave en el control de muchas funciones fisiológicas y patológicas, tal y como ya se expuso en la Introducción. Por lo tanto, sólo daremos un breve repaso a los estudios más significativos llevados a cabo.

Todavía no existe un modelo definitivo de la biosíntesis y degradación de las mitocondrias de las células eucariotas. Además, y al igual que ocurre con el tema general de la degradación proteica intracelular, nuestro conocimiento de los fenómenos proteolíticos que sufren las proteínas mitocondriales es fragmentario.

Por una parte, se han ido caracterizando varias proteasas de origen mitocondrial y responsables del procesado de los precursores de diversas proteínas mitocondriales. La existencia de proteasas endógenas de la mitocondria ha sido un tema muy discutido, a pesar de que era, en alguna forma, previsible, puesto que también tienen su propio sistema de síntesis proteica. Numerosos investigadores habían observado y descrito sistemas proteolíticos y proteasas, tanto solubles como asociadas a membranas, en preparaciones mitocondriales (7, 18, 41, 146, 148, 167, 187, 242, 252, 374, 376, 378, 619, 681). Sin embargo, era difícil probar de forma inequívoca su identidad y procedencia mitocondrial, puesto que la inevitable contaminación lisosomal parecía ser responsable de la proteólisis a pH neutro (555, 556), mientras que las proteasas procedentes de mastocitos fueron identificadas como las principales implicadas en la proteólisis asociada a membranas (238).

Todo ello provoca ciertas dudas sobre el verdadero origen de la mencionada actividad proteolítica. No obstante, otros trabajos demuestran la existencia de sistemas proteolíticos neutros intramitocondriales (111, 147, 149), así como otros dependientes de iones calcio (51) o de ATP (127, 142, 147, 520, 701, 713).

Otro punto objeto de controversia ha sido el de si la mitocondria es degradada como una única unidad o, por el contrario, existen procesos independientes que actúan sobre los diferentes componentes mitocondriales. Así, estudios previos realizados *in vivo* (370) ya encontraron que la

membrana externa mitocondrial se recambiaba más rápidamente que el conjunto membrana interna-matriz, y que algunas enzimas mitocondriales presentaban vidas medias muy diferentes entre sí, siendo unas más cortas y otras más largas que la vida media de todo el conjunto de proteínas de la matriz mitocondrial. Trabajos posteriores llevados a cabo con cultivos en monocapa de hepatomas, y por tanto *in vitro*, han estudiado las velocidades de recambio de treinta y tres polipéptidos pertenecientes a la membrana interna mitocondrial (243) y de otros tantos de la matriz (244). Los resultados obtenidos demuestran una gran heterogeneidad entre las vidas medias de todas las proteínas que integran la membrana interna mitocondrial, bien sean de síntesis citoplasmática o mitocondrial, e incluso esa diversidad se extiende a las distintas subunidades pertenecientes a un mismo complejo respiratorio. Igualmente, las proteínas de la matriz presentan diversas velocidades de recambio. Sin embargo, no se encontró evidencia alguna de correlación entre el punto isoeléctrico o el tamaño de los polipéptidos y su velocidad de recambio, al contrario de lo que otros trabajos han demostrado que sucede con las proteínas de localización citosólica (133-135), aunque ya vimos en la Introducción que también hay resultados contradictorios sobre este tema (545, 551).

Todo esto evidencia la necesidad de postular la existencia y actuación de diversos mecanismos que participen en la degradación de este orgánulo, o bien, aunque menos probable, de uno sólo que sea capaz de discriminar enormemente entre los diversos componentes de la mitocondria. En cualquier caso, es seguro que los lisosomas, principales responsables de la degradación intracelular de proteínas tal y como acabamos de ver, intervienen de una u otra forma. En este sentido, hay evidencia experimental procedente del laboratorio donde se ha realizado este trabajo, de que proteasas lisosomales y componentes mitocondriales, actuando simultáneamente, participan en la degradación de algunas proteínas mitocondriales (228, 606, 651, 653).

La velocidad de degradación de los polipéptidos que integran la mitocondria puede verse influida por una diversidad de condiciones, tales como una asociación con la membrana, una separación en compartimientos dentro de la propia mitocondria, la unión de diversos cofactores o agentes alostéricos, el estado de fosforilación o la interacción covalente con otras proteínas, por ejemplo, análogas a la ubiquitina. Pues bien, a pesar de que se han logrado purificar numerosas proteínas mitocondriales, se dispone de muy pocos datos acerca de la susceptibilidad que éstas presentan frente a determinadas proteasas o sistemas proteolíticos, de las variaciones que puede sufrir su velocidad de recambio por alguna de las situaciones que acabamos de citar, de cómo se puede alterar su degradación y por qué las diferentes enzimas presentan distintas velocidades de recambio, de la importancia que ejercen las diferencias observadas entre el catabolismo de las diversas proteínas sobre la viabilidad del orgánulo o de la célula, y de cómo se podría llevar a cabo un control bioquímico, endocrinológico y farmacológico sobre estos procesos degradativos.

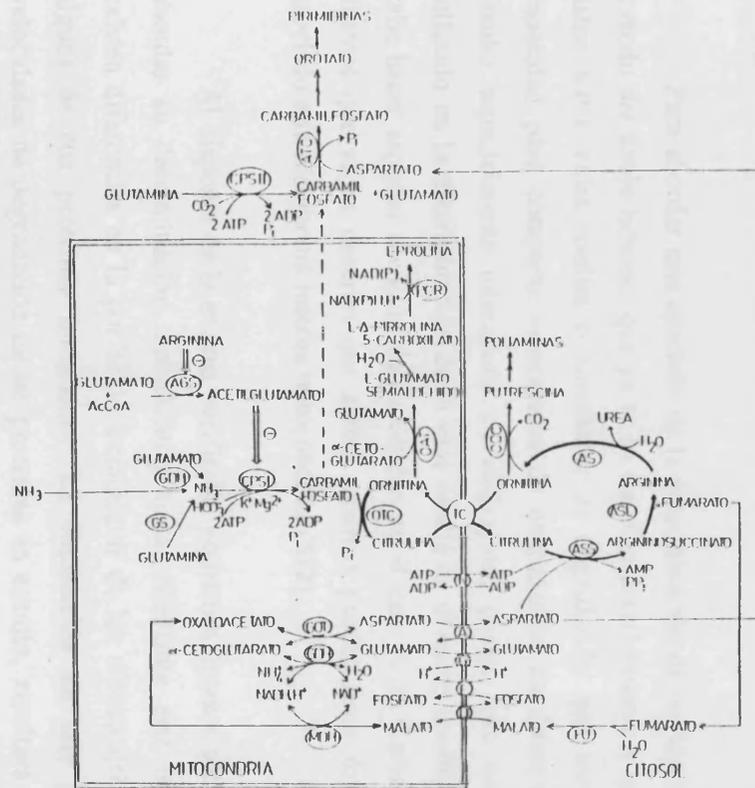
Los objetivos que se persiguen mediante el presente trabajo quieren profundizar en el conocimiento de los procesos de degradación y recambio intracelular de las proteínas mitocondriales, precisamente a través del aporte de datos sobre varios de los aspectos que han sido mencionados en los párrafos anteriores. El plan de trabajo previsto, intenta abordar el problema planteado mediante las aproximaciones más importantes que hoy en día se emplean:

- Estudios sobre la selectividad del proceso, es decir de los mecanismos que puedan explicar las diferentes velocidades de recambio de las proteínas y su reconocimiento por el sistema degradativo.
- Estudios de la maquinaria enzimática y de los compartimientos celulares implicados en el proceso.

Puesto que, probablemente, existen multitud de mecanismos y sistemas proteolíticos implicados en la selectividad del proceso, se seguirá la tendencia actual, que es el estudio de la degradación de proteínas específicas, más que abordar trabajos sobre las proteínas en su conjunto. Para todo ello, se pretende:

- Estudiar, mediante procedimientos inmucitoquímicos, la distribución de la Ornitina Transcarbamilasa, una de las enzimas clave de la matriz mitocondrial, en el conjunto de la población intracelular de mitocondrias.
- Determinar la velocidad de recambio de la OTC.
- Establecer la susceptibilidad de la OTC a aquellos sistemas proteolíticos que puedan intervenir en su degradación.
- Estudiar las reacciones iniciales y pasos limitantes en la secuencia degradativa, y realizar una búsqueda e identificación de aquellos factores que regulen o modulen estos procesos.

Nuestra elección de esta enzima se debe a que constituye y representa, como hemos podido ver en la Introducción, un magnífico modelo para el estudio de las proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares y, por tanto, de síntesis citoplasmática. Debido al notable interés biológico y experimental que ha despertado esta enzima, ya se ha utilizado como modelo para el estudio de la biogénesis mitocondrial, razón por la cual es todavía más adecuada su elección, pues a su idoneidad hay que sumar la gran cantidad de información y datos de que se dispone acerca de ella. Además, tal y como podemos ver en la Figura 4, la OTC se encuentra en un lugar del mapa



**FIGURA 4.- INTERRELACIONES Y DISTRIBUCION INTRACELULAR DE LAS PRINCIPALES RUTAS BIOQUIMICAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DE LA ORNITINA.**

**A:** transportador de aspartato-glutamato. **AGS:** Acetilglutamato Sintetasa. **AS:** Arginasa. **ASL:** Argininosuccinato Liasa. **ASS:** Argininosuccinato Sintetasa. **ATC:** Aspartato Transcarbamilasa. **CPS I y CPS II:** Carbamilo fosfato Sintetasa I (amonio) y II (glutamina). **D:** transportador de ácidos dicarboxílicos. **F:** transportador de fosfato/H<sup>+</sup>. **FU:** Fumarasa. **G:** Glutámico-aspártico Aminotransferasa. **GDH:** Glutamato Deshidrogenasa. **GOT:** Glutámico-aspártico Aminotransferasa. **GS:** Glutaminasa. **MDH:** Málco Deshidrogenasa. **N:** transportador de ATP/ADP. **OAT:** Ornitina Aminotransferasa. **ODC:** Ornitina Decarboxilasa. **OTC:** Ornitina Transcarbamilasa. **PCR:** Pirrolina-5-carboxilato Reductasa. **TC:** transportador de ornitina/citrulina. (Figura adaptada de la referencia 227).

ocasiones se requerirá eliminar al máximo la presencia de otras estructuras celulares como mitocondrias, peroxisomas o retículo endoplásmico, y se recurrirá a la centrifugación isopícnica en gradientes de metrizamida. También se estudiará y comparará, el efecto que puedan tener otros sistemas proteolíticos, como el dependiente de ubiquitina, en la degradación de esta proteína mitocondrial. Mediante este modelo de degradación *in vitro*, se establecerán sus condiciones óptimas de funcionamiento, se analizarán los posibles factores reguladores del mismo y los mecanismos por los que pueda transcurrir. Finalmente, a partir de los datos obtenidos en todos los estudios que acabamos de exponer, se intentará comprobar si la OTC en particular, y las proteínas mitocondriales en general, responden a las últimas hipótesis formuladas sobre la regulación de la degradación intracelular por factores intrínsecos de las propias proteínas.

### **3.- MATERIAL**

### 3.1.- ANIMALES.

Se han empleado ratas macho de la raza Wistar de 3 a 9 meses de edad y entre 200 y 450 g de peso. Para la obtención de lisosomas se tomaban ratas de más de 5 meses y 300 g, mientras que para los experimentos de determinación de la vida media de la OTC se han utilizado ratas de unos 3 a 6 meses de edad y 200-250 g de peso. Para la obtención de anticuerpos se han empleado conejos macho de la raza New Zealand, de entre 2 y 3 Kg de peso. Todos los animales se mantuvieron bajo periodos alternativos de luz y oscuridad cuya duración era de 12 horas, y se sometieron a una dieta estándar para animales de laboratorio cuyo contenido en proteína era del 20 %, disponiendo siempre de agua y comida *ad libitum*.

### 3.2.- REACTIVOS.

La L-[<sup>3</sup>H] leucina (56 Ci/mmol), la L-[<sup>14</sup>C] leucina (60 mCi/mmol), el Na[<sup>125</sup>I] (100 mCi/ml), el hidrocloreto de L-[<sup>14</sup>C] ornitina (50 mCi/mmol) y una mezcla de proteínas [<sup>14</sup>C] metiladas (30  $\mu$ Ci/mg de proteína) empleadas como marcadores de peso molecular (14.300 - 93.000) para la autoradiografía de geles de electroforesis, se obtuvieron de The Radiochemical Centre, Amersham. La metrizamida era de Nyegard & Co. El Lowicryl K4M se obtenía de Polysciences, el Parlodion de Mallinckrodt y el glutaraldehído de Tousimis. El ácido tetracloroáurico, el fósforo blanco y el polietilenglicol de 20 kDa. provenían de Merck. La Proteína A, la Sepharose 6B y el Sephadex G-50 Fine eran de Pharmacia Fine Chemicals. La mezcla acrilamida/bisacrilamida (29:1), la fracción de inmunoglobulinas G de cabra anti-IgG de conejo y unidas covalentemente a peroxidasa de rábano y su correspondiente reactivo de desarrollo de color, la resina de intercambio iónico AG 50W-X8 y el reactivo de radioyoduración en fase sólida Enzymobead se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. La albúmina de suero bovino (fracción V) (BSA), la tripsina de páncreas de buey (tipo III), la elastasa de páncreas porcino (tipo II-A), el reactivo luciferasa-luciferina, el vanadato trisódico, la L-ornitina, la quercetina, la resina quelante Chelex 100, los inhibidores de proteasas antipapaína, L-(1-tosilamido-2-feniletíl)clorometil cetona (TosPheCH<sub>2</sub>Cl), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PhMeSO<sub>2</sub>F), N-etilmaleimida (NEM), elastatinal y todos los nucleótidos de guanina eran de Sigma Chemical Co. La leupeptina y la pepstatina A se obtuvieron de Bachem Biosciences Inc. La ouabaína, oligomicina, carbamil fosfato (sal dilútica) y todos los nucleótidos de adenina provenían de Boehringer Mannheim, excepto el 1,N<sup>6</sup>etenoadenosina 5'-trifosfato ( $\epsilon$ -ATP), que se obtuvo de P.L. Biochemicals. El fosfoacetato de trimetilo, el ácido trifluoro acético y el anhídrido trifluoroacético se adquirieron a Aldrich-Chemie.

### 3.3.- TAMPONES Y SOLUCIONES.

El tampón fosfato salino (PBS) se preparó disolviendo en un litro de agua 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,25 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , siendo el pH resultante de 7,3.

La solución de Ringer se preparaba disolviendo 1,8 g NaCl, 0,084 g de KCl y 0,05 g de  $\text{CaCl}_2$  en un volumen final de 200 ml de agua bidestilada.

El citrato de plomo alcalino se preparaba disolviendo 3,52 g de citrato trisódico en 60 ml de agua bidestilada, y luego añadiendo 2,66 g de nitrato de plomo (II), 16 ml de NaOH 1 N y completando con agua hasta un volumen final de 100 ml.

El tampón de muestra para electroforesis contenía: 12,5 % (v/v) de glicerol, 1,25 % (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS), 1,25 % (v/v) de 2-mercaptoetanol y 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de azul de bromofenol, todo ello disuelto en tampón Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8.

El líquido de centelleo se preparaba disolviendo, sucesivamente, 10,0 g de 2,5 difeniloxazol (PPO) y 0,2 g de 1,4 bis (5-feniloxazolil) benceno (POPOP) en 2 l de Tolueno y añadiendo, finalmente, 1 l de Triton X-100.

### 3.4.- APARATOS Y MATERIAL INFORMÁTICO.

Aparte del material general de uso común en un laboratorio de Bioquímica, como espectrofotómetros, centrífugas de mesa, centrífugas Eppendorf, etc , se han utilizado centrífugas preparativas Sorvall modelos RC-5 y RC-5B y una ultracentrífuga Beckman modelo L5-65. El contador de centelleo era de la casa Intertechnique modelo SL-4000. El aparato de electrotransferencia empleado fue el modelo Trans-blot Cell de Bio-Rad Laboratories. En relación con las técnicas de microscopía electrónica, las secciones ultrafinas se obtenían con un ultramicrotomo LKB 4801 A y la película de carbono de las rejillas con un evaporador Edwards 3AM. La observación de las muestras se realizó con un microscopio electrónico de transmisión Philips 300 a 60 kvolts y se fotografiaron sobre negativos Scientia de Agfa de 6,5 x 9 cm.

El material informático utilizado consistía en un ordenador personal IBM PS/2 modelo 30 286, conectado a un CD-ROM de la casa Hitachi modelo CDR-1503S, y un ordenador Digital modelo MicroVAX 3300, conectado a través de la red IBERPAC con el nodo español de la red del European Molecular Biology Network (EMBnet/CNB). Ambas conexiones nos permitían tener

acceso a las siguientes bases de datos de secuencias de ADN y proteína: EMBL, actualizada al 15 de Noviembre de 1991, y SWISS-PROT, versión 19.0 de Agosto de 1991 (compiladas ambas por el European Molecular Biology Laboratory), GenBank, versión 69.0 de Septiembre de 1991 (compilada por National Institutes of Health) y NBRF-PIR, versión 29.0 de Junio de 1991 (compilada por la National Biomedical Research Foundation).

Los paquetes informáticos empleados fueron: DNASIS, versión 6.02 y PROSIS, versión 1.09, ambos de Pharmacia LKB Biotechnology; GCG, versión 7.0 de Genetics Computer Group y PC/Gene, versión 5.1 de la Universidad de Ginebra.

## **4.- METODOS**

#### 4.1.- PURIFICACION DE LA ENZIMA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE TERNERA.

El procedimiento que se ha seguido es el descrito por Marshall y Cohen (380). Todos los pasos de la purificación se realizaron entre 0° y 4° C. Las precipitaciones con sulfato amónico se llevaron a cabo añadiendo la correspondiente cantidad de éste, en forma sólida, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$g = \frac{533 (M_2 - M_1)}{4,05 - 0,3 M_2}$$

donde  $M_1$  es la molaridad inicial,  $M_2$  la final y  $g$  los gramos de sulfato amónico sólido que es necesario añadir por litro de disolución, para llevar ésta desde  $M_1$  a  $M_2$ .

La adición de sulfato amónico sólido se realiza lentamente y con agitación constante. Una vez que se ha logrado su disolución, se debe de mantener la solución en agitación durante treinta minutos para permitir que alcance el equilibrio. La cantidad de sulfato amónico presente en los precipitados se determina resuspendiendo éstos en un volumen conocido del tampón correspondiente, y asumiendo que el incremento de volumen que se produce corresponde al de una solución de sulfato amónico de concentración igual a aquella en que se ha efectuado la precipitación. Cuando hay que ajustar la concentración de la enzima a un valor determinado, se disuelve el precipitado en un volumen del tampón correspondiente menor que el que se prevé necesario según el rendimiento esperado; luego se ensaya la actividad enzimática de la solución resultante y, por último, ésta se diluye hasta la concentración deseada. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 y 260 nm., tal y como ya se ha descrito anteriormente (457). El tampón A, al que se hace referencia a lo largo de varios pasos, contiene: 0,1 M fosfato sódico, 1 mM EDTA y su pH final es de 6,0. Las fracciones sucesivas que se van obteniendo se pueden almacenar a - 20° C durante la noche, siempre que se haya llegado al final de un paso completo, pero no en los estadios intermedios.

A continuación, se describen los pasos de que consta este procedimiento de purificación:

- 1.- El hígado de ternera se obtiene en el matadero municipal de un animal recién sacrificado. Es inmediatamente introducido en hielo picado, trasladado al laboratorio y homogeneizado, tal y como se describe a continuación, antes de que transcurran tres horas desde la muerte del animal. El hígado es troceado en pequeñas porciones, y éstas

homogeneizadas durante cuarenta y cinco segundos en un Waring Blendor a máxima velocidad, con tres volúmenes (3 ml/g) de una solución tampón cuyo pH final es de 7,2 y que contiene: 0,15 M cloruro potásico, 2 mM tampón ácido 4-morfolinopropanosulfónico/NaOH (MOPS/NaOH), 0,1 mM EDTA.

El homogeneizado se filtra a través de dos gasas, se lleva hasta pH 7,0 con hidróxido potásico 1 M y se centrifuga a 13.000 x g durante treinta minutos. El sobrenadante se deshecha, y el precipitado se resuspende añadiendo a cada frasco el mismo volumen del medio de homogeneización que tenía y agitándolo manualmente. La suspensión resultante se centrifuga en las mismas condiciones anteriores.

El residuo resultante se resuspende en un volumen de tampón A igual al 55 % del volumen total del homogeneizado. A esta suspensión se añade un volumen de bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB) al 1 %, igual al 24 % del volumen total del homogeneizado. La mezcla se agita mecánicamente durante quince minutos y se centrifuga a 13.000 x g durante veinte minutos. En el sobrenadante de la centrifugación se mide la actividad de OTC, diluyéndolo con tampón A hasta que contenga 55 unidades de OTC/ml.

- 2.- A partir de la solución procedente del paso anterior, se lleva a cabo el primer fraccionamiento con sulfato amónico recogiendo, por centrifugación a 13.000 x g durante treinta minutos, la fracción que precipita entre 1,8 y 2,6 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El precipitado se disuelve en tampón A y se ajusta a una concentración de 250 unidades de OTC/ml.
- 3.- Se lleva a cabo otro fraccionamiento recogiendo, por centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior, la fracción que precipita entre 1,7 y 2,2 M de sulfato amónico. El precipitado se disuelve en tampón A hasta obtener una solución que contenga 400 unidades de OTC/ml.
- 4.- A la solución resultante del paso anterior, se adiciona hidrocloreuro de ornitina en forma sólida, hasta llevarla a una concentración final de 5 mM. A continuación se calienta, en porciones de 200 ml y con constante agitación, hasta 65° C por inmersión en un baño que se encuentra a 70° C; se mantiene a 65° C durante un minuto, y después se introduce en un baño de hielo fundente. Una vez enfriada la suspensión, se filtra a través de un embudo con placa filtrante de fibra de vidrio cuyo tamaño de poro sea del n° 2. El abundante precipitado de proteína que queda retenido, se lava por dos veces, en cada una de ellas con un volumen de tampón A equivalente a la décima parte

del volumen inicial que se ha calentado. La enzima se precipita añadiendo al filtrado sulfato amónico en cantidad suficiente para llevar su concentración hasta 2,2 M. El precipitado se recoge por centrifugación a 13.000 x g durante treinta minutos, y se disuelve en tampón A hasta obtener una concentración de 3.000 unidades de OTC/ml.

5.- A la solución anterior se le añade sulfato amónico hasta obtener una concentración de 1,7 M, y se centrifuga a 34.000 x g durante treinta minutos. El precipitado se disuelve en tampón trietanolamina-HCl 0,1 M, pH 8,24 que contenga 10 mM 2-mercaptoetanol (MSH), hasta obtener una concentración de 1.600 unidades de OTC/ml.

6.- La fracción que precipita entre 2,3 y 2,8 M de sulfato amónico se recoge por centrifugación a 13.000 x g durante treinta minutos y se disuelve en tampón A hasta obtener una concentración de 3.000 unidades de OTC/ml.

7.- A la solución obtenida en el paso anterior, se le añade sulfato amónico hasta obtener una concentración final de 1,7 M y se centrifuga a 34.000 x g durante treinta minutos. El precipitado se disuelve en tampón A hasta alcanzar una concentración de 7.000 unidades de OTC/ml. A esta solución se le añade sulfato amónico hasta llevar la concentración a 1,8 M, y así se mantiene la enzima almacenada entre 0° y 4° C sin que se observe pérdida de actividad durante varios meses.

#### **4.2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.**

La actividad catalítica de la OTC se mide por la cantidad de citrulina, en  $\mu$ moles, producida por unidad de tiempo a partir de ornitina y carbamil fosfato.

El medio de reacción para determinar la actividad en homogeneizados de hígado o subfracciones celulares contiene, en un volumen final de 1 ml.:

- Tampón trietanolamina-HCl pH 7,6 (22° C)	200 mM
- Ornitina (Hidrocloruro)	5 mM
- Carbamil fosfato (Sal dilútica)	5 mM

y la reacción se detiene mediante la adición de 1 ml de HClO<sub>4</sub> al 14 % (v/v).

Cuando se trabaja con la enzima parcial o totalmente purificada el medio de reacción contiene, en un volumen final de 0,5 ml:

- Tampón dietanolamina/acetato, pH 8,5 (22° C)	50 mM
- Ornitina (Hidrocloruro)	5 mM
- Carbamil fosfato (Sal diltica)	5 mM

y la reacción se detiene mediante la adición de 2 ml del reactivo ácido que se utiliza para el desarrollo del color en la determinación de citrulina.

La reacción es lineal con respecto a la concentración de enzima siempre que la cantidad de ésta sea tal que no se consuma, bajo las condiciones que se han descrito anteriormente, más del 10 % del carbamil fosfato durante la incubación que es de 10 minutos a 37° C. Más allá de dicho punto, la velocidad de la reacción decrece como consecuencia de la acumulación de fosfato inorgánico, que es un buen inhibidor competitivo de la OTC (375, 527) y que puede provenir no sólo de la reacción catalizada por la enzima, sino también de la descomposición espontánea y no enzimática del carbamil fosfato - que tiene una vida media de 42 minutos entre pH 6,8 y 7,9 y a 37° C (8) - o de la hidrólisis enzimática y no específica que pueden llevar a cabo las fosfatasas presentes en la muestra. Puesto que la constante de equilibrio es mayor que  $1 \cdot 10^5$  a pH 7,6 y 25° C (381, 383), la reacción inversa no constituye una fuente de error.

Las soluciones de carbamil fosfato se deben de preparar en frío y en el momento de ser utilizadas, pues este compuesto se descompone incluso almacenado a bajas temperaturas. Los blancos contienen exactamente la misma mezcla de reacción, pero su muestra enzimática ha sido desnaturalizada previamente por inmersión en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. La reacción se inicia siempre mediante la adición del carbamil fosfato.

La citrulina se mide espectrofotométricamente, según el método descrito por Nuzum y Snodgrass (477). Sobre un volumen de muestra de 0,5 ml se añaden 2 ml del reactivo ácido, que se prepara disolviendo en 450 ml de agua 3,7 g de antipirina y 2,5 g de sulfato férrico-amónico, añadiendo 250 ml de  $H_3PO_4$  concentrado y completando con agua hasta un volumen final de 1 litro. A continuación, se adiciona 1 ml de una solución que contiene 0,4 % (p/v) de diacetil monoxima y 7,5 % (p/v) de NaCl y que se conserva a 4° C y en botella ámbar. El contenido de los tubos se homogeneiza por agitación y éstos se introducen en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos exactamente. Posteriormente se transfieren a un baño de agua a temperatura ambiente. Cuando se han enfriado se lee la absorbancia a 464 nm. Los tubos deben de protegerse de la luz desde que se hierven hasta que se miden en el espectrofotómetro.

Junto con cada determinación se prepara una curva patrón de citrulina (ver Figura 5). Una unidad (U) de actividad enzimática de Ornitina Transcarbamilasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de citrulina en 1 minuto y a 37° C.

#### **4.3.- PREPARACION DE LISOSOMAS.**

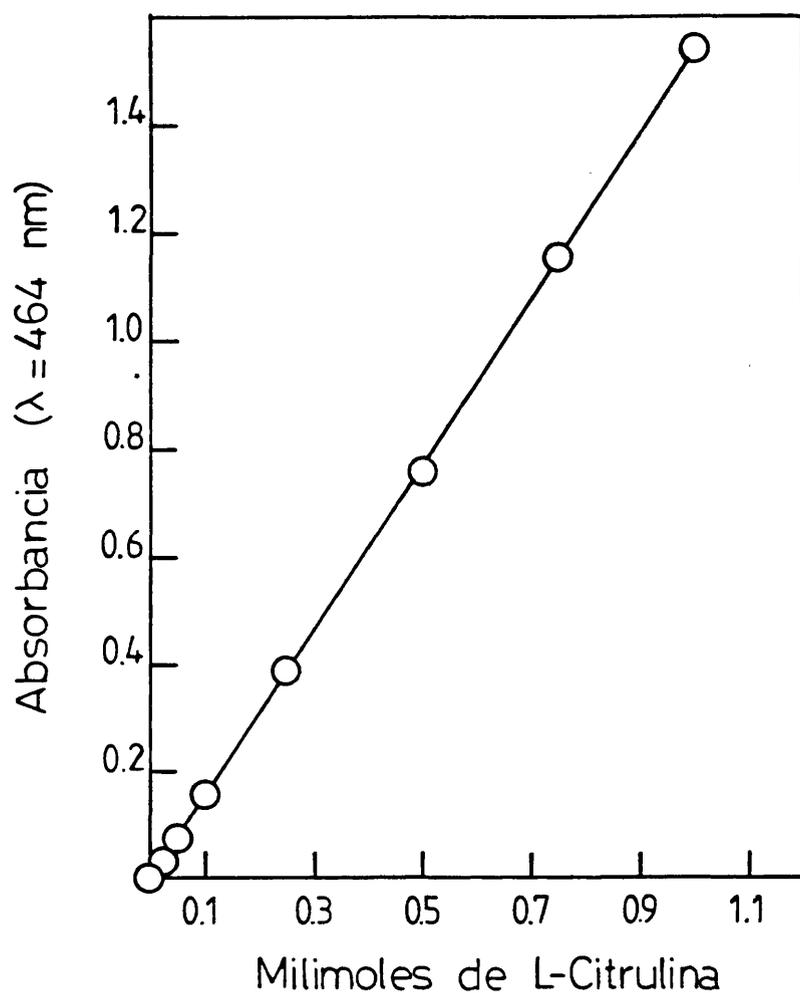
A lo largo del presente trabajo se han obtenido lisosomas por diferentes métodos y de distintos órganos. Así, los lisosomas de hígado se han aislado utilizando dos procedimientos: uno es el descrito por Ragab et al (514), consistente en una modificación del método de Sawant et al. (568) y basado en la centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa de un homogeneizado de hígado de rata, tal y como ya se ha descrito previamente (457); el segundo purifica los lisosomas por centrifugación isopícnica en un gradiente de metrizamida, y fue diseñado por Wattiaux et al. (675).

Además, también se han obtenido lisosomas de cerebro de rata mediante una combinación del método de Koenig (334) y del de Wattiaux et al. anteriormente citado. A continuación, se describen en detalle los dos procedimientos que utilizan la centrifugación isopícnica en un gradiente de metrizamida.

##### **4.3.1.- PREPARACIÓN DE LISOSOMAS DE HÍGADO DE RATA POR EL MÉTODO DE WATTIAUX ET AL.**

Se parte de ratas sometidas a un ayuno de 20 horas antes de ser sacrificadas. Los hígados, una vez extraídos y pesados, se lavan con una solución de sacarosa a 0,25 M mantenida en un baño de hielo. A lo largo de todos los pasos siguientes la temperatura se mantuvo entre 0° y 4° C. Se homogeneiza el hígado en la misma solución de sacarosa por medio de un Waring Blendor con tres intervalos de veinte segundos cada uno a la máxima velocidad y espaciadas entre sí otros veinte segundos. El volumen final resultante debe de ser de 7 ml por cada gramo de hígado. Después de filtrar el homogeneizado a través de dos gasas, se centrifuga a 4.500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall equipada con un rotor GSA. El sobrenadante se separa teniendo cuidado de no perturbar la parte superior del precipitado, el cual se vuelve a homogeneizar de la misma forma y centrifugar en las mismas condiciones que acabamos de describir.

Los sobrenadantes resultantes se juntan y se someten de nuevo a una centrifugación de 12.500 rpm durante 10 minutos y utilizando el rotor GSA. El sobrenadante se elimina junto con la capa laxa que se encuentra en la superficie del precipitado. Este se resuspende en un volumen igual



**FIGURA 5.- CURVA PATRON DE DETERMINACION DE CITRULINA.**

Se prepara por pesada directa una solución patrón 10 mM de L-citrulina, a partir de la cual se toman diversas alcuotas que comprendan el rango de concentraciones indicado en la gráfica, y se completa hasta 0,5 ml mediante el tampón de ensayo de actividad de OTC. A continuación, las muestras se procesan tal y como se describe en el apartado 4.2. de Métodos.

al del homogeneizado y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. La fracción que de esta forma se obtiene corresponde, esencialmente, a la fracción mitocondrial ligera de de Duve et al. (119) y es la que se utiliza como material de partida para la centrifugación en un gradiente discontinuo de soluciones de metrizamida de diferente densidad.

La preparación de las soluciones de metrizamida merece especial mención. Este producto se comercializa en forma sólida, bajo la cual es estable, siempre y cuando se almacene a temperatura ambiente y protegido de la luz. Aunque es muy soluble en agua, forma agregados muy pegajosos en este medio. Por tanto, para su disolución debe de añadirse muy lentamente y con constante agitación. Es también muy estable en solución y dentro de un amplio rango de pH, 2,5 - 12,5. Aunque en medio alcalino se produce la epimerización del residuo de glucosamina, sus propiedades como medio para centrifugación en gradientes de densidad permanecen intactas. Las soluciones de metrizamida también son susceptibles a la degradación bacteriana, de aquí que se deban de esterilizar por filtración o almacenar a - 20° C. En ambos casos, se pueden preparar soluciones hasta del 90 % (p/v), que almacenadas en la oscuridad se conservan durante largos períodos de tiempo. Es imposible el uso del autoclave, puesto que, al calentar dichas soluciones por encima de 55° C, se liberan iones yoduro. Todas las soluciones de metrizamida que se utilizan en la centrifugación isopícnica, han sido previamente ajustadas a pH 7,4 con NaOH 0,01 N.

La fracción mitocondrial ligera, una vez obtenida como acabamos de describir, se resuspende en sacarosa 0,25 M, de forma que resulte un volumen final de 1 ml por cada 3 g de hígado homogeneizado. Un volumen de esta fracción se añade sobre dos volúmenes de una solución de metrizamida al 85,6 % (p/v). A continuación, se depositan 10 ml de esta mezcla en cada uno de los tubos de nitrocelulosa del rotor basculante SW27 de la ultracentrífuga, y se van superponiendo las siguientes soluciones de metrizamida:

- 6 ml de metrizamida al 32,82 % (p/v), densidad = 1,181 g/ml.
- 6 ml de metrizamida al 26,40 % (p/v), densidad = 1,145 g/ml.
- 6 ml de metrizamida al 24,53 % (p/v), densidad = 1,135 g/ml.
- 9 ml de metrizamida al 19,78 % (p/v), densidad = 1,109 g/ml.

teniendo mucho cuidado para que al añadirlas no se perturben las capas precedentes. La centrifugación se lleva a cabo a 95.000 x g durante dos horas, tras las que se obtienen cuatro bandas claramente diferenciadas. Aunque las tres superiores contienen lisosomas bastante purificados, la fracción que se separa es la número dos, es decir, la que se encuentra en la interfase existente entre las dos capas superiores. Una vez recolectada toda la banda, se diluye con sacarosa 0,32 M hasta obtener un volumen final igual al del homogeneizado de partida, y se centrifuga en un rotor GSA a 13.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en un volumen de

sacarosa 0,32 M que sea la décima parte del anterior, y se centrifuga en un rotor SS34 a 16.000 rpm durante 10 minutos. De esta forma, se obtiene un precipitado constituido por lisosomas altamente purificados y cuya estructura e integridad se encuentran totalmente respetadas.

Con estas preparaciones lisosomales, al igual que con todas las demás, se sigue el siguiente procedimiento antes de utilizarlas en los ensayos de degradación: el sedimento de la última centrifugación se resuspende en el mínimo volumen posible de una solución recién preparada de 1,4-ditioeritritol (DTE) 5 mM. La suspensión resultante se congela y descongela diez veces, utilizando para ello un baño de acetona y nieve carbónica, y el chorro del agua del grifo, respectivamente. A continuación, se determinan el contenido en proteína, la actividad  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidasa ( $\beta$ -NAGASA) mediante el p-nitrofenil 2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido y la actividad de Fosfatasa Acida utilizando como substrato p-nitrofenilfosfato, de la preparación, tal y como ya se describió anteriormente (457), se divide en pequeñas alcuotas y se conserva a -20° C.

#### 4.3.2.- PREPARACIÓN DE LISOSOMAS DE CEREBRO DE RATA.

Como ya hemos indicado anteriormente, este método combina dos procedimientos. Parte del método de Koenig para la obtención del homogeneizado de cerebro y de una fracción cruda que contiene principalmente mitocondrias y lisosomas. Sin embargo, este autor purifica finalmente los lisosomas por centrifugación en un gradiente discontinuo de soluciones de sacarosa de diferentes densidades, mientras que en el presente trabajo se ha utilizado la centrifugación isopícnica en un gradiente discontinuo de metrizamida, tal y como Wattiaux et al. emplean en la purificación de los lisosomas de rata y que se acaba de describir.

Los cerebros se extraen rápidamente, se pesan y lavan con sacarosa 0,32 M a 0° - 4° C, temperatura que se mantiene a lo largo de todo el proceso. A continuación, se homogeneizan con 9 volúmenes de sacarosa 0,32 M (9 ml por cada gramo de tejido) mediante tres golpes de émbolo en un homogeneizador Potter Elvehjem que gire a 600 rpm. El homogeneizado resultante se centrifuga a 800 x g durante 10 minutos. El precipitado que está constituido principalmente por núcleos, células sin romper, eritrocitos, fragmentos vasculares y otros restos celulares, se desecha y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 16.000 x g durante 20 minutos. El precipitado, constituido sobre todo por mitocondrias, lisosomas, membranas y nervios terminales, se resuspende en el mismo volumen del que procede y se vuelve a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones. A partir del precipitado que se obtiene después de esta segunda centrifugación, se purifican los lisosomas tal y como si se tratara de la fracción mitocondrial ligera de Duve et al., por

centrifugación isopéncica en un gradiente discontinuo de metrizamida y en la forma descrita en el apartado anterior.

#### 4.4.- SINTESIS DEL $\delta$ -N-FOSFOACETIL L-ORNITINA ( $\delta$ -PALO).

Se ha seguido el método descrito por Hoogenraad (121), que está basado en otro previamente descrito por el mismo autor (265) y modificado en forma análoga a la síntesis del fosfoacetil L-aspartato (311).

Se prepara ácido fosfoacético a partir de la hidrólisis de 20 g de su éster trimetílico por calentamiento a reflujo en HCl 6 M durante tres horas. El ácido clorhídrico se elimina por evaporación en un rotavapor, calentando la muestra en un baño de agua a unos 50° C aproximadamente y mediante el vacío producido por una bomba de agua, hasta obtener un líquido muy espeso. Este proceso se repite dos veces más por adición al residuo obtenido de 200 ml de agua. El aceite residual que se obtiene se utiliza tal cual, sin permitirle cristalizar. Se disuelve el ácido fosfoacético así obtenido en 45 g de ácido trifluoroacético, seguido de 19 g de anhídrido trifluoroacético. El matraz que contiene la mezcla se tapa herméticamente y ésta se agita suavemente hasta obtener una solución homogénea. Tras treinta minutos a temperatura ambiente, se vuelven a añadir 5 g de anhídrido trifluoroacético y, después de homogeneizar, se deja la mezcla a temperatura ambiente durante una hora más. A continuación, la mezcla se seca rápidamente mediante un rotavapor bien seco y bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. El aceite residual obtenido, se seca de forma todavía más exhaustiva utilizando una bomba de alto vacío hasta conseguir una espuma pegajosa, blanca y de aspecto semicristalino.

Este material se añade en porciones de aproximadamente 2 g a una solución acuosa del complejo cúprico de la L-ornitina, que contiene 9,6 g del mismo en 50 ml de agua y ajustada a pH 9,5 mediante la adición de NaOH 10 M. Este complejo se prepara disolviendo 5 g de monohidrocloreto de L-ornitina en 50 ml de agua hirviendo a la que lentamente, y en pequeñas porciones, se le añaden 3 g de carbonato cúprico básico. Después de enfriar, se filtra la solución resultante y el complejo cúprico de la L-ornitina se aísla mediante fraccionamiento con etanol. Para facilitar el seguimiento del producto a lo largo de los siguientes pasos cromatográficos, es conveniente añadir una cierta cantidad de L-ornitina radiactiva, marcada bien con  $^3\text{H}$  o con  $^{14}\text{C}$ .

La reacción se lleva a cabo entre 0° y 4° C, mediante vigorosa agitación, y cuidando de mantener el pH entre 9 y 10 por medio de la adición de NaOH 10 M. Cuando se ha añadido la última porción del derivado trifluoroacético del ácido fosfoacético, la mezcla se transfiere al matraz donde éste estaba contenido. A continuación, se añade ácido clorhídrico concentrado hasta hacer la

solución 0,5 M con respecto al mismo. Luego se hace pasar la mezcla a través de una columna de dimensiones 2,5 x 25 cm., empaquetada con la resina de intercambio iónico de lecho mixto Chelex 100 (Sigma) de 50-100 mallas y equilibrada con agua. La columna se lava también con agua hasta que cese de salir radiactividad de la misma. El eluido se concentra mediante un rotavapor hasta un volumen aproximado de 100 ml y se aplica a una columna de 2,5 x 40 cm. rellena con la resina de intercambio iónico AG 50WX8 (Bio-Rad), 200-400 mesh y en forma protónica. Se eluye con agua y se recoge el primer pico de radiactividad, que se vuelve a concentrar mediante un rotavapor. Finalmente, se neutraliza la solución mediante la adición de hidróxido sódico y se lleva a sequedad utilizando de nuevo el rotavapor y la bomba de alto vacío.

#### **4.5.- PURIFICACION DEL $\delta$ -PALO POR CROMATOGRAFIA PREPARATIVA SOBRE PAPEL.**

Como el análisis del producto obtenido en la síntesis no presentaba la pureza deseada, se sometió a una cromatografía preparativa sobre papel Whatman 3MM. Se aplica la muestra a lo largo de una hoja de dimensiones 30 x 25 cm., y se utiliza como eluyente una mezcla de butanol: ácido acético: agua, en las proporciones siguientes: 35: 10: 20.

Una vez el frente del eluyente ha alcanzado una altura de 24 cm., se detiene la cromatografía y se seca la hoja. Luego se cortan dos tiras de 1 cm. de ancho en cada uno de los extremos, que se utilizan para detectar sustancias ninhidrina-positivas y sustancias que contengan fósforo. A continuación, se corta la banda correspondiente al  $\delta$ -PALO, que es la que da positivas ambas tinciones y se eluye el mismo mediante cromatografía descendente. Por este procedimiento se pueden llegar a purificar hasta 0,2 g de  $\delta$ -PALO cada vez.

Para la tinción con ninhidrina, se disuelve 1 g de esta sustancia en 1 l. de alcohol etílico absoluto y se pulveriza la solución resultante sobre la muestra.

Para teñir las sustancias que contienen fósforo, se utiliza el procedimiento de Maile et al (377). Se preparan dos disoluciones: en la primera se añaden 40,11 g de  $\text{MoO}_3$ , en 1 l. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 N, y la mezcla se hierve suavemente hasta conseguir una disolución total del  $\text{MoO}_3$ . No se debe de utilizar hasta el día siguiente, tiempo durante el cual cambiará de color amarillo pálido a azul. La segunda disolución contiene 1,78 g de molibdeno en polvo que se suspende en 500 ml de la primera disolución. La mezcla se hierve suavemente durante 15 minutos, se deja enfriar y se decanta para eliminar cualquier residuo.

El reactivo final se prepara añadiendo volúmenes iguales de las soluciones uno y dos, más 4,5 volúmenes de agua. Mientras que este reactivo final se debe de preparar en el acto, las soluciones uno y dos son estables durante varios meses si se almacenan en la oscuridad.

#### **4.6.- INMOVILIZACION DEL $\delta$ -PALO A UN ADSORBENTE.**

Se ha utilizado como adsorbente Sepharose 6B epoxi-activada. Se toman 25 g del mismo, que se lavan con agua de forma exhaustiva y se secan mediante filtración a vacío sobre un embudo de placa filtrante para, finalmente, volverlos a lavar con NaOH 1 M. A continuación, se resuspenden en 30 ml de NaOH 0,1 M y se mezclan con 0,6 g de  $\delta$ -PALO disueltos en 10 ml de NaOH 0,1 M. La suspensión resultante se agita vigorosamente a 27° C durante dos días. Tras este período el adsorbente se lava de forma exhaustiva con agua y se resuspende en 50 ml de etanolamina 1 M, agitándose la suspensión resultante durante 24 horas y a 27° C, con objeto de bloquear los grupos que no hayan reaccionado. La cantidad de  $\delta$ -PALO unida al adsorbente fue de 54  $\mu$ moles/g de adsorbente seco.

#### **4.7.- PURIFICACION DE OTC POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.**

El procedimiento seguido consiste en una adaptación del método descrito originalmente (121, 267). Una parte de una fracción mitocondrial obtenida como se describe en el apartado correspondiente, se diluye con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, y que contiene EDTA 1 mM, Tritón X-100 0,5 % y DTE 1 mM, hasta una concentración de proteína próxima a los 10 mg/ml. A continuación la suspensión resultante se homogeneiza con un Potter Elvehjem y es sonicada a la máxima intensidad durante tres períodos de 5 segundos cada uno en un sonicador MSE. Después de 10 minutos de centrifugación a 15.000 x g y 4° C, el sobrenadante se mezcla con 10 g de Sepharose 6B que ya lleva acoplado el  $\delta$ -PALO, incubándose la mezcla durante treinta minutos en un baño con agitación y mantenido a 27° C. Luego, esta mezcla se filtra mediante vacío sobre un embudo de placa filtrante y el filtrado se desecha. El adsorbente se lava primero con 100 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, que contenga DTE 1 mM, y luego con otros 100 ml del mismo tampón, pero que además es 0,1 M en KCl. Se desconecta el vacío y se añaden 10 ml de carbamil fosfato 10 mM, recién preparados en agua a 0° C, y se deja equilibrar con el adsorbente durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a aplicar el vacío y se recoge el filtrado. El proceso anterior se repite una segunda vez y los filtrados se juntan y precipitan mediante la adición de 463 g/l de sulfato amónico. El precipitado, que contiene la enzima purificada, se recoge por centrifugación y se disuelve en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,8, conteniendo 1 mM EDTA y 1 mM DTE.

#### 4.8.- ADMINISTRACION DE ISOTOPOS Y PREPARACION DE LAS DIVERSAS FRACCIONES HEPATICAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACION DE LA VIDA MEDIA DE LA OTC POR EL METODO DEL DOBLE ISOTOPO.

Grupos de dos o tres ratas, sometidas a ayuno durante la noche anterior, son inyectadas por vía intraperitoneal, en lo que se considera como tiempo 0, con 25  $\mu\text{Ci}$  y 83 nanomoles de L-[ $^{14}\text{C}$ ] leucina. En los intervalos de tiempo apropiados (1, 3, 6 y 10 días) se llevan a cabo las inyecciones de L-[ $^3\text{H}$ ] leucina, administrando 75  $\mu\text{Ci}$  y 83 nanomoles de la misma. Los animales se sacrificaban por decapitación, 4 horas después de la inyección de L-[ $^3\text{H}$ ] leucina. Se realizó un control inyectando ambos isótopos a tiempo cero, para comprobar que se obtiene una relación correcta entre ambos, es decir, 1:3.

El hígado proveniente de cada uno de los animales marcados, es homogeneizado y su correspondiente fracción mitocondrial obtenida por el método de Kun et al., según se describió anteriormente (457). Las fracciones microsomal y citosólica se preparan a partir del sobrenadante mitocondrial, por centrifugación del mismo a 100.000 x g durante 60 minutos. La concentración de proteína se determina por el procedimiento del biuret-deoxicolato (457) en todas las fracciones, que son almacenadas a - 20° C.

Para su contaje, tanto las diferentes fracciones hepáticas, como la OTC purificada por cromatografía de afinidad, se precipitan mediante la adición de un volumen igual al suyo de  $\text{Cl}_3\text{AcOH}$  al 10 % (p/v). Los precipitados son lavados tres veces con  $\text{Cl}_3\text{AcOH}$  al 5 % (p/v). A continuación, se redisuelven en NaOH 0,2 N, y se toman alícuotas que se transfieren a los viales del contador de centelleo. Luego se completa con agua hasta un volumen final de 1 ml, se neutraliza con HCl 1 N y se añaden 8 ml de líquido de centelleo.

La determinación de la cantidad de radiactividad incorporada en forma de  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$  a las distintas fracciones y a la OTC purificada, se efectuaba del modo siguiente: para cada muestra se determinan las cpm. detectadas en dos ventanas o canales, cuyos niveles de energía se han seleccionado de forma que en uno de ellos sólo se registren las cpm. correspondientes al  $^{14}\text{C}$ , y en el otro las de  $^3\text{H}$ , principalmente, y la menor cantidad posible de las cpm. de  $^{14}\text{C}$  que sea compatible con una aceptable eficiencia de contaje para el  $^3\text{H}$ . A continuación, y por medio de una curva estándar construida al efecto, se calcula en función de las cpm. de  $^{14}\text{C}$  presentes en la muestra, el porcentaje de cpm. registradas en el canal para  $^3\text{H}$  que corresponden al  $^{14}\text{C}$ . Finalmente, los valores de cpm. calculados para cada isótopo son transformados en dpm. corrigiendo los datos de cpm. de acuerdo con la eficacia de contaje para cada isótopo en su ventana y según el grado de inhibición de contaje o " *quenching* " de la muestra en cuestión.

#### 4.9- PROCEDIMIENTO DE INMUNIZACION.

Por el procedimiento que se describe a continuación se han obtenido anticuerpos específicos de conejo contra la OTC de hígado bovino. Se parte de la enzima purificada, que se inyecta a conejos blancos de la raza New Zeland. En una primera inyección, subcutánea y en la región cérico-dorsal, se inocula cada animal con 1 mg de la enzima disuelta en 1 ml de una emulsión que contiene a partes iguales suero fisiológico y adyuvante de Freund completo (aceite mineral que lleva en suspensión micobacterias muertas). A las tres semanas se repite el tratamiento, pero utilizando esta vez adyuvante de Freund incompleto. Una semana después de la segunda inyección de recuerdo, se toma una muestra de sangre del animal para comprobar la presencia y el nivel de anticuerpos en el suero. Si este no presentase una buena reactividad frente a la enzima pura, se esperan dos semanas más y se vuelve a repetir la segunda inyección y la toma de muestra. La identificación y valoración de los antisueros se lleva a cabo mediante las técnicas de inmunodifusión de Ouchterlony (490) y ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) (152).

Cuando el nivel de anticuerpos en suero es tal que éste da lugar a reacciones de inmunoprecipitación fácilmente observables y da reacción positiva mediante la técnica ELISA tras una dilución 1:10.000 del antisuero, se extraen de cada conejo aproximadamente 50 ml de sangre por punción intracardíaca. Tras un descanso de unos diez a quince días, estos conejos pueden ser inoculados con otra inyección de recuerdo como la anterior y así seguir obteniendo más anticuerpos.

#### 4.10.- PREPARACION DE SUERO.

Cuando se trata de una pequeña muestra de sangre (hasta 2 ml), el suero se extrae por centrifugación en tubos B-D Microtainer durante 10 minutos a 600 x g.

En el caso de volúmenes mayores, se deja coagular a temperatura ambiente la sangre durante unas dos horas, tras las que se separan la células coaguladas de las paredes del Erlenmeyer con una espátula, y se almacena en la nevera a 4° C entre doce y veinticuatro horas, para que la contracción del coágulo provoque la expulsión del suero. El sobrenadante resultante se decanta cuidadosamente y se centrifuga a 10.000 x g durante treinta minutos y a 4° C. En el caso de que el suero presentase un aspecto turbio, que se debería a la presencia de lípidos en el mismo, se volverá a centrifugar a 25.000 x g durante treinta minutos y a 4° C. El suero se divide en porciones y se conserva en el congelador a - 20° C.

#### 4.11.- PURIFICACION DE LA FRACCION DE INMUNOGLOBULINAS G.

A partir del suero, se purifican las inmunoglobulinas G (IgG) mediante fraccionamiento con sulfato amónico al 40 %. Para ello, se añaden, por cada 50 ml de suero, 25 ml de una solución saturada de sulfato amónico que ha sido, previa e inmediatamente a su uso, ajustada a temperatura ambiente a pH 7,8 con NaOH 2N. La adición se realiza lentamente y con agitación constante, esperando a que el precipitado que se forma se disuelva o distribuya completamente. Una vez que todo el volumen de la solución de sulfato amónico ha sido añadida, se continúa agitando la suspensión durante dos horas más, tras las que se centrifuga a 1.400 x g durante treinta minutos y a temperatura ambiente.

El precipitado se resuspende y disuelve en NaCl 0,15 M hasta un volumen final de 50 ml y se repite este mismo proceso de fraccionamiento con sulfato amónico por dos veces consecutivas. El último precipitado se resuspende en 25 ml de tampón borato salino y se dializa exhaustivamente frente al mismo tampón, manteniendo la temperatura a 4° C, hasta que no se observe la presencia de iones en dicho tampón. La solución dializada se clarifica por centrifugación a 1.400 x g durante treinta minutos y a 4° C. El sobrenadante obtenido contiene la fracción IgG, cuya concentración de proteína se determina por su absorción a 280 nm., utilizando el coeficiente de extinción de la fracción IgG de conejo que, para una cubeta de 1 cm. y una concentración de 1 mg/ml, es de 13,5 unidades de densidad óptica. La monoespecificidad de los anticuerpos obtenidos se comprueba mediante la técnica de inmunodetección de proteínas transferidas electroforéticamente e inmovilizadas sobre un soporte sólido, conocida como *Western blotting* (ver apartado 4.16.2.).

#### 4.12.- MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Para el análisis morfológico de las distintas preparaciones de lisosomas, se tomaron alícuotas correspondientes a los diversos métodos de obtención empleados, que se sedimentaban por centrifugación a 35.000 x g durante 60 minutos. Los sedimentos se fijaron durante 15 minutos a 4° C en tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,2, conteniendo 0,1 M sacarosa y glutaraldehído al 2 %; posteriormente, el sedimento se fraccionaba con una cuchilla en bloques de 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente, y tras otros 45 minutos de fijación en la solución anterior, los lisosomas se lavaban durante 2 horas en tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,2, conteniendo 0,1 M sacarosa. Se fijaban de nuevo durante 4 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente, con tetróxido de osmio al 2 % en agua conteniendo 1 % K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Las muestras se lavaban durante 5 minutos en solución de Ringer, y se teñían en oscuridad con acetato de uranilo al 0,5 % en agua durante 1 hora a 4° C. Seguidamente, las piezas se deshidrataban mediante inmersión en una serie de mezclas

de acetona:agua, que finalizaba con dos inmersiones en acetona pura. Finalmente, las piezas se incluían en Epon 812 por procedimientos estándar (326). Una vez polimerizada la resina de inclusión, se procedía a la obtención de secciones ultrafinas que se montaban sobre rejillas de cobre de 200 mallas cubiertas por una película de carbono. Por último, se efectuaba una tinción con citrato de plomo alcalino (531) de 30 segundos a 1 minuto a temperatura ambiente en una placa Petri cubierta y que contenía partículas de NaOH.

#### **4.13.- PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES DE ORO COLOIDAL Y DE LOS COMPLEJOS PROTEINA A-ORO COLOIDAL.**

Las soluciones coloidales de partículas metálicas se preparan por condensación de unidades micromoleculares en partículas coloidales mucho mayores que aquellas. La forma más usual de lograrlo es por condensación mediante procedimientos químicos, para formar una sustancia insoluble que permanezca dispersa en pequeñas partículas. El oro coloidal es un sol hidrofóbico, con una carga superficial neta negativa, cuya estabilidad se mantiene por repulsiones electrostáticas. El coloide es sensible a los electrolitos, y la adición de éstos altera el entorno electroquímico de las partículas de oro, produciendo su cohesión y floculación, así como un cambio de color del rojo al violeta o azul y la formación de un precipitado. Frente a esta floculación inducida por los electrolitos, el oro coloidal se puede estabilizar mediante sustancias hidrofílicas cargadas eléctricamente como, por ejemplo, las proteínas. Así, los grupos de la proteína A, cargados positivamente, interactúan, mediante fuerzas de van der Waals, con los de carga negativa situados en la superficie de las partículas de oro, y forman complejos no covalentes y estables.

El método químico más frecuentemente empleado en la preparación de las suspensiones de oro coloidal, consiste en la reducción del ácido tetracloroáurico con un agente adecuado. El número de éstos que es posible utilizar es bastante extenso, y los coloides resultantes presentan variación en cuanto a color y tamaño de partícula.

Puesto que las propiedades de la superficie del vidrio son factores importantes en la iniciación del proceso de reducción y en la reproductividad del método, se ha de tener especial cuidado en la preparación del material de vidrio y plástico que se va a utilizar. Así, éste debe de estar escrupulosamente limpio y se debe siliconizar. El procedimiento de siliconización seguido consiste en enjuagar el material de vidrio y plástico con una solución de diclorodimetilsilano al 5 % en cloroformo, dejar que se evaporen los restos del disolvente y, antes de su uso, colocarlo en una estufa a 180° C durante 2 horas (material de vidrio), o lavarlo con abundante cantidad de agua (material de plástico). La presencia de pequeños contaminantes, tales como partículas de polvo,

provocan la aparición de sombras o nebulosas en el oro coloidal. Por tanto, se debe de utilizar agua bidestilada en la preparación de todas las soluciones que, además, deben filtrarse antes de su uso, a través de una membrana filtrante de 0,45  $\mu\text{m}$ . de tamaño de poro.

Dos son los métodos que se han utilizado en este trabajo para la obtención de oro coloidal. El primero es el de Zsigmondy (712), tal y como ha sido modificado posteriormente (552). El tamaño de partícula que se obtiene varía entre 5 y 12 nm. Sobre 60 ml de agua bidestilada se añaden 2,5 ml de una solución acuosa al 0,6 % de  $\text{H}(\text{AuCl}_4) \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , y 0,5 ml de una solución etérea de fósforo blanco (ésta constituye el reactivo reductor, y se prepara mezclando una parte de fósforo blanco saturado con éter y cuatro partes de éter dietílico). La mezcla anterior se agita y se deja reposar durante quince minutos a temperatura ambiente, desarrollándose durante este tiempo un color marrón rojizo. A continuación, la solución se calienta suavemente con un mechero hasta que aparece el típico color rojo vinoso del oro coloidal. Finalmente, se ajusta a pH 5,6 mediante la adición de carbonato potásico 0,2 M.

El segundo procedimiento es el de Frens (173), que utiliza citrato trisódico para reducir el ácido tetracloroáurico, y que produce coloides en un tamaño de partícula que oscila entre 15 y 150 nm., dependiendo de la cantidad de citrato que se añada. Para la preparación de oro coloidal con un diámetro de partícula alrededor de 15 nm. se calientan cien mililitros de una solución acuosa de ácido cloroáurico al 0,01 %, y cuando comienzan a hervir se añaden rápidamente 4 ml de una solución acuosa de citrato trisódico al 1 %. Inmediatamente aparece un ligero tono azul. Tras cinco minutos de ebullición, la reducción se ha completado, tal y como indica el color rojizo de la solución. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se ajusta el pH a 5,6 con carbonato potásico 0,2 M.

El ajuste del pH se lleva a cabo tomando alícuotas de unos 3 ml y añadiendo cinco gotas de una solución acuosa al 1 % de polietilenglicol (peso molecular 20.000) (PEG-20.000) antes de sumergir el electrodo del pHmetro. La adición del polietilenglicol es esencial, ya que las soluciones no estabilizadas de oro coloidal pueden obturar los poros del electrodo.

Para la preparación de los complejos proteína A-oro, se disuelve la cantidad necesaria de proteína A altamente purificada en 0,1-0,2 ml de agua y en el interior de un tubo de ultracentrífuga. Previamente hay que calcular cuál es la cantidad de proteína A necesaria para estabilizar la solución de oro coloidal que se va a emplear. Este cálculo se efectúa por valoración de un volumen de la solución de oro coloidal con diferentes cantidades de proteína A, e inducción de la floculación mediante la adición de NaCl (concentración final 5 %). A continuación, la disolución de proteína A se mezcla, en la proporción calculada, con 10 ml de la suspensión de oro coloidal, se deja reposar tres minutos y se añade 1 ml de una solución acuosa al 1 % de

PEG-20.000. Luego se centrifuga todo, en un rotor angular 50Ti durante una hora y a 4° C, a 100.000 x g para las partículas de oro coloidal con un tamaño aproximado de 5 nm., o bien a 15.000 x g para las partículas de oro coloidal alrededor de 15 nm. El sobrenadante se desecha y el sedimento, que es de un color rojo oscuro y está constituido por los complejos proteína A-oro, se resuspende en 6 ml de agua que contienen 0,5 mg/ml de PEG-20.000 y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. De nuevo el precipitado se resuspende en 0,6 ml de agua que contengan 0,5 mg/ml de PEG-20.000, y se almacena, durante no más de dos semanas, y a 4° C, hasta su uso.

#### **4.14.- PROCEDIMIENTOS INMUNOCITOQUÍMICOS.**

##### **4.14.1.- TÉCNICA DEL MARCAJE SIMPLE.**

Pequeños fragmentos de hígado de rata se fijan por inmersión en una solución de glutaraldehído al 0,5 % en PBS durante dos horas a 4° C, y se incluyen en Lowicryl K4M por procedimientos estándar (330). Los cortes (600-800 Å) se montan sobre rejillas de níquel (200 mallas) ya recubiertas de Parlodión y una película de carbón. Inmediatamente después, la rejilla se deja flotar, con la cara que contiene los cortes hacia abajo, en gotas de unos 50 µl de las siguientes soluciones mantenidas a 20° C y en una cámara húmeda:

- 1.- 1 % ovoalbúmina en PBS durante quince minutos, para bloquear los sitios de unión inespecífica.
- 2.- Fracción IgG (del antisuero contra la enzima en cuestión o del suero control) disuelta en PBS a una concentración de 0,15 mg de proteína/ml (concentración óptima deducida empíricamente en experimentos previos y que proporcionaba la mejor relación entre intensidades de marcaje específico e inespecífico) durante dos horas.
- 3.- Las rejillas se lavan abundantemente con PBS y se vuelven a dejar flotar, durante una hora, en una solución del complejo proteína A-oro diluida en PBS de forma que su densidad óptica a 520 nm. sea de: 0,04 para los complejos formados con un tamaño de oro coloidal alrededor de 15 nm., o de 0,002 para los que contienen partículas de oro coloidal alrededor de 5 nm. Ambos valores de densidad óptica se deducen empíricamente en experimentos previos con objeto de obtener un bajo nivel de marcaje inespecífico.

4.- Las rejillas se vuelven a lavar abundantemente con PBS y luego con agua bidestilada, sin dejar nunca que por ningún motivo se queden secas.

Finalmente, las secciones se tiñen durante cinco minutos con una solución acuosa al 5 % de acetato de uranilo y durante 1 minuto con citrato de plomo alcalino.

Todas las muestras se procesan simultáneamente, incluidos los distintos tipos de controles citoquímicos efectuados, que son:

- a) Incubación con la fracción IgG del conejo antes de ser inmunizado.
- b) Omisión de la incubación con la fracción IgG.
- c) Incubación con el antisuero específico contra la enzima en cuestión, seguido de una hora de incubación con proteína A no marcada (0,15 mg/ml en PBS), y seguido del paso de incubación con el complejo proteína A-oro coloidal.
- d) Incubación con el antisuero tratado previamente con un exceso del antígeno correspondiente durante 2 horas a 20° C, seguido de la incubación con el complejo proteína A-oro coloidal.

#### 4.14.2.- TÉCNICA DEL DOBLE MARCAJE.

El tejido se fija e incluye tal y como se ha descrito en el epígrafe anterior. Sin embargo, los cortes no se montan sobre las rejillas, sino que se dejan flotar en las mismas soluciones descritas en el apartado anterior, teniendo especial cuidado de que no se moje la otra cara de la sección y utilizando uno de los anticuerpos y el complejo proteína A-oro formado con las partículas de oro coloidal de uno de los dos tamaños indistintamente. La transferencia de las secciones entre las distintas soluciones se efectúa mediante un aro de platino y, finalmente, se dejan flotar en un vaso de precipitados grande lleno de agua bidestilada. A continuación, se recuperan los cortes tomándolos desde abajo con las rejillas de níquel recubiertas de la película de carbón. De esta forma, la sección del tejido tiene dos superficies o caras: la expuesta, o cara A, que corresponde a la que está en contacto con la malla, y la B, que no lo está.

Luego se invierte la rejilla de forma que la sección de tejido quede en la parte inferior, y se repiten todas las operaciones con la cara B del corte, empleando esta vez el otro anticuerpo y

complejo proteína A-oro de tamaño diferente al anterior. Por último, se lleva a cabo la tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo alcalino sobre la cara B.

Tanto para las muestras como para los controles, se tomaron treinta fotografías al azar a 25.000 (para partículas de oro de 15 nm.) ó 50.000 aumentos (para partículas de oro de 5 nm.). El área ( $S_i$ ) de las mitocondrias y de la porción restante de la célula hepática se determina con un analizador de imagen semiautomático Leitz A.S.M. A continuación, se cuenta el número de partículas de oro ( $N_i$ ) sobre cada uno de los compartimientos celulares y se calcula la densidad de marcaje ( $N_i/S_i$ ).

#### 4.15.- RADIOYODURACION DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.

Entre los distintos métodos existentes para marcar proteínas, la yoduración es un método rápido y que proporciona muestras con elevada actividad radiactiva específica. Asimismo, hay diversos procedimientos para llevar a cabo una yoduración eficiente de proteínas. En este trabajo se ha utilizado el método de radioyoduración en fase sólida, empleando el reactivo de la casa Bio-Rad denominado " Enzymobead ", y que proporciona las condiciones de marcaje más suaves que se pueden conseguir actualmente. Este procedimiento se basa en una yoduración enzimática, lo que lo diferencia de los métodos clásicos de sustitución oxidativa. Consiste en preparaciones inmovilizadas de Lactoperoxidasa y Glucosa Oxidasa, cuidadosamente mezcladas para proporcionar un sistema de actividad enzimática óptima. La fase sólida que actúa de soporte para ambas enzimas está constituida por esferas hidrofílicas de varias micras de diámetro.

El mecanismo por el que transcurre la yoduración es el siguiente: al añadir glucosa, Na [ $^{125}$ I] y proteína a una suspensión del reactivo, la Glucosa Oxidasa inmovilizada genera de forma continua una pequeña, pero estacionaria, cantidad de peróxido de hidrógeno. A su vez, la Lactoperoxidasa cataliza la oxidación del yoduro marcado a yodo, el cual reacciona con la proteína provocando su radioyoduración.

Este sistema presenta varias ventajas sobre el método de la cloramina T, ya utilizado anteriormente (457), y otros métodos enzimáticos solubles. La reacción con la cloramina T es difícil de controlar, puesto que grupos lábiles, tales como metioninas y cisteínas, son oxidados por el reactivo y provocan diversos grados de desnaturalización de la muestra, lo que exige tiempos de reacción extremadamente cortos. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno generado de forma constante conforme procede la yoduración, evita condiciones fuertemente oxidantes y la necesidad de un control exacto del tiempo de reacción. Este deja de ser un parámetro crítico al utilizar el reactivo " Enzymobead ", y se convierte en una variable susceptible de ser modificada a voluntad

hasta alcanzar el nivel de actividad específica requerido. Además, este sistema enzimático es activo en un amplio rango de pH, desde 5 a 8,5, permitiendo variaciones en el pH del medio de reacción. Así, se puede lograr una optimización de las condiciones del proceso para nuestro caso particular, tanto en lo que se refiere a la estabilidad de la proteína que va a ser yodurada, como en la disponibilidad de los residuos de tiroxina de aquella.

Por otro lado, esta presentación en fase sólida elimina la introducción de contaminantes en el medio de reacción, lo que tiene lugar cuando se utilizan preparaciones comerciales de enzimas solubles. Aquí la simple centrifugación, la filtración sobre membrana o en gel, permiten una eliminación cuantitativa del reactivo, al mismo tiempo que detiene la reacción, evitando la necesidad de añadir un agente con este fin. El tamaño y la densidad de las microesferas es tal que, tras una mezcla inicial, se crea una suspensión estable a lo largo del tiempo de reacción, eliminando la necesidad de una agitación constante y aproximando la cinética de la reacción a la que se consigue con enzimas solubles.

El procedimiento que se ha seguido es el siguiente:

- 1.- Se rehidrata el reactivo en 0,5 ml de agua al menos una hora antes de su uso y se almacena a 4° C.
- 2.- Se introducen dentro de un tubo desechable:
  - 300  $\mu$ l. de tampón fosfato potásico 0,2 M, pH 7,5, conteniendo 1 mg de OTC.
  - 10  $\mu$ l. de Na [<sup>125</sup>I] conteniendo 0,25 mCi.
  - 100  $\mu$ l. de una solución acuosa al 1 % de  $\beta$ -D-glucosa.
  - 200  $\mu$ l del reactivo Enzymobead.
- 3.- Se mezclan todos los reactivos y se deja que la radioyoduración transcurra durante una hora a 22° C.
- 4.- La reacción se detiene centrifugando el tubo a 1000 x g durante 10 minutos y sometiendo el sobrenadante a un proceso de filtración sobre gel, tal y como se procede para el desalado de las preparaciones purificadas de OTC, y que ya ha sido anteriormente descrito (457).

Debe tenerse muy presente que la azida sódica, de uso muy común en el laboratorio como agente bacteriostático, es un potente inhibidor de la Lactoperoxidasa, y, por tanto, todos los tampones y soluciones de proteína deben de estar absolutamente exentos de aquella. También se

debe evitar la presencia de agentes reductores, tales como los mercaptanos, que compiten con el mantenimiento de un bajo nivel de peróxido de hidrógeno.

#### **4.16.- TECNICAS ELECTROFORETICAS.**

##### **4.16.1.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA/DODECIL SULFATO SÓDICO (PAGE/SDS).**

Se ha seguido el procedimiento descrito por Laemmli (351). Las muestras se preparaban mezclándolas con un volumen igual al de ellas de tampón de muestra para electroforesis, y colocando la mezcla resultante en un baño de agua hirviendo durante cuatro minutos. El tamaño de los geles era de 14 x 16 x 0,15 cm. (longitud x anchura x espesor), y constaban de dos zonas: una superior de mayor tamaño de poro (3 % de acrilamida y 2 cm. de longitud) cuyo efecto es el de concentrar la muestra, y otra inferior cuyo menor tamaño de poro (10 % de acrilamida y 10-12 cm. de longitud) produce el efecto de separación de las subunidades de las proteínas en función de su peso molecular. La electroforesis se realizó bajo condiciones de corriente continua, aplicando 10 mA por gel y durante 16-20 horas. El tampón de electroforesis contenía 28,8 g/l de glicina y 1 g/l de SDS, ambos disueltos en Tris-HCl 50 mM, pH 8,4. Cuando se requería, la tinción de los geles se realizó con azul de Coomassie R-250 al 0,1 % (p/v) en una solución de agua, metanol y ácido acético en una proporción volumétrica de 60:30:10.

##### **4.16.2.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEINAS TRANSFERIDAS ELECTROFORETICAMENTE E INMOVILIZADAS SOBRE UN SOPORTE SÓLIDO (WESTERN BLOTTING).**

La transferencia de las muestras (mitocondrias y enzimas purificadas) desde el gel de PAGE/SDS en el que han sido separadas, hasta la hoja de nitrocelulosa que se utiliza como soporte sólido, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del aparato de electrotransferencia empleado (Trans-blot Cell, de Bio-Rad Laboratories). Se comienza por incubar durante 30 minutos, tanto el gel de PAGE/SDS como la hoja de nitrocelulosa, en el mismo tampón en el que se efectúa la transferencia electroforética, y que contiene:

- 200 mM Tris-Base.
- 150 mM glicina.
- 20 % (v/v) metanol.

Seguidamente, se colocan encima del cátodo y por este orden: una hoja de polietileno poroso (Scotch-Brite) de 1,6 mm de espesor, una hoja de papel de filtro (Whatman 3MM), el gel, la hoja de nitrocelulosa y, por último, otra hoja de polietileno poroso, cuidando siempre de eliminar cualquier burbuja atrapada entre las distintas hojas. La transferencia se lleva a cabo a 90-100 voltios durante 120-150 minutos.

Para la inmunodetección de las enzimas contra las que se habían preparado los diversos anticuerpos, primero se incubaba la hoja de nitrocelulosa, durante 30 minutos y a 37° C, en el medio de bloqueo de sitios de unión inespecífica, que contiene:

- 5 % (p/v) leche descremada en polvo.
- 0,02 % (p/v) azida sódica.

Posteriormente, se volvía a incubar la hoja de nitrocelulosa, durante 2 horas y a temperatura ambiente, en una nueva solución del medio de bloqueo que, además, contenía el anticuerpo cuya especificidad se quería ensayar, y diluido de acuerdo con los resultados de su ensayo previo mediante la técnica ELISA. Inmediatamente después, la hoja de nitrocelulosa se lavaba, dos veces y durante 10 minutos, en la solución de lavado: tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 que contiene 150 mM NaCl, y se volvía a incubar en una solución del medio de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente, con el segundo reactivo inmunológico que, en este caso, era una fracción de inmunoglobulinas G de cabra anti-IgG de conejo y unidas covalentemente a peroxidasa de rábano, que se diluía según las instrucciones del proveedor (Bio-Rad Laboratories). Tras la incubación, se lavaba de nuevo la hoja de nitrocelulosa con la solución de lavado, y se añadía el reactivo de desarrollo de color, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Bio-Rad Laboratories).

#### 4.17.- FLUOROGRAFIA.

La autorradiografía es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la detección de compuestos marcados radiactivamente. Sin embargo, su uso se ha visto restringido por la necesidad de utilizar, bien isótopos de una energía de emisión relativamente alta, o bien tiempos de exposición considerablemente largos.

Bonner y Laskey (68) han desarrollado un método para la detección en geles de poli(acrilamida) de proteínas y ácidos nucleicos marcados con tritio, denominado autorradiografía de centelleo o fluorografía. Esta técnica consiste en deshidratar el gel en dimetil sulfóxido, empapararlo en una solución de PPO en el mismo solvente (puesto que el PPO es insoluble en agua), secarlo y exponerlo a placas de rayos X. Estas no se impresionan por las partículas emitidas por el isótopo

radiactivo, sino por la luz que se genera al interaccionar aquellas con el PPO. El método es diez veces más sensible que la autorradiografía convencional cuando se aplica a la detección de proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$  o  $^{14}\text{C}$ .

El procedimiento es el siguiente: después de la electroforesis, los geles, que se pueden teñir o no según se desee, deben de fijarse por el procedimiento normalmente utilizado. A continuación se sumerge el gel en DMSO (200 ml para un gel de dimensiones 14 x 16 x 0,15 cm.) durante treinta minutos. En este primer baño se puede utilizar el DMSO que ya haya sido previamente usado en el siguiente paso. Este consiste en sumergir de nuevo el gel en DMSO que no haya sido utilizado, durante otros treinta minutos; el DMSO utilizado en este paso se recupera para ser usado en el paso anterior en posteriores experimentos. Después el gel se empapa completamente con una solución de PPO al 22,2 % (p/v) en DMSO y durante tres horas. Se saca el gel de la solución anterior y se sumerge durante una hora en un volumen de agua veinte veces superior al suyo.

El paso siguiente consiste en secar el gel. Para ello se puede utilizar cualquiera de los aparatos existentes en el mercado. La técnica que se ha utilizado, aunque menos sofisticada, también da excelentes resultados. Consiste en extender sobre un cristal de 16,5 x 24 x 0,2 cm. dos hojas de papel de celofán, cuyas dimensiones sean ligeramente superiores a las del cristal que se va a utilizar como soporte, y que han sido previamente empapadas por inmersión, en una solución que contenga:

- 10 % (v/v) ácido acético glacial.
- 2,5 % (v/v) glicerol.
- 10 % (v/v) isopropanol.

Se extiende una de las hojas sobre el cristal, evitando la formación de arrugas y burbujas de aire entre ambos y plegando los extremos sobrantes por debajo del cristal. A continuación, se deposita el gel, y sobre él se extiende la segunda hoja de celofán procurando igualmente que desaparezcan las burbujas de aire, las arrugas y la mayor cantidad posible de agua que haya retenido el gel. Al igual que con la primera hoja, se pliegan los extremos que sobresalen por debajo del cristal.

En esta forma se deja secar al aire el gel durante por lo menos veinticuatro horas. Una vez seco, se separa el cristal cortando el celofán mediante una cuchilla. Después, y trabajando en completa oscuridad, se coloca el gel ya perfectamente seco entre dos placas de rayos X (Kodak X-Omat X S5) de 18 x 24 cm. El conjunto se introduce dentro de una caja con placas reflectantes y que se comercializa especialmente para estos usos (Kodak X-Omatic Regular). Esta caja, una vez sellada, se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta que se vayan a visualizar los resultados mediante el revelado de

las placas. Con este fin, se deja que la caja que las contiene alcance la temperatura ambiente, para evitar que el gel quede adherido a las placas. En oscuridad completa, y teniendo mucho cuidado en no mover más que la placa que va a ser retirada, se procede a revelarla por inmersión durante cinco minutos en la solución de revelado que contiene: 1,1 g de Elon (Kodak), 36,0 g de sulfito sódico anhidro, 4,4 g de hidroquinona, 65,0 g de carbonato sódico cristalino, 2,0 g de bromuro potásico y agua bidestilada hasta 500 ml. Al mismo tiempo que se retira una placa para ser revelada es posible colocar otra en su lugar con objeto de, una vez vistos los resultados obtenidos con la primera, poder elegir un tiempo de exposición más adecuado. La placa revelada se enjuaga con agua y se sumerge en una solución fijadora comercial (Agfa) durante otros cinco minutos. Por último se lava con abundante agua y se deja secar a temperatura ambiente.

#### 4.18.- PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE VANADATO.

Las soluciones de ion vanadato se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Goodno (201). Como material de partida se utilizó  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (aunque también puede emplearse  $\text{V}_2\text{O}_5$ ) que se disuelve en agua a una concentración aproximada de 0,2 M. Se añade HCl 6 M hasta llevar el pH a 10. A continuación, es necesario hervir la solución anterior para destruir las especies poliméricas de color amarillo, tales como el ion  $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$  (508).

La determinación de la concentración resultante se lleva a cabo espectrofotométricamente, tras una dilución volumétrica de la solución concentrada, utilizando la longitud de onda de máxima absorción, 265 nm., y el correspondiente coeficiente de extinción molar, que, según Goodno (201), vale  $\epsilon = 2.925 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

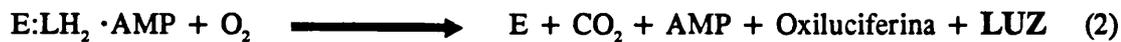
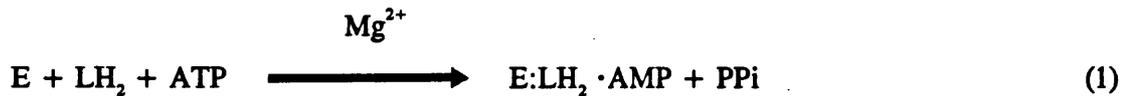
Una vez conocida la concentración real de ion vanadato, se prepara una dilución volumétrica en tampón MES-NaOH 0,2 M pH 5,5 cuya concentración final sea 10 mM, y a partir de la que se toman alícuotas para el medio de incubación. No obstante, esta dilución se realiza inmediatamente antes de llevar a cabo el ensayo, para evitar al máximo la polimerización del ion vanadato, que es dependiente del pH.

#### 4.19.- DETERMINACION DE ATP POR BIOLUMINISCENCIA.

El primero en descubrir que era posible inducir emisión de luz a partir de un extracto de luciérnagas por adición de ATP fue McElroy (402) en 1947 quien, además, observó que la emisión de luz era proporcional a la cantidad de ATP añadido. La primera aplicación *in vitro* de las reacciones de bioluminiscencia para determinar ATP y un cierto número de sustratos y enzimas

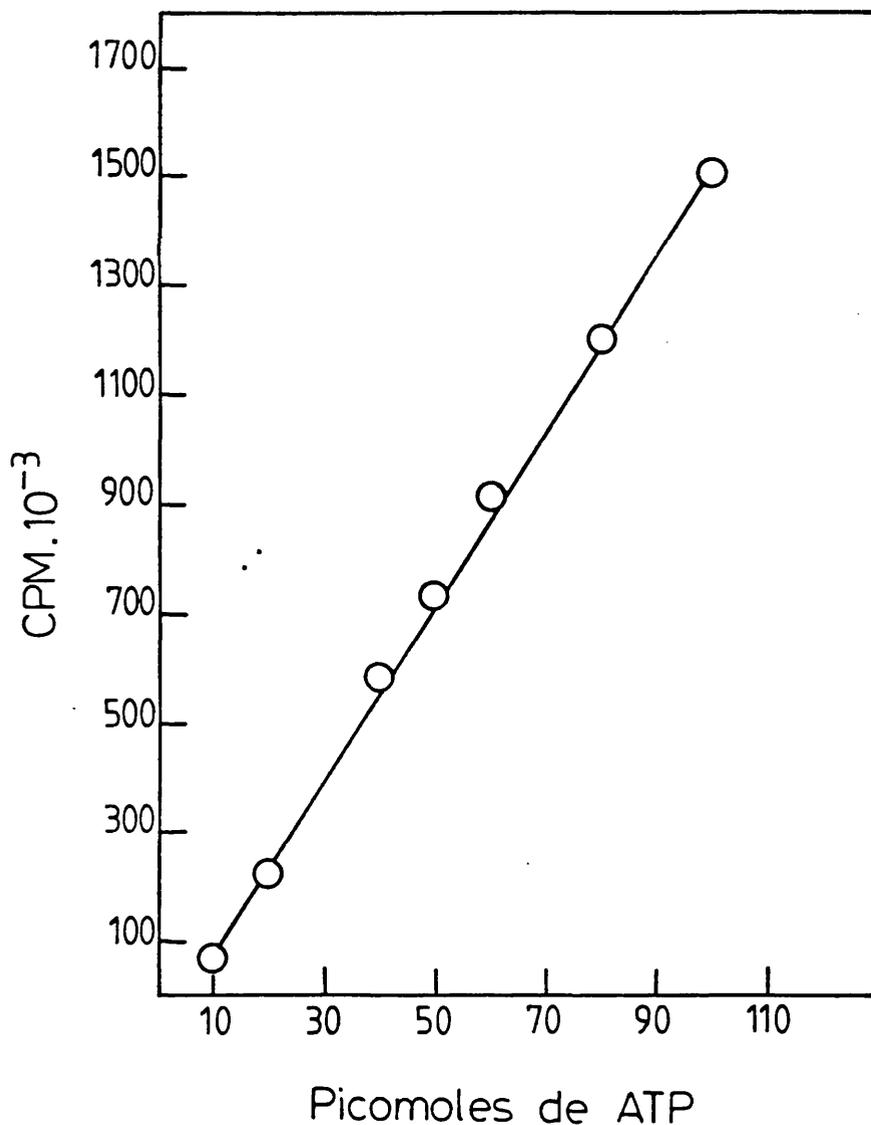
metabólicamente relacionadas con aquel, la realizaron Strehler & Totter (616) cinco años más tarde. Desde entonces, estos tres investigadores han contribuido notablemente al conocimiento del mecanismo y aplicación de la bioluminiscencia.

El ensayo de ATP por bioluminiscencia se basa en las siguientes reacciones catalizadas por la luciferasa:



La reacción (1) constituye el paso inicial de activación, que transcurre a través de la formación del complejo E-luciferina (LH<sub>2</sub>) y ATP. Esta reacción es reversible, aunque el equilibrio se encuentra bastante desplazado hacia la derecha, y necesita la presencia de iones divalentes, tales como el magnesio. A continuación, el complejo E-luciferil adenilato reacciona irreversiblemente con el oxígeno molecular, reacción (2), para producir un cuanto de luz, AMP, CO<sub>2</sub> y oxiluciferina, que es un potente inhibidor no competitivo de la reacción de luminiscencia. La constante de Michaelis para el ATP es 50 μM a pH 7,4. A concentraciones mucho menores, la velocidad de la reacción total es proporcional a la concentración de ATP, en cuya presencia se alcanza la velocidad máxima de forma casi inmediata y luego disminuye, esencialmente, siguiendo una cinética de primer orden con respecto al tiempo. Por tanto, la determinación de ATP implica la medida de una intensidad de luz emitida por una solución de luciferasa unos pocos segundos después de la adición de la disolución que contiene el ATP. La intensidad inicial de la luz emitida es proporcional a la concentración de ATP en unas muy precisas y definidas condiciones. Las que se han empleado en el presente trabajo han sido descritas por Kimmich et al. (314), quienes utilizan como instrumento de medida un contador de centelleo líquido.

Las alícuotas procedentes de los tubos de incubación de las muestras cuyo contenido en ATP se quiere determinar, se precipitan al diluirlas 1:4 con ácido perclórico 0,1 N. Tras centrifugar, alícuotas provenientes del sobrenadante se diluyen con tampón ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico/NaOH (Hepes-NaOH) 0,2 M, pH 9,0. De la solución resultante es de donde se toman las muestras para determinar ATP.



**FIGURA 6.- CURVA PATRON DE DETERMINACION DE ATP POR BIOLUMINISCENCIA.**

Se prepara por pesada directa una solución patrón 0,1 M de ATP, que se ha llevado hasta pH 7,0 mediante la adición de hidróxido sódico, se distribuye en alícuotas y se conserva a -20° C. Inmediatamente antes de su uso se descongela, se diluye en tampón Hepes/NaOH 0,2 M, pH 9,0 y a partir de esta dilución se toman alícuotas para la determinación de la intensidad de luminiscencia, según se detalla en el apartado 4.19 de Métodos.

La intensidad de la luminiscencia se mide, como ya hemos dicho, utilizando un contador de centelleo líquido. La determinación se lleva a cabo en viales de centelleo de plástico traslúcido de 4 ml. El medio de ensayo contiene:

- Tampón arseniato sódico pH 8,0	5 $\mu$ M.
- MgSO <sub>4</sub>	4 $\mu$ M.
- Tampón glicil-glicina pH 8,0	20 $\mu$ M.

Se colocan en el vial entre 945 y 900  $\mu$ l. del medio de ensayo y entre 5 y 50  $\mu$ l. de la muestra cuyo contenido en ATP se quiere determinar. Seguidamente se añaden 50  $\mu$ l. del reactivo luciferasa-luciferina. El vial se tapa, se agita suavemente, se introduce en la plataforma de muestra del contador y se hace descender a la cámara de detección. Exactamente a los veinte segundos de la adición del reactivo luciferasa-luciferina se inicia el ciclo de conteo, con la ventana del detector totalmente abierta, que dura veinticuatro segundos. El reactivo luciferasa-luciferina utilizado es el que comercializa en viales prepesados la casa Sigma y que contiene, previamente mezcladas, luciferasa de luciérnaga purificada, luciferina sintética, albúmina de suero bovino, MgSO<sub>4</sub>, EDTA y tampón Tris-succinato, todo ello en forma de polvo liofilizado. Se reconstituye en el medio de ensayo hasta una concentración final de 8 mg/ml y se conserva entre 0° y 4° C. En cada experimento se construye una curva patrón para determinar la relación entre el número de cuentas por minuto y la concentración de ATP (ver Fig. 6). Para verificar la validez de las medidas en las muestras, se utilizaban patrones internos, añadiendo cantidades conocidas de ATP a dichas muestras.

#### 4.20.- CONDICIONES DE INCUBACION.

En los experimentos de inactivación y proteólisis de la OTC, las condiciones particulares de cada ensayo se describen en las correspondientes Tablas y Figuras. No obstante, y de forma general, el procedimiento estándar utilizado ha sido el siguiente: todas las incubaciones se realizan en tubos cónicos Eppendorf de 1,5 ml y a 37° C. El volumen final fue siempre de 0,1 ml. Se adicionó albúmina de suero bovino (BSA) en cantidad suficiente para igualar el contenido en proteína hasta una concentración final de 10 mg/ml. A los intervalos de tiempo indicados, se tomaban alícuotas para ensayar la actividad enzimática residual, que se diluyen en el tampón de ensayo de actividad enzimática de OTC enfriado en un baño de hielo. Todos los valores representan, por lo menos, la media de dos a tres experiencias distintas, realizadas cada una de ellas en doble. Las determinaciones de actividad enzimática de OTC presentan coeficientes de variación dentro del intervalo comprendido entre el 2 y el 8 %.

## **5.- RESULTADOS**

### **5.1.- PURIFICACION DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE TERNERA.**

En la Tabla 5, se presentan los resultados típicos de una purificación. El procedimiento, tal y como se aprecia, resulta muy sencillo en tanto en cuanto sólo hace uso de fraccionamientos mediante sulfato amónico y una etapa de calentamiento, no requiere ningún paso cromatográfico y puede ser abordado incluso por personal poco familiarizado con las técnicas de purificación de enzimas. No obstante, y en sus primeras etapas, el método puede parecer algo enojoso debido al gran volumen que hay que manipular. Es preciso llegar a un compromiso entre la cantidad de enzima que se necesita y los medios materiales y humanos de que se disponga. En nuestro caso, hemos partido de 750 g de hígado, lo cual ya arroja un primer volumen a centrifugar de aproximadamente tres litros, que es el máximo que dos personas pueden manejar trabajando al unísono con tres centrífugas Sorvall dotadas de rotores GSA, que son los que mayor volumen admiten de entre los que disponíamos. Una semana de trabajo es el tiempo que se invierte en completar la purificación.

Tanto el rendimiento global de las purificaciones, como la actividad específica de la enzima que se obtiene, son menores que las originalmente descritas por Marshall y Cohen (380). La diferencia en el rendimiento se origina en las tres primeras etapas. Así, nuestra referencia o punto de partida es muy superior al de estos autores, puesto que nuestra homogeneización rinde unas 0,41 unidades de OTC/mg de hígado fresco, mientras que Marshall y Cohen obtienen 0,22 unidades de OTC/mg de hígado fresco. Sin embargo, nuestra extracción con CTAB resulta ser un 30 % menos eficiente. Se ha comprobado que, en ningún caso, estas diferencias se deben a una rotura de las mitocondrias durante el proceso de homogeneización; en realidad el procedimiento utilizado respeta al máximo todos los orgánulos celulares y, así, en el sobrenadante de la primera centrifugación del homogeneizado apenas existe actividad enzimática de OTC o CPS I. La razón de esta discrepancia podría radicar en el hecho de que no sea adecuado, a pesar de lo que se indica en el artículo original, congelar la muestra una vez finalizado el paso número 1, puesto que en ella la OTC está muy diluida y en presencia de un detergente, condiciones bajo las cuales es probable que se pueda producir una parcial desnaturalización de la enzima. Además, da lugar a períodos de descongelación muy largos, durante los cuales pueden actuar las proteasas lisosomales, puesto que el pH del tampón de dilución es 6,0.

El resto de los pasos arrojan resultados similares para, finalmente, llegar a obtener 100 mg de OTC/Kg de hígado fresco, mientras que Marshall y Cohen obtienen 155 mg de OTC/Kg de hígado fresco.

**TABLA 5.- RESUMEN DE LA PURIFICACION DE OTC DE HIGADO DE TERNERA.**

FRACCION	VOLUMEN TOTAL (ml)	PROTEINA (mg/ml)	ACTIVIDAD (U/ml)	PROTEINA TOTAL (g)	ACTIVIDAD TOTAL (U · 10 <sup>-5</sup> )	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)	RENDIMIENTO (%)
HOMOGENEIZADO	3.000	58	103	174	3,09	1,8	100
EXTRACTO DE CTAB	2.500	11	81	27,5	2,03	7,4	66
1,8-2,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 6,0	525	13	248	6,9	1,30	19	42
1,7-2,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 6,0	368	12	426	4,4	1,40	32	45
CALENTAMIENTO, 65° C, 1'	52	10,2	1.600	0,51	0,83	163	27
1,7 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 6,0	45	6,5	1.622	0,29	0,73	248	24
2,3-2,8 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 8,24	12	9,2	3.100	0,11	0,37	338	12
1,7 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 6,0	5	15	6.200	0,075	0,31	410	10

Se partió de 750 g. de hígado. La proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. y 260 nm. (457). El volumen total se refiere al obtenido al final de cada paso. La medida de la actividad enzimática se efectuó tal y como se describe en el apartado 4.2. de Métodos.

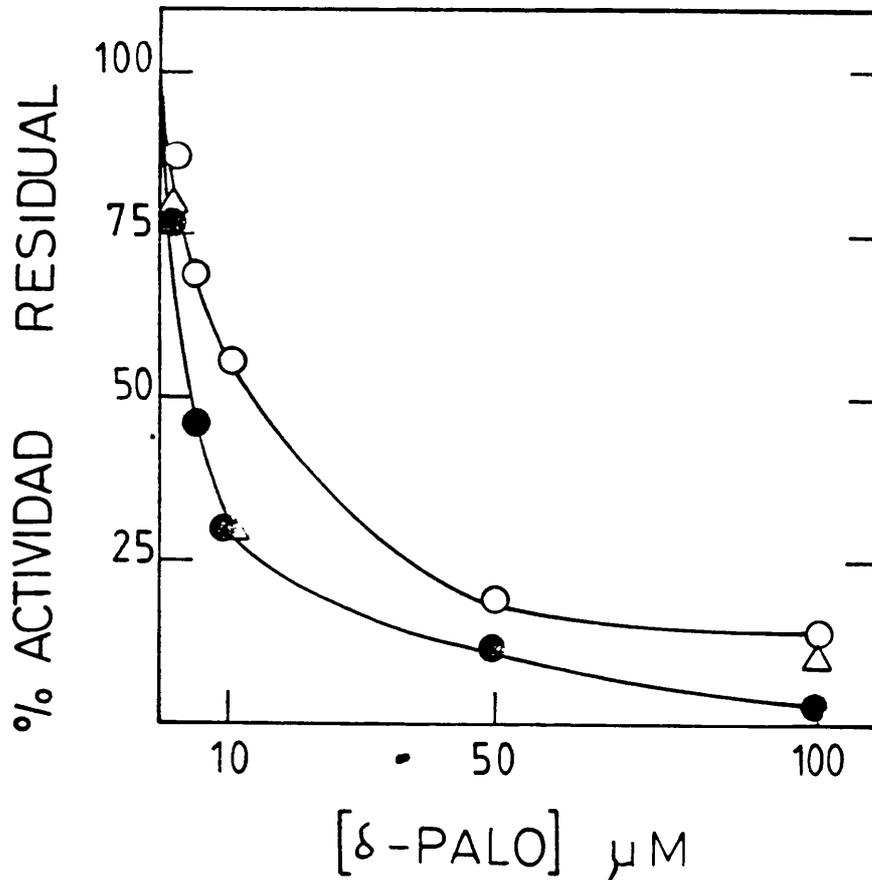
En cuanto a las diferencias observadas en las actividades específicas, estas no pueden deberse a una falta de homogeneidad de la fracción final obtenida, puesto que al someterla a electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS, aparece una única banda, tanto si el sistema de visualización es por tinción con Coomassie Blue, como si se utilizan procedimientos mucho más sensibles, como el marcaje con Na [<sup>125</sup>I] y posterior fluorografía (ver Figura 24). Además, esta discrepancia es semejante a la observada y descrita por otros autores para la enzima de rata (99), sin que, por el momento, exista ninguna explicación plausible para la misma.

## 5.2.- PURIFICACION DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE HIGADO DE RATA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Una vez efectuada la síntesis del  $\delta$ -PALO, se ensayó la preparación en relación con su poder de inhibición sobre la actividad de la OTC. Tal y como muestra la Figura 7, bajo condiciones idénticas a las descritas por Mori et al. (423), el producto de la síntesis no alcanzaba los valores de inhibición descritos por estos autores. Tras la posterior purificación del  $\delta$ -PALO por cromatografía preparativa sobre papel, se puede apreciar la coincidencia entre los datos de la bibliografía y los obtenidos con el  $\delta$ -PALO utilizado en este trabajo.

El análisis por cromatografía analítica en capa fina de la preparación sin purificar (datos no presentados), reveló la presencia de dos sustancias con distintos  $R_f$  cuando se efectuaba una tinción específica para compuestos que contienen fósforo, mientras que sólo una de ellas se podía visualizar cuando la tinción se realizaba con ninhidrina. Es probable que esta contaminación sea debida al  $\alpha$ -PALO, que respondería a las características descritas y que además no es capaz de inhibir a la OTC.

La caracterización electroforética de la OTC purificada por cromatografía de afinidad, tal y como ilustra la Figura 8, demuestra el alto grado de purificación que se alcanza con este procedimiento, confirmando su idoneidad para ser empleado como técnica de purificación de OTC, especialmente cuando se haya marcado radiactivamente *in vivo*. Así, partiendo de homogeneizados de hígado de rata, se recupera entre el 70 y el 80 % de la actividad de OTC en los eluidos de carbamil fosfato y la actividad específica de la enzima purificada oscila alrededor de 280 U/mg.



**FIGURA 7.- INHIBICIÓN DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA POR  $\delta$ -N-FOSFOACETIL L-ORNITINA.**

OTC purificada de vaca ( $43 \mu\text{U}$ ) se incubó, durante 10 minutos y a  $37^\circ \text{C}$ , en un medio que contenía: 50 mM tampón Hepes/NaOH pH 7,2, 5 mM L-ornitina, 5 mM carbamil fosfato y las cantidades indicadas de  $\delta$ -N-fosfoacetil L-ornitina ( $\delta$ -PALO). A continuación, se tomaron alcuotas para determinar la actividad enzimática residual, según se describe en el apartado 4.2. de Métodos.

- OTC +  $\delta$ -PALO sin purificar
- OTC +  $\delta$ -PALO purificado por cromatografía preparativa sobre papel
- △— Datos descritos por Mori et al. (423)



**FIGURA 8.- ELECTROFORESIS DE LA OTC DE HIGADO DE RATA PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.**

La electroforesis se efectuó según se describe en el apartado 4.16. de Métodos. El pocillo 1 contiene los patrones de peso molecular (BSA 66.000, Ovoalbúmina 45.000, Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa 36.000, Anhidrasa Carbónica 29.000 y Tripsinógeno 24.000), el pocillo 2 OTC de rata purificada según Lusty et al (375), y los pocillos 3 y 4 OTC de rata, 20 y 15  $\mu\text{g}$  respectivamente, purificada a partir de una fracción mitocondrial por cromatografía de afinidad mediante  $\delta$ -PALO inmovilizado sobre Sepharose 6B.

### 5.3.- PREPARACION DE LISOSOMAS.

Los métodos más utilizados para el aislamiento de lisosomas se basan en procedimientos de fraccionamiento celular ampliamente utilizados, como son la centrifugación diferencial y la centrifugación isopícnica en gradiente de densidad. Sin embargo, la preparación de fracciones lisosomales puras es una tarea difícil, puesto que su rango de densidades de equilibrio es ligeramente superior al de las mitocondrias, pero se solapa con él de forma sustancial, y prácticamente igual al de los peroxisomas (48, 101).

Los lisosomas presentan la mayor movilidad anódica de cuantos orgánulos se encuentran en el hígado, por lo que la electroforesis continua sin transportador, que separa las partículas de acuerdo con sus propiedades electrocinéticas, es la única vía alternativa a las técnicas anteriormente citadas y que ha sido utilizada con éxito (49, 612). No obstante, el equipo necesario es complejo y el método engorroso, además de producir un rendimiento muy bajo y preparaciones con una considerable heterogeneidad enzimática.

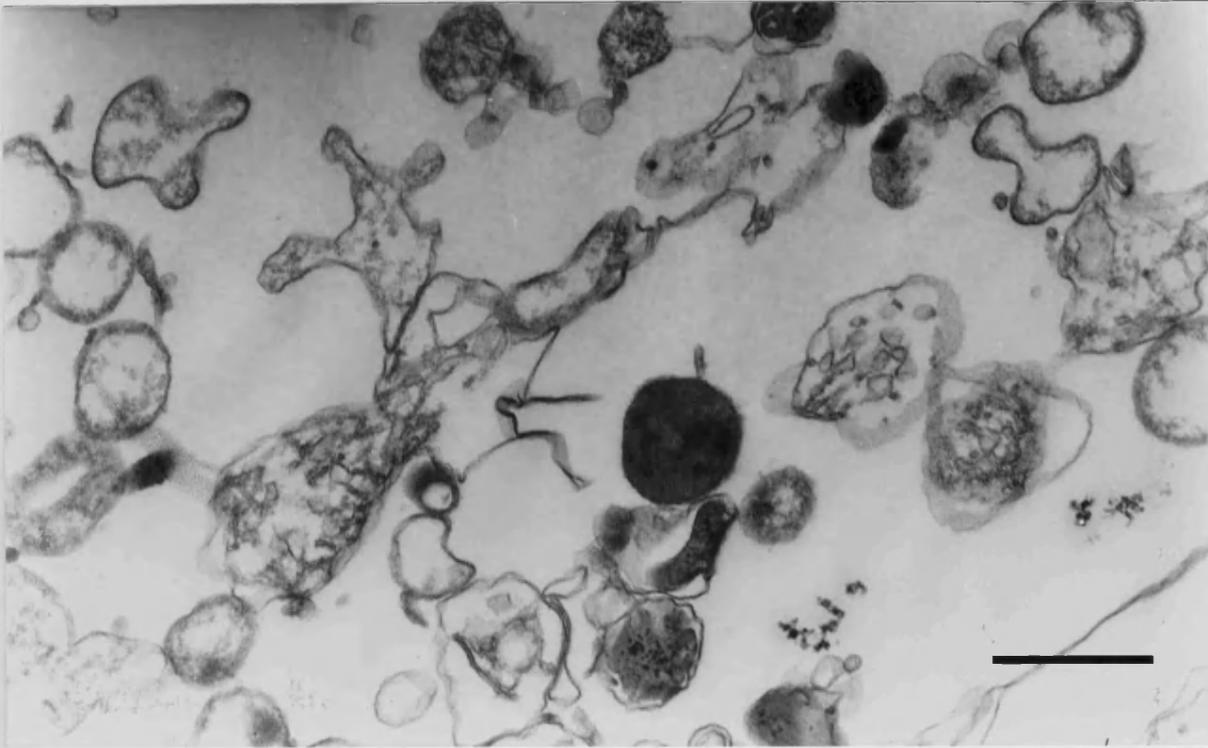
Otros métodos de purificación de lisosomas se fundamentan en las técnicas de centrifugación citadas, pero alterando *in vivo* la densidad de aquellos mediante la administración e incorporación al lisosoma de sustancias de baja densidad (como por ejemplo el Triton WR-1339, dando origen a los así llamados " tritosomas "), o de alta densidad (como por ejemplo el Dextran 500, oro, hidróxido coloidal de torio o de hierro). Obviamente, la principal desventaja de estos métodos es que requieren un tratamiento previo del animal y que los lisosomas así obtenidos son distintos a los que proceden de animales no tratados; así, por ejemplo, su estabilidad *in vitro* es muy diferente de la de los lisosomas normales (674).

Teniendo siempre presente el grado de purificación que se requería, el rendimiento de cada uno de los procedimientos y, por último, la simplicidad y coste de los mismos, se han empleado dos métodos de purificación de lisosomas, utilizando cada una de las preparaciones obtenidas de acuerdo con las exigencias de los experimentos en cuestión. En cualquier caso, siempre hemos utilizado ratas macho de no menos de tres meses de edad y 350 g de peso, puesto que tanto el rendimiento como las actividades específicas de la fracción resultante son superiores a las observadas cuando se utilizan ratas más jóvenes o más pequeñas. También, se ha sometido siempre a las ratas a un ayuno de unas 20 horas antes de su sacrificio, puesto que es un hecho muy conocido que, en hígado de rata, el ayuno induce un aumento del tamaño del compartimiento lisosomal (663).

La primera de las preparaciones lisosomales que hemos manejado, fue descrita por Ragab et al. (514), sigue un esquema de purificación muy semejante al método de Sawant et al. (568) y ha sido muy ampliamente utilizada desde su aparición. Aunque este autor contemplaba la composición de sus preparaciones como una precisa medida de la composición del lisosoma de hígado de rata, posteriores estudios (49) han puesto de manifiesto que está lejos de conseguir una purificación tan alta.

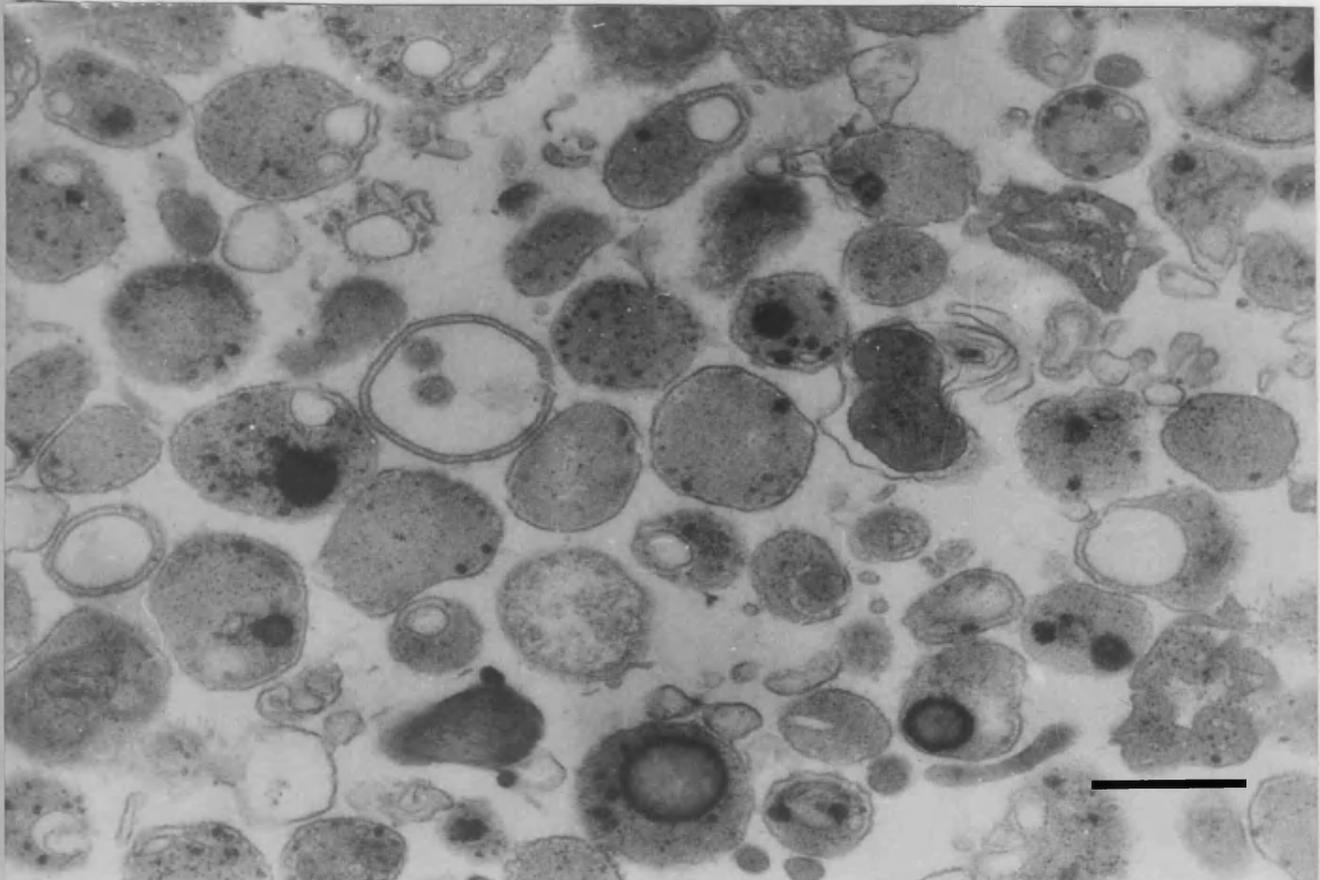
Nuestras preparaciones presentan altas actividades específicas de  $\beta$ -NAGASA, que oscilan generalmente alrededor de 0,34 U/mg, y de Fosfatasa Acida (0,30 U/mg), es decir, unas treinta y doce veces superior, respectivamente, al valor de las actividades específicas en el homogeneizado de hígado. Al microscopio electrónico muestran (ver Figura 9), junto a lisosomas claramente identificables restos celulares de vacuolas autofágicas, de membranas mitocondriales muy deterioradas y, en ocasiones, algún peroxisoma aislado. Es decir, hay una considerable cantidad de proteína que no pertenece al lisosoma; por tanto, las características y contenido de estas preparaciones no se pueden atribuir específicamente a los lisosomas, tal y como han hecho diversos autores (48). De hecho, la actividad específica de OTC en estas preparaciones de lisosomas es, aproximadamente de 0,5 U/mg, lo que representa un 10 % de la actividad específica de la OTC en mitocondrias, y la mitad del valor que se obtiene en el homogeneizado de hígado. No obstante, para el tipo de estudio que nos habíamos fijado *a priori*, tal y como ya expusimos en el apartado de Planteamiento y Objetivos, así como para la clase de experimentos que hemos llevado a cabo, no es en ningún momento esencial el trabajar con preparaciones totalmente purificadas, cosa por otra parte casi imposible. Por el contrario, basta con disponer de fracciones subcelulares suficientemente enriquecidas en el orgánulo que se quiere utilizar, y con aplicar las técnicas analíticas adecuadas para poder caracterizar el material obtenido y evaluar los procedimientos empleados.

También hemos aplicado para la preparación de lisosomas de hígado de rata el método de Wattiaux et al. (675), que resulta ser hasta la fecha superior a cualquier otro método publicado en cuanto a la relación entre el grado de purificación y el rendimiento que llega a alcanzar. Así, por un lado tenemos que las actividades específicas de nuestros marcadores lisosomales, la  $\beta$ -NAGASA y la Fosfatasa Acida, se ven casi cuadruplicadas (1,2 U/mg) y triplicadas (0,8 U/mg), respectivamente, aunque el rendimiento que se consigue se encuentra alrededor del 10 %, aproximadamente la mitad que con el método de Ragab et al. Además, la actividad específica de OTC se ve notablemente reducida (0,1 U/mg) en comparación con los lisosomas que se obtienen por centrifugación diferencial. Por otra parte, tenemos que los principales constituyentes de la fracción número 2, tal y como vemos en la Figura 10, resultan ser los típicos cuerpos densos, redondos o alargados, y que contienen frecuentemente una vacuola que a veces les da forma de anillo. También se aprecian cuerpos residuales y restos membranosos.



**FIGURA 9.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA APARIENCIA MORFOLOGICA QUE PRESENTAN LOS LISOSOMAS DE HIGADO DE RATA OBTENIDOS SEGUN EL METODO DE RAGAB ET AL.(X 41.000)**

La muestra se preparó y se procesó para microscopía electrónica, según se detalla en los apartados 4.3. y 4.12., respectivamente, de Métodos. La barra indica 0,5  $\mu\text{m}$ .



**FIGURA 10.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA APARIENCIA MORFOLOGICA QUE PRESENTAN LOS LISOSOMAS DE HIGADO DE RATA OBTENIDOS SEGUN EL METODO DE WATTIAUX ET AL.(x 40.000)**

La muestra se preparó y se procesó para microscopía electrónica, según se detalla en los apartados 4.3. y 4.12., respectivamente, de Métodos. La barra indica 0,5  $\mu\text{m}$ .

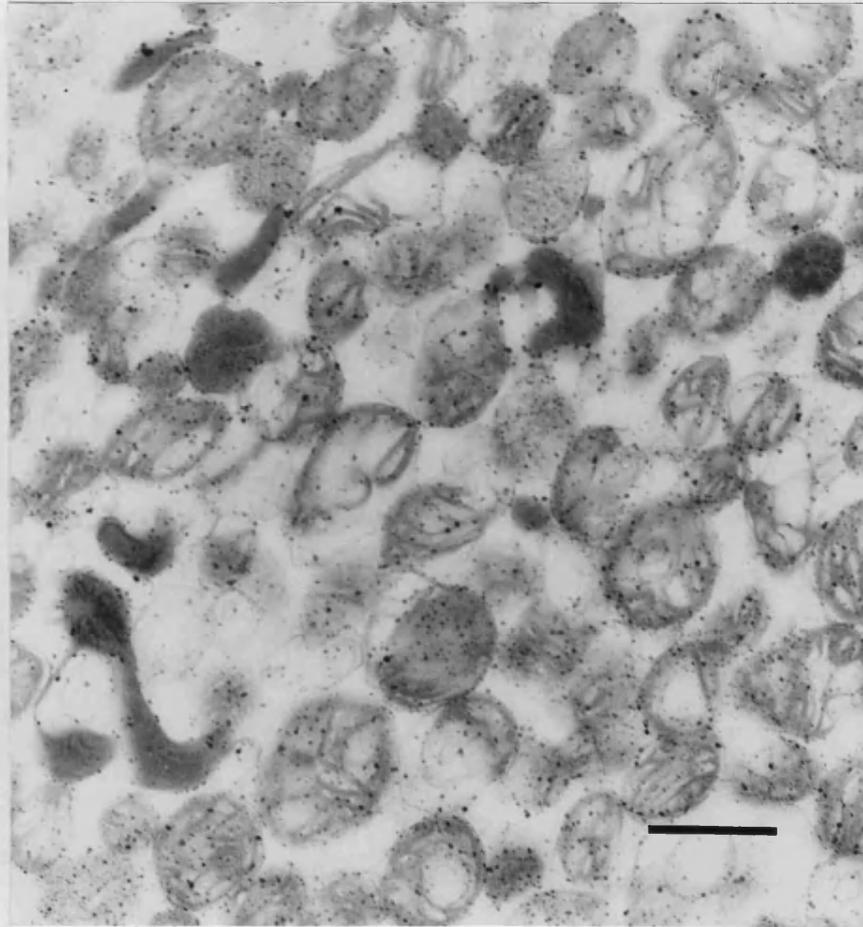
En ninguna otra parte son tan patentes las dificultades en la obtención de lisosomas como en el cerebro. Ello se debe, además de por los problemas que acabamos de comentar, a un número de peculiaridades que presenta este tejido, y que son las siguientes:

- 1) La diversidad de tipos celulares existente.
- 2) La distribución en diversos compartimientos de los lisosomas, que aparecen incluso en los axones y en los nervios terminales.
- 3) La existencia de estructuras del tejido nervioso, aparentemente anormales, en la fracción mitocondrial de los homogeneizados de cerebro y que cosedimentan con los lisosomas.
- 4) Una parte sustancial de las enzimas lisosomales se encuentra asociada a la fracción microsomal, al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi.

A pesar de todo, se pueden obtener fracciones más o menos enriquecidas en lisosomas combinando centrifugaciones diferenciales e isopícnicas. En la Figura 11 vemos la imagen en el microscopio electrónico de la apariencia morfológica de una preparación de lisosomas de cerebro según el método aplicado en este trabajo. En esta preparación, que presenta un granulado debido a la precipitación del citrato de plomo durante la tinción, se observan lisosomas junto con bastantes mitocondrias, lo que confirma los datos de otros autores sobre la dificultad de separar ambos orgánulos en este tipo de tejido. Las actividades específicas de  $\beta$ -NAGASA y de Fosfatasa Acida son de 0,032 y 0,015 U/mg, respectivamente. Es decir, los valores de actividades específicas son muy inferiores a los obtenidos con las preparaciones procedentes de hígado, debido fundamentalmente a que no se consigue una buena purificación, y también a que los valores de partida son unas veinte veces inferiores a los de las actividades específicas que se encuentran en hígado.

#### **5.4.- INMUNOCITOQUIMICA CUANTITATIVA DE PROTEINAS MITOCONDRIALES.**

La inmunocitoquímica es una herramienta muy útil para la localización *in situ* de las macromoléculas intracelulares. Se han empleado diferentes aproximaciones experimentales en la visualización por microscopía electrónica de los lugares antigénicos. En un principio, se permitía a los reactivos inmunológicos penetrar en los fragmentos de los tejidos una vez fijados, pero antes de ser incluidos. El principal problema de esta técnica consiste en la impermeabilidad de las



**FIGURA 11.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE LA APARIENCIA MORFOLOGICA QUE PRESENTAN LOS LISOSOMAS DE CEREBRO DE RATA.(x 32.000)**

La muestra se preparó y se procesó para microscopía electrónica, según se detalla en los apartados 4.3. y 4.12., respectivamente, de Métodos. La barra indica 0,5  $\mu\text{m}$ .

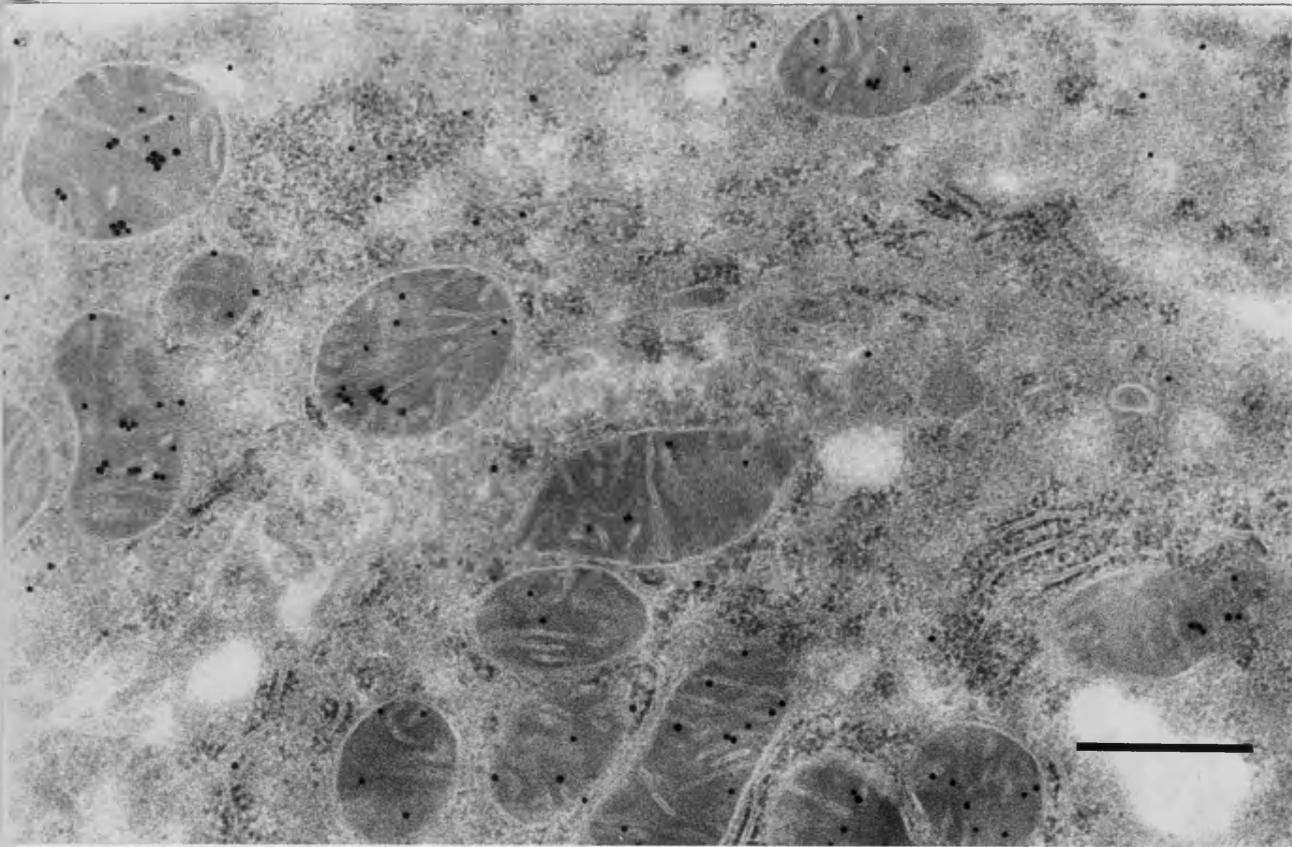
membranas celulares a los anticuerpos y demás reactivos. Aunque este inconveniente se puede soslayar mediante un tratamiento con detergentes o solventes, congelación y descongelación, o seccionamiento mecánico, todos estos procedimientos alteran la estructura fina celular y presentan el inconveniente de la falta de uniformidad en la penetración del reactivo inmunológico. Como alternativa, se han desarrollado técnicas de marcaje sobre secciones de material ya incluido en diversas matrices (plásticos o resinas). Así, se han venido utilizando, principalmente, anticuerpos conjugados con ferritina o unidos a peroxidasa.

En 1971, Faulk y Taylor presentaron un método inmunocoloidal para microscopía electrónica que ganó popularidad cuando, más recientemente, Roth et al. (553) elaboraron una técnica de localización de antígenos sobre secciones muy finas de tejido incluidas en matrices de plástico, mediante el uso de los complejos proteína A-oro coloidal, que es la que se ha seguido en el presente trabajo y que proporciona tanto una especificidad como una resolución altas.

La proteína A es producida por muchas cepas de *Staphylococcus aureus* y se encuentra covalentemente unida a la parte glicopeptídica de su pared celular. La excepción la constituyen ciertas cepas mutantes que secretan al exterior toda su proteína A siendo ésta la que, posteriormente, se purifica y comercializa, además de la que ya se obtiene también por ingeniería genética. La proteína A está formada por una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 42.000 y es muy estable al calor y a los agentes desnaturalizantes. Su característica principal es su capacidad para interactuar con las inmunoglobulinas, especialmente con las IgG, de diversas especies de mamíferos. Esta interacción es una reacción pseudoimmune, ya que implica a los dominios C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> de la región Fc de las IgG. Una molécula de proteína A es capaz de unir dos de IgG, y en ningún caso se ve afectada la región de unión de la molécula de inmunoglobulina con el antígeno, por tanto, no influye en la reacción antígeno-anticuerpo (552).

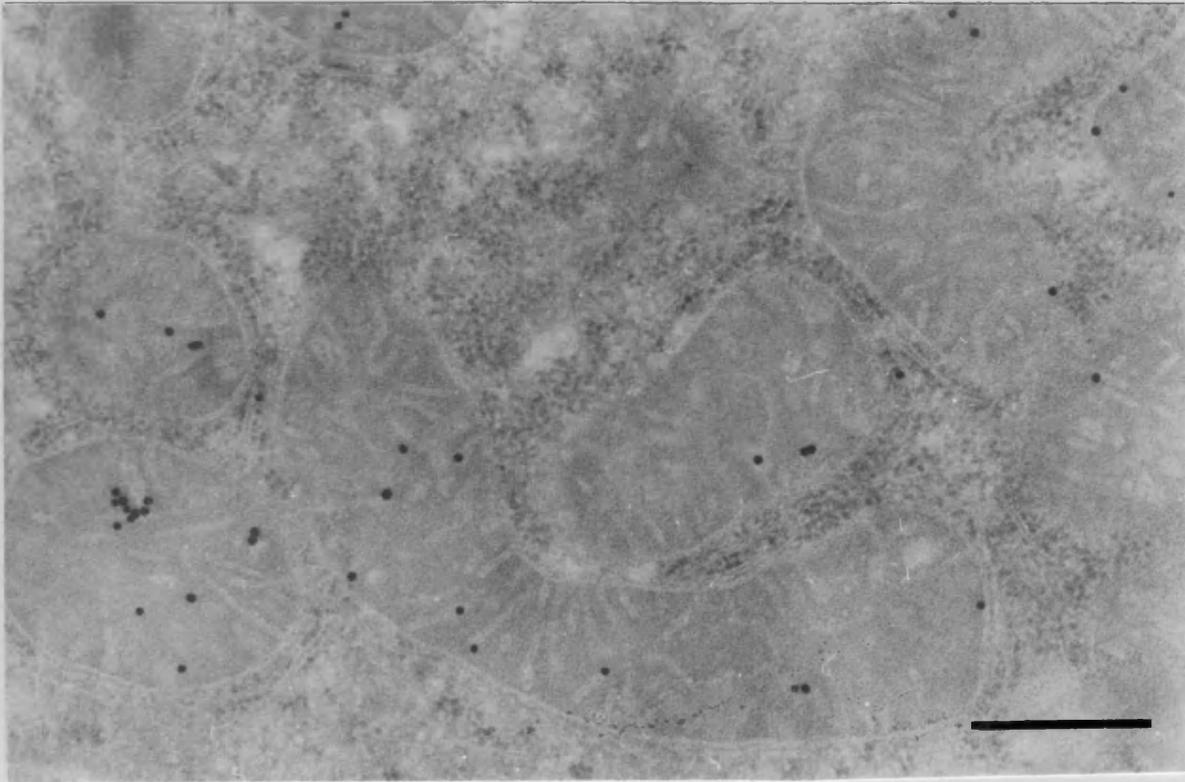
Si se quiere obtener una adecuada localización inmunocitoquímica de un antígeno, es necesario que tanto los procedimientos de fijación como de inclusión del tejido o material biológico, preserven, a la vez, la estructura fina celular y la antigenicidad de las proteínas. Entre los fijadores que mejor cumplen estos dos requisitos se encuentra el glutaraldehído, y entre las resinas de inclusión, el Lowicryl K4M, que permite efectuar la polimerización a bajas temperaturas.

En este trabajo, se ha hecho uso de estos reactivos y hemos aplicado la técnica de los complejos de proteína A-oro coloidal para la detección y cuantificación de tres enzimas de la matriz mitocondrial: la Ornitina Transcarbamilasa, la Glutamato Deshidrogenasa y la Carbamil Fosfato Sintetasa I. Los resultados obtenidos revelan la precisión y fiabilidad de estos procedimientos, tal y como se puede comprobar en las Figuras 12, 13 y 14 donde se aprecia la alta calidad y



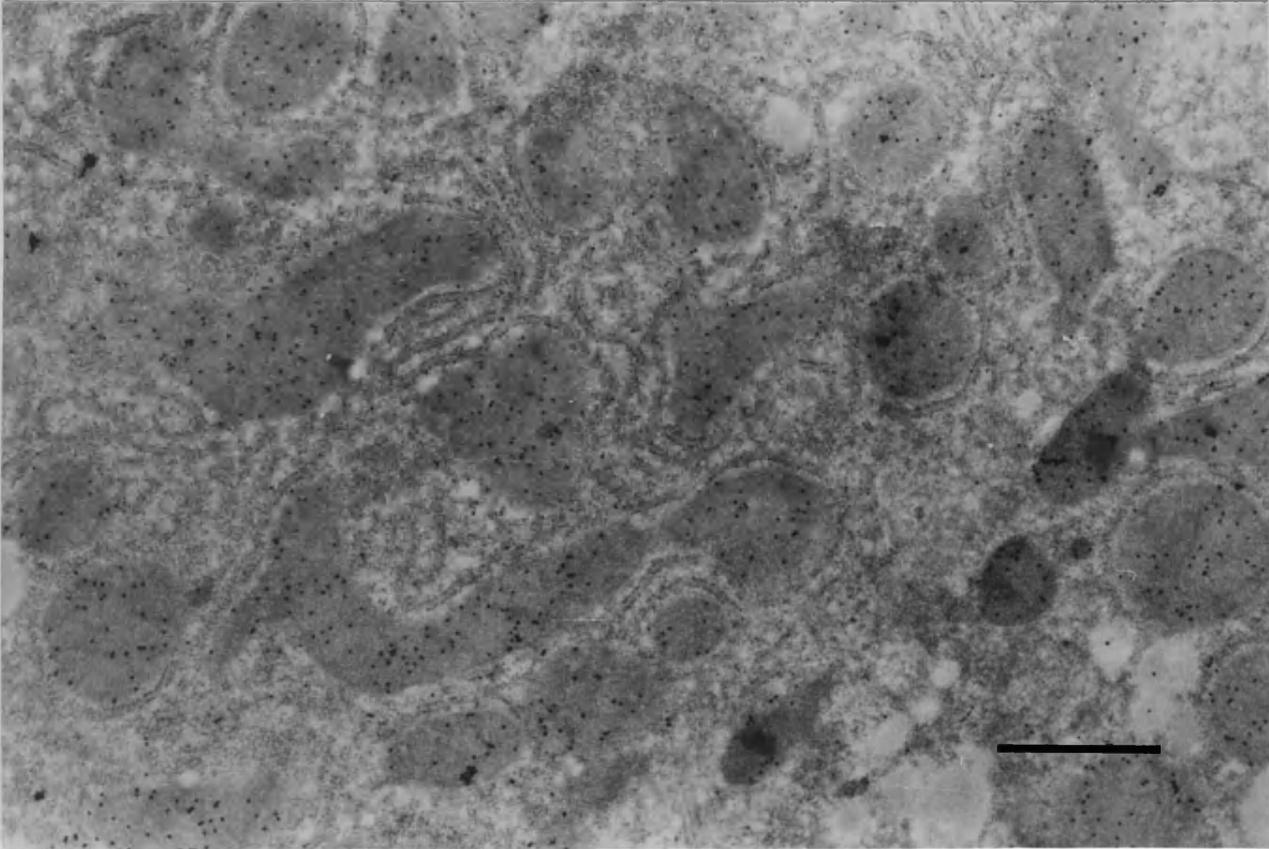
**FIGURA 12.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL MARCAJE INMUNOCITOQUIMICO DE LA OTC MEDIANTE LA TECNICA DEL COMPLEJO PROTEINA A-ORO COLOIDAL SOBRE UNA SECCION ULTRAFINA DE HIGADO DE RATA. (x 46.000)**

La muestra se preparó y se procesó según se detalla en los apartados 4.13. y 4.14. de Métodos. El valor promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal empleado fue de unos 17 nm. La barra indica 0,5  $\mu$ m.



**FIGURA 13.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL MARCAJE INMUNOCITOQUIMICO DE LA GDH MEDIANTE LA TECNICA DEL COMPLEJO PROTEINA A-ORO COLOIDAL SOBRE UNA SECCION ULTRAFINA DE HIGADO DE RATA. (x 45.000)**

La muestra se preparó y se procesó según se detalla en los apartados 4.13. y 4.14. de Métodos. El valor promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal empleado fué de unos 17 nm. La barra indica 0,5  $\mu$ m.



**FIGURA 14.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL MARCAJE INMUNOCITOQUIMICO DE LA CPS I MEDIANTE LA TECNICA DEL COMPLEJO PROTEINA A-ORO COLOIDAL SOBRE UNA SECCION ULTRAFINA DE HIGADO DE RATA. (x 22.000)**

La muestra se preparó y se procesó según se detalla en los apartados 4.13. y 4.14. de Métodos. El valor promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal empleado fue de unos 17 nm. La barra indica 1  $\mu\text{m}$ .

resolución de la inmunotinción, la preservación de estructuras y el escaso marcaje inespecífico. Tras el tratamiento con los correspondientes anticuerpos seguidos de los complejos proteína A-oro, se puede observar la distribución homogénea de las marcas que producen las partículas de oro sobre la matriz mitocondrial de células de hígado de rata.

En la Tabla 6, vemos las densidades de marcaje en la mitocondria para las tres enzimas citadas anteriormente. También se demuestra que el marcaje no específico es bajo y permanece constante en todo el hepatocito, tal y como ya han señalado otros autores (53, 327). Así, se observan pocas partículas de oro sobre otros compartimientos celulares distintos de la mitocondria, y que no representan más que adsorciones de tipo inespecífico de los reactivos inmunocitoquímicos sobre las secciones celulares.

La mitocondria de hígado de rata resulta ser un buen modelo para la inmunocitoquímica cuantitativa, debido a la gran cantidad de datos bioquímicos que sobre ella disponemos. La localización inmunocitoquímica de las proteínas mitocondriales, complementa las observaciones y determinaciones bioquímicas y contribuye, como una herramienta más, al estudio de los procesos de su síntesis y degradación. En este sentido, la cuantificación del número de moléculas de una proteína mitocondrial mediante procedimientos inmunocitoquímicos altamente sensibles y específicos, podría aportar datos acerca de su concentración intramitocondrial y, por consiguiente, sobre su recambio.

Por otra parte, estas técnicas inmunocitoquímicas de microscopía electrónica podrían correlacionarse con los datos bioquímicos de localización y concentración de macromoléculas. Así, en el caso de la localización subcelular, aquí se demuestra claramente que las tres enzimas se encuentran situadas en la matriz mitocondrial, tal y como ya se había deducido previamente (99) utilizando los métodos de fraccionamiento celular y medida de la actividad enzimática.

En relación con las respectivas concentraciones intramitocondriales de las tres enzimas sometidas a estudio vemos que, a partir de los cálculos indicados en las Tablas 7, 8 y 9, éstas varían dentro de un intervalo de valores bastante amplio, dependiendo de la fuente de la que se tomen los datos. No obstante, las concentraciones relativas entre estas enzimas calculadas por este método inmunocitoquímico se aproximan a las obtenidas a partir de datos morfométricos y bioquímicos. Así, la relación entre la CPS I y la OTC obtenida por métodos inmunocitoquímicos es de 1,63, mientras que de los datos morfométricos y bioquímicos podemos llegar a establecer una relación de 1,74. En el caso del cociente GDH/OTC, la inmunocitoquímica proporciona un valor de 0,90, frente al 0,86 calculado a partir de los datos de las Tablas 8 y 9.

**TABLA 6.- DENSIDADES DE MARCAJE EN MITOCONDRIAS Y EN EL RESTO DEL HEPATOCITO DE RATA PARA DIFERENTES ENZIMAS MITOCONDRIALES.**

Anticuerpo	Densidad de marcaje (partículas de oro/ $\mu\text{m}^2$ )		
	Total		Corregido
	Mitocondria	Resto célula	Mitocondria
Anti-OTC	11,5 $\pm$ 2,9	2,3 $\pm$ 0,6	8,8
Anti-CPS I	17,0 $\pm$ 1,2	2,4 $\pm$ 0,4	14,3
Anti-GDH	10,6 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,6	7,9
IgG Control	2,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,3	-

En cada una de las determinaciones, que constituyen experiencias individuales, se han medido, tanto en el caso del anticuerpo como en el del suero control, superficies mitocondriales superiores a  $200 \mu\text{m}^2$  y superficies del resto del hepatocito superiores a  $1000 \mu\text{m}^2$ . Los valores presentados corresponden a la media aritmética de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estandar.

**TABLA 7.- CALCULO DEL NUMERO DE MOLECULAS DE CPS I EN MITOCONDRIAS DE CELULAS DE HIGADO DE RATA.**

1) Actividad de CPS I en homogeneizados de hígado de rata: 9,3 U/g de hígado (516).

Actividad específica de la CPS I purificada: 3,0 U/mg de proteína (516).

Peso molecular de la CPS I: 150.000 daltons (99).

Por tanto, tendremos: 3,1 mg de CPS I /g de hígado, que equivalen a 20 nmoles/g de hígado.

Asumiendo que 1 g de hígado equivale a un mililitro, que el volumen ocupado por las mitocondrias en el hepatocito normal es del 20 % y que la matriz mitocondrial representa la cuarta parte del volumen total mitocondrial (329), o bien teniendo en cuenta que un gramo de hígado rinde 60 mg de proteína mitocondrial (685) y que el contenido de agua de la mitocondria es de 0,66 ml/g de proteína (678), llegamos a la conclusión de que la CPS I se encuentra en la matriz mitocondrial del hígado de rata en una concentración entre 0,4 y 0,5 mM, lo que equivale a 157.000 - 196.000 moléculas de CPS I por mitocondria.

2) Actividad específica de CPS I en mitocondrias: 0,63 U/mg (515).

Actividad específica de CPS I purificada: 4 U/mg (515).

Luego, la CPS I representa el 15 % de la proteína mitocondrial.

El contenido de agua de la mitocondria es de: 0,66 ml/g de proteína mitocondrial (678).

Peso molecular de la CPS I: 158.000 (515).

Por tanto, la concentración intramitocondrial de CPS I es de 1,4 mM, lo que equivale a 548.000 moléculas de CPS I por mitocondria.

**TABLA 8.- CALCULO DEL NUMERO DE MOLECULAS DE OTC EN MITOCONDRIAS DE CELULAS DE HIGADO DE RATA.**

1) Actividad de OTC en homogeneizados de hígado de rata: 200-290 U/g de hígado (477).

Actividad específica de la OTC purificada: 249 U/mg (97).

Peso molecular de la OTC: 112.000 daltons (375).

Por tanto, tendremos aproximadamente 1 mg de OTC por gramo de hígado, lo que equivale a 9 nmoles de OTC/g de hígado.

Consideraciones análogas a las del apartado 1 de la Tabla 7, nos llevan a concluir que la OTC se encuentra en la matriz mitocondrial en una concentración entre 0,18 y 0,23 mM, es decir, que tendremos entre 70.500 y 90.000 moléculas de OTC por mitocondria.

2) Actividad específica de la OTC en mitocondrias: 4,3-6,1 U/mg de proteína mitocondrial (375).

Actividad específica de la OTC purificada: 985-1000 U/mg (375).

Luego la OTC constituye el 0,5-0,6 % de la proteína mitocondrial.

El contenido de agua de la mitocondria es de: 0,66 ml/g de proteína mitocondrial (678).

El peso molecular de la OTC es de: 112.000 daltons (375).

Por tanto, la concentración intramitocondrial de la OTC es de 0,07 mM

Dado que el volumen mitocondrial medio es de  $0,65 \mu\text{m}^3$  (224), el número de moléculas de OTC por mitocondria sería, aproximadamente, de 27.500.

**TABLA 9.- CALCULO DEL NUMERO DE MOLECULAS DE GDH EN MITOCONDRIAS DE CELULAS DE HIGADO DE RATA.**

1) Actividad de la GDH en homogeneizados de hígado de rata: 0,78 U/mg de proteína hepática (315).

Actividad específica de la GDH purificada: 185 U/mg (315).

Peso molecular de la GDH: 350.000 daltons (315).

Por tanto, por cada gramo de proteína hepática hay 4,2 mg de GDH.

Asumiendo que 1 g de hígado equivale a 1 ml y que el volumen ocupado por las mitocondrias de un hepatocito normal es el 20 % del total, obtenemos que la concentración mitocondrial de la GDH es de 0,06 mM.

Dado que el volumen mitocondrial medio es de  $0,65 \mu\text{m}^3$  (224), tendremos que el número de moléculas de GDH por mitocondria es de 23.500.

2) Partiendo de los mismos datos que en el apartado 1, y considerando que 1 g de proteína hepática rinde 60 mg de proteína mitocondrial (685), tendremos 0,07 g de GDH/g de proteína mitocondrial.

Si el contenido de agua de la mitocondria es de 0,66 ml/g de proteína mitocondrial (678), la concentración intramitocondrial de GDH será de 0,303 mM, lo que equivale aproximadamente a 119.000 moléculas de GDH por mitocondria.

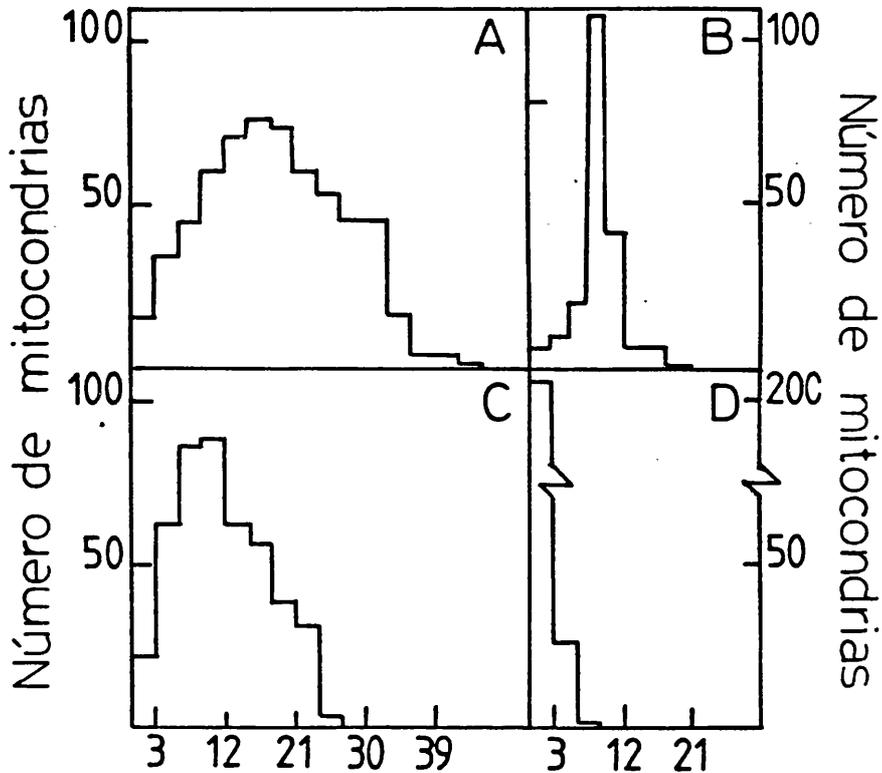
Esta técnica descubre los antígenos que se encuentran en la superficie de las secciones celulares. Por tanto, el cálculo de las concentraciones absolutas para una enzima dada, requeriría estimar la profundidad a la que los complejos proteína A-oro penetran dentro de la sección, y la pérdida de antigenicidad producida por el tratamiento del tejido para microscopía electrónica, así como conocer la estequiometría de la reacción inmunológica. No obstante, puesto que se observa que, en una misma sección, el número de marcas por célula permanece aproximadamente constante, cualquier inhibición de la inmunorreactividad se produce por igual en todas ellas.

Por tanto, esta técnica no proporciona información alguna concerniente a la cantidad total de una determinada enzima en la mitocondria, ni sobre la relación de masas entre diversas proteínas mitocondriales. Sin embargo, las concentraciones intramitocondriales relativas detectadas por medio de estos procedimientos inmunocitoquímicos son válidas para cualquier estudio comparativo en el que se quieran observar las variaciones de concentración producidas bajo diversas condiciones experimentales. Así, los valores del número de marcas por micra cuadrada para cada enzima, obtenidos con un mismo antisuero, un determinado tamaño de partícula de oro, un lote de solución del complejo proteína A-oro dado y en secciones procesadas al unísono, pueden servir como marcadores de una situación control y como sondas para visualizar cualquier alteración producida bajo distintas situaciones fisiológicas o diversos tratamientos.

Por otra parte, esta técnica también permite comparar las concentraciones relativas de una determinada enzima en diversos tejidos, dentro de un mismo tejido en los distintos tipos de células y dentro de una determinada estirpe celular en función de su situación anatómica en el órgano, aportando, de esta manera, información sobre la homogeneidad o heterogeneidad de las poblaciones celulares.

Razonamientos análogos sirven igualmente para los orgánulos subcelulares, como es el caso de las mitocondrias hepáticas que nos ocupan. Así, y de acuerdo con la Figura 15, la distribución de las mitocondrias de hígado de rata, de acuerdo con el número de partículas de oro por micra cuadrada para cada una de las tres enzimas, se ajusta estadísticamente a una distribución normal o distribución de Poisson. De esta forma, se proporciona una evidencia, basada en determinaciones inmunocitoquímicas, en favor de la homogeneidad de la población intracelular de mitocondrias.

No obstante, las conclusiones pueden todavía extenderse más lejos, puesto que todas estas enzimas tienen vidas medias distintas y, sin embargo, presentan la misma localización intramitocondrial. De ahí que no se pueda pensar en un único mecanismo de degradación de las proteínas mitocondriales a través de una autofagia incontrolada tras su englobamiento en lisosomas, que sólo podría explicarse postulando la existencia de una heterogeneidad mitocondrial en relación



Partículas de oro/ $\mu\text{m}^2$  de área mitocondrial

**FIGURA 15.- HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DE LAS DENSIDADES DE MARCAJE DE DIFERENTES ENZIMAS MITOCONDRIALES EN MITOCONDRIAS INDIVIDUALES.**

Cada histograma representa una experiencia distinta. Las muestras se procesaron tal y como se describe en el apartado 4.14.1 de Métodos, y fueron incubadas con los siguientes anticuerpos: A) anti-CPS I; B) anti-OTC; C) anti-GDH y D) IgG control. Sólo se contabilizaron las mitocondrias cuyas áreas fueron superiores a  $0,25 \mu\text{m}^2$ .

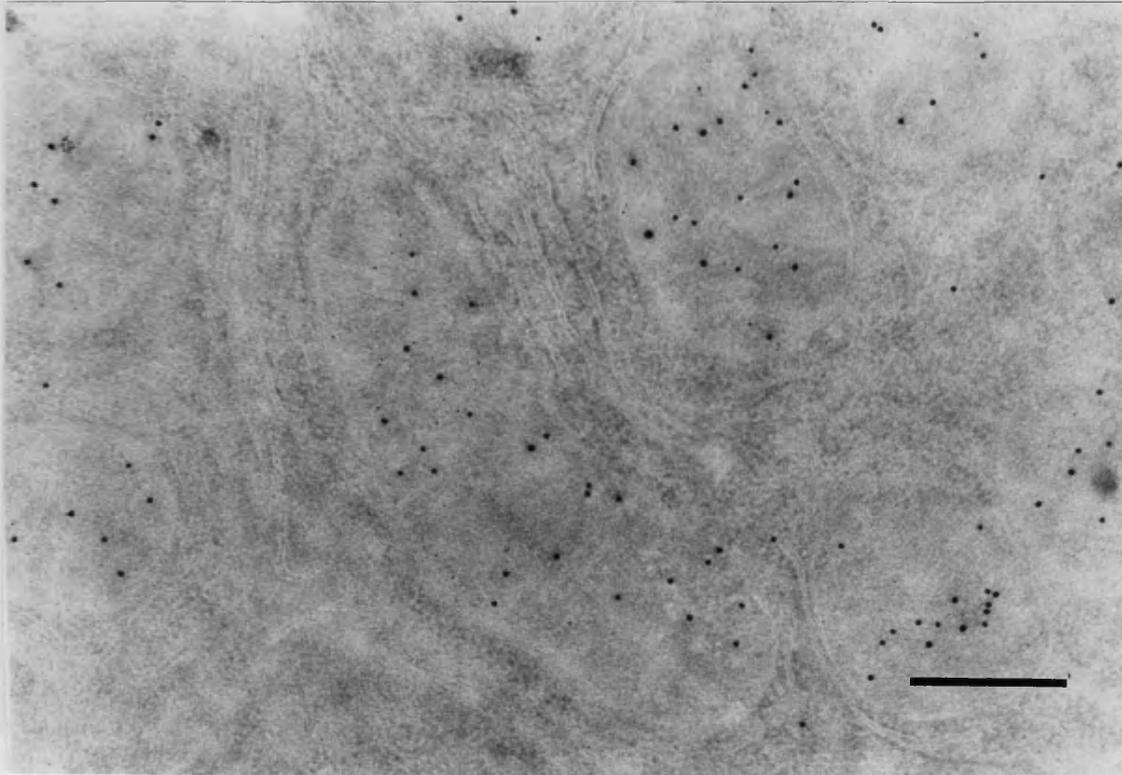
con los niveles de estas enzimas. Los resultados que aquí se presentan son incompatibles con esta hipótesis y apuntan a que, en el estado basal, el principal mecanismo de degradación que regula, junto con la síntesis proteica, el recambio de las enzimas mitocondriales no puede ser meramente autofágico, sino que deben de operar en el hepatocito otros sistemas, lisosómicos o no, capaces de discernir entre proteínas.

Otra ventaja adicional de este procedimiento, consiste en el hecho de que se pueden utilizar complejos proteína A-oro preparados a partir de oro coloidal de diferente tamaño de partícula. Por tanto, esta técnica también permite la localización ultraestructural de los lugares antigénicos correspondientes a dos proteínas diferentes sobre un mismo corte o sección. Para ello se aprovecha la circunstancia de que en función del agente reductor que se utilice y la cantidad de éste que se emplee, es decir, según sea la velocidad de la reacción de reducción, se puede ir variando el tamaño de partícula del oro coloidal que se va a obtener. Así, se pueden preparar dos complejos de proteína A-oro que difieran sustancialmente en cuanto al tamaño de partícula de oro utilizado y, por tanto, que produzcan imágenes de marcas claramente diferenciadas al microscopio electrónico. Como ejemplo, en las Figuras 16 A y 16 B se muestran los resultados obtenidos en una determinación simultánea de OTC y CPS I.

Es necesario, con el procedimiento seguido aquí, llevar a cabo el marcaje primero sobre una superficie de la sección del tejido y luego sobre la otra. La transparencia de la sección al haz de electrones permite la visualización simultánea de las partículas de oro presentes en ambas superficies, que son equivalentes para el marcaje, tal y como lo demuestra el hecho de que los resultados son iguales cuando se cambian los anticuerpos con los que se tratan cada una de las superficies.

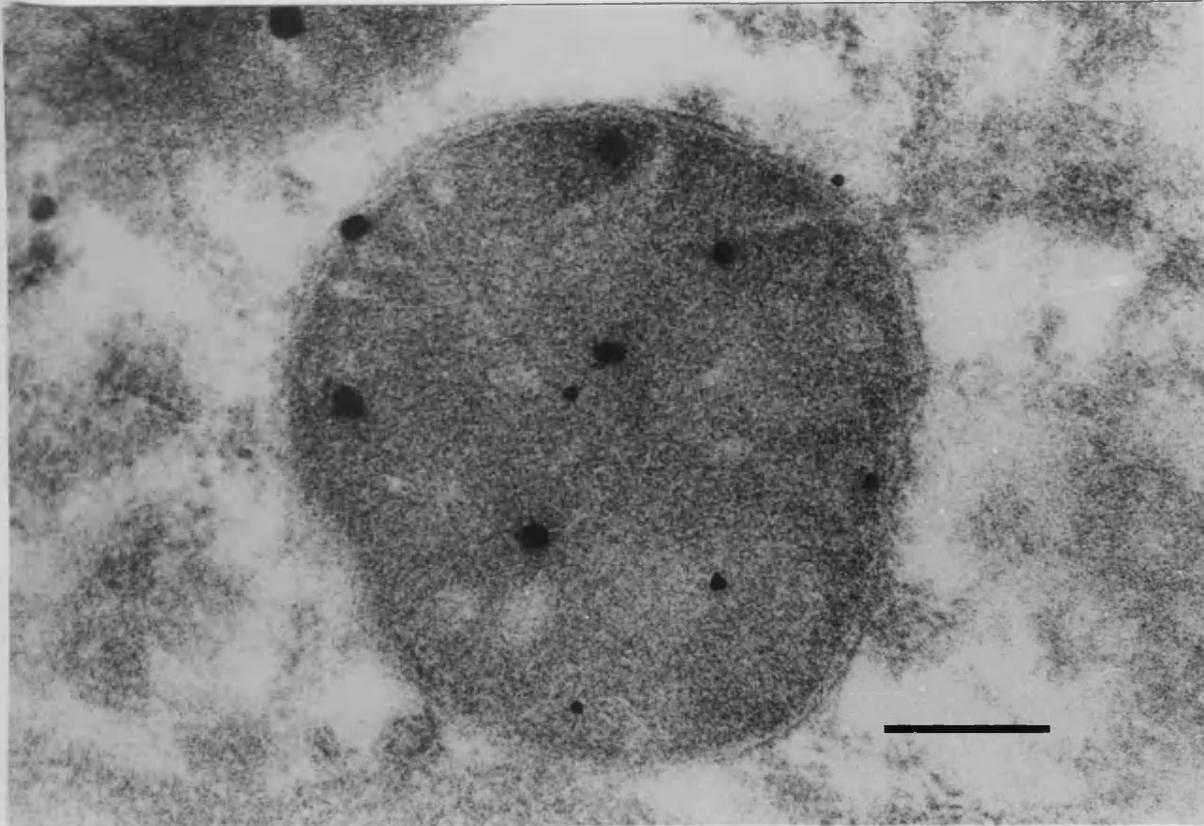
El tamaño tiene implicaciones importantes: las partículas grandes se pueden visualizar muy bien a bajos aumentos, obteniéndose fácilmente una impresión general del marcaje global. También se distingue muy bien sobre estructuras que resulten ser más opacas a los electrones. Una desventaja radica en el hecho de que las partículas de oro con mayor tamaño son inferiores en relación con la sensibilidad y resolución que alcanzan.

Las partículas más pequeñas son mejores en cuanto al rendimiento en el marcaje y, por tanto, dan una imagen más sensible de la inmunorreacción. Además, la resolución de la técnica mejora conforme disminuye el tamaño de partícula, y también es menor la posibilidad de que pequeñas estructuras no se puedan llegar a observar por sobreposición de gránulos de oro. La elección del tamaño de partícula depende, pues, de la información requerida.



**FIGURA 16A.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UN DOBLE MARCAJE INMUNOCITOQUIMICO DE OTC Y CPS I MEDIANTE LA TECNICA DEL COMPLEJO PROTEINA A-ORO COLOIDAL SOBRE UNA SECCION ULTRAFINA DE HIGADO DE RATA: ASPECTO GENERAL. (X 39.000)**

La muestra se preparó y procesó según se detalla en los apartados 4.13. y 4.14.2. de Métodos. El valor promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal empleado fue de unos 17 y 5 nm, respectivamente. La barra indica 0,5  $\mu$ m.



**FIGURA 16 B.- MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UN DOBLE MARCAJE INMUNOCITOQUIMICO DE OTC Y CPS I MEDIANTE LA TECNICA DEL COMPLEJO PROTEINA A-ORO COLOIDAL SOBRE UNA SECCION ULTRAFINA DE HIGADO DE RATA: DETALLE DE LAS MARCAS PRODUCIDAS POR LAS PARTICULAS DE ORO COLOIDAL DE DIFERENTE TAMAÑO. (x 118.000)**

La muestra se preparó y procesó según se detalla en el apartado y 4.14.2. de Métodos. El valor promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal empleado fue de unos 17 y 5 nm, respectivamente. La barra indica 0,2  $\mu\text{m}$ .

La dificultad en la penetración, no al interior del tejido (circunstancia que no se da) sino en las irregularidades y huecos de la superficie de la sección, es, probablemente, otro factor que provoca una menor sensibilidad de las partículas de mayor tamaño. Las partículas más pequeñas producen un marcaje más intenso y denso, lo que da origen a zonas en las que los impedimentos estéricos y las repulsiones entre las partículas de oro son los factores limitantes de la sensibilidad. Estos factores, junto con las características de penetración de las partículas y de las estructuras celulares en estudio, deben de ser consideradas cuando se interpretan cuantitativamente patrones de marcado.

#### **5.5.- DETERMINACIONES CUANTITATIVAS DEL RECAMBIO PROTEICO EN HIGADO DE RATA.**

Los términos, conceptos y métodos de análisis utilizados en los estudios sobre el proceso metabólico del recambio, se pueden encontrar en numerosos libros y revisiones. Sin embargo, no todos los autores han definido estos parámetros de la misma forma, por lo que se ha creído oportuno clarificarlos con objeto de lograr una mejor comprensión del alcance de los resultados del trabajo que aquí se presenta.

La palabra recambio es un término general que se utiliza para describir el proceso global de renovación o sustitución de una determinada proteína durante la vida de una célula. Síntesis, degradación, proteólisis, etc, son, sin embargo, términos que se refieren a aspectos específicos de este proceso general.

Se ha evitado especialmente el uso de la palabra catabolismo, puesto que por norma se entiende que hace referencia a un proceso oxidativo y, de esta forma, se distinguen más claramente conceptos tan diferenciados entre sí como el catabolismo de los aminoácidos a urea y la degradación de una proteína hasta sus aminoácidos constituyentes.

Un tejido como el hígado, contiene un gran número de enzimas en cantidades muchas veces desconocidas, y que presentan un amplio espectro de velocidades de síntesis y degradación. Por tanto, la velocidad de recambio global será la suma de todos los procesos individuales de cada una de las proteínas, desde la más rápida a la más lenta. Aunque este hecho plantea una serie de cuestiones importantes, tales como las relativas al significado metabólico de este gran intervalo de velocidades de recambio - en el que existen diferencias de hasta 2.000 veces -, y sobre los factores que regulan las velocidades de degradación de las proteínas individuales, estos aspectos se tratarán detalladamente en otros apartados. Por tanto, este proceso de recambio puede implicar la

producción o síntesis de nuevo material proteico, la desaparición o degradación del ya existente o puede representar el intercambio del mismo entre dos o más compartimientos celulares.

Básicamente, cualquier intento de medida de la degradación intracelular de proteínas implica el uso de alguno de los métodos que ya describimos en la Introducción (ver apartado 1.13). No obstante, estos métodos difieren mucho en cuanto a su fiabilidad y, siempre que se pueda, se deben confirmar los resultados por dos o más métodos. Además, también se debe tener muy presente que, incluso con dos procedimientos relativamente fidedignos, es muy difícil obtener resultados que concuerden perfectamente, pues entran en juego factores muy diversos. Entre los más importantes se encuentran las características del sistema que se va a estudiar, puesto que de este dependerá, fundamentalmente, la elección del método que se empleará.

El hígado ha sido el órgano que más se ha utilizado para los estudios de recambio intracelular de proteínas. Las razones son muy numerosas, pero destacaremos las siguientes:

- Es el mayor órgano visceral del organismo y representa el 3-5 % del peso del cuerpo.
- Es capaz de regular su propia masa.
- Presenta la mayor capacidad de regeneración de todos los órganos corporales.
- Es el único tejido capaz de deaminar los aminoácidos.
- Es extremadamente activo en el metabolismo proteico y casi todas las proteínas del plasma son de origen hepático.
- Posee una anatomía muy singular que le permite un contacto físico directo entre el torrente sanguíneo sinusoidal y las células hepáticas.
- Está compuesto por diversos tipos celulares que incorporan en sus membranas receptores u otras funciones especializadas en conseguir una adecuada eliminación del material circulante.

De esta forma, el hígado resulta ser, hoy en día, el tejido del que mayor documentación se dispone. No en vano, el hígado, el riñón y el músculo son los principales tejidos donde mayores son las tasas de proteólisis. Además, cuando se comparan las vidas medias de las proteínas solubles de hígado, riñón y músculo, las  $t_{1/2}$  correspondientes a las proteínas hepáticas son las más cortas. Esta gran capacidad de recambio proteico por parte del hígado, se ha visto confirmada por

numerosas evidencias experimentales, por ejemplo, el hígado de rata o de ratón después de 48 horas de ayuno, pierde alrededor del 40 % de su contenido proteico, y vuelve rápidamente a su nivel normal (439). Así, se han determinado las vidas medias de unas 60 proteínas hepáticas, que van desde unos quince minutos hasta casi un mes. En relación con las diversas enzimas mitocondriales que ya han sido estudiadas, resulta especialmente relevante el hecho de que se dispone de medidas cuantitativas sobre la vida media de la Carbamil Fosfato Sintetasa I, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de arginina y urea, es decir, la formación de carbamil fosfato - uno de los substratos de la Ornitina Transcarbamilasa -. Además, la CPS I presenta otras características de gran interés, como son:

- Constituye alrededor del 20 % de las proteínas de la matriz mitocondrial.
- Se encuentra uniformemente distribuida en la matriz mitocondrial.
- Es la única enzima en la biosíntesis de urea que tiene un activador alostérico: el N-acetil-L-glutamato.
- Se ha postulado que constituye el punto principal de control del ciclo de la urea.

Nicoletti et al. (468), utilizando la técnica del doble isótopo, encontraron que la vida media de la CPS I de hígado de rata era de 7,7 días para una dieta normal, de 3,3 días en una dieta con alto contenido en proteína, de 4,6 días en el caso de una dieta carente de proteína y de 7,8 días en animales tiroidectomizados. Otros estudios llevados a cabo con preparaciones hepáticas de *Rana catesbeiana*, daban una vida media alrededor de 3,5 días para la CPS I, que se acortaba hasta 2,3 días en presencia de tiroxina (182).

El hecho de disponer de todos estos datos, acrecentaba aún más el interés por determinar la constante de degradación de la OTC. La técnica elegida ha sido también la del doble isótopo, puesto que es la más adecuada para el cálculo de constantes de degradación relativas y, especialmente, para comparar velocidades de degradación entre proteínas diferentes de un mismo orgánulo o entre conjuntos de proteínas dispuestas en distintos orgánulos intracelulares.

Este método no presenta excesivas dificultades experimentales, es bastante reproducible y resulta relativamente rápido en proporcionar resultados, puesto que para cada intervalo de tiempo que se ensaye, la proteína en cuestión sólo necesita ser purificada una vez.

Sin embargo, este procedimiento no proporciona datos sobre las constantes de degradación verdaderas o sobre las velocidades de recambio absolutas, sino una relación sobre la cantidad de

incorporación a una proteína de dos isótopos radiactivos. No obstante, se comprueba que esta relación es un fiel reflejo de la constante de velocidad de degradación, y más que suficiente para responder a las cuestiones relacionadas con los estudios sobre el recambio intracelular, como por ejemplo: ¿ cual es el grado de heterogeneidad en las velocidades de síntesis y degradación de determinados grupos de proteínas intracelulares?, ¿ se ha producido, y en que cuantía, un cambio en la velocidad de degradación de una proteína por un efecto concreto, o por una hormona, por un cambio en la dieta, o por una mutación genética, etc, ?.

Una de las grandes ventajas del método del doble isótopo es que permite corregir el problema derivado de la reutilización de los precursores radiactivos administrados, al menos en la misma extensión en que lo consigue la [guanidino- $^{14}\text{C}$ ] arginina, ya que las constantes de velocidad de degradación que se utilizan son las que se obtienen mediante el empleo de este aminoácido radiactivo.

En la Tabla 10 se muestran, para cada una de las fracciones hepáticas estudiadas, los valores experimentales de incorporación de ambos isótopos de L-leucina en función del tiempo transcurrido entre la administración de uno y otro. A partir exclusivamente de estos datos, se pueden calcular las constantes aparentes de degradación que presentan las diferentes fracciones, mediante la determinación de la pendiente de la recta resultante de representar el  $\ln ([^3\text{H}/^{14}\text{C}]_t / [^3\text{H}/^{14}\text{C}]_0)$  frente al tiempo. De esta forma, lo que en realidad medimos no son más que las vidas medias, tal como se hubieran obtenido a través del cálculo de la pérdida de radiactividad específica con el tiempo tras el marcaje con un sólo precursor radiactivo, la L- $^{14}\text{C}$  leucina en este caso. Por tanto, serán valores que estarán sujetos a un considerable error de sobrestimación, puesto que este aminoácido es extensamente reutilizado para la síntesis proteica en el tejido hepático. Así, otros autores (505, 574) ya han demostrado que, incluso 9 días después de la administración de L- $^3\text{H}$  leucina, existen niveles intracelulares de este aminoácido en forma libre, es decir, no unido a proteína. Esto conduce a que el precursor empleado en el marcaje no se administre en forma de un breve " pulso ", sino que continúe incorporándose durante todo el tiempo de duración de las medidas, lo que da lugar a que se obtengan constantes aparentes de velocidad de degradación más pequeñas y mayores valores para las correspondientes vidas medias.

Estos inconvenientes venían a ser subsanados por una modificación introducida por Arias et al. (25) que se conoce con el nombre del doble isótopo. En este trabajo se ha utilizado esta técnica con los cambios introducidos por Glass y Doyle (195) para que proporcione valores de las constantes de velocidad de degradación. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 11 para un intervalo de tres días entre la administración del primer y segundo isótopo, y en la Tabla 12 para el caso de un intervalo de diez días.

**TABLA 10.- DATOS EXPERIMENTALES DE LA RELACION DE INCORPORACION DE [<sup>14</sup>C]- Y [<sup>3</sup>H]-LEUCINA EN FUNCION DEL TIEMPO. CALCULO DE LAS CONSTANTES APARENTES DE DEGRADACION QUE PRESENTAN LAS DISTINTAS FRACCIONES HEPATICAS A PARTIR DE LA VELOCIDAD DE PERDIDA DEL MARCAJE.**

Relación de incorporación de <sup>3</sup> H y <sup>14</sup> C en las diferentes fracciones hepáticas estudiadas. Valor medio ± Desviación estándar ( Coeficiente de variación, % )					
Tiempo ( días )	Homogeneizado	Mitocondria	Microsomias	Citosol	OTC
1	3,65 ± 0,50 ( 13,7 )	2,88 ± 0,35 ( 12,2 )	3,70 ± 0,59 ( 15,7 )	3,90 ± 0,63 ( 16,2 )	3,68 ± 0,79 ( 21,5 )
3	5,02 ± 0,90 ( 17,9 )	3,86 ± 0,86 ( 22,3 )	5,66 ± 1,07 ( 18,9 )	4,82 ± 1,06 ( 22,0 )	4,04 ± 0,29 ( 7,2 )
6	5,85 ± 0,35 ( 6,0 )	4,35 ± 0,21 ( 4,8 )	7,45 ± 0,07 ( 0,9 )	5,60 ± 0,42 ( 7,5 )	4,10 ± 0,08 ( 1,9 )
10	7,05 ± 0,35 ( 5,0 )	5,10 ± 0,42 ( 8,2 )	9,10 ± 0,0 ( 0,0 )	6,80 ± 0,28 ( 4,1 )	4,75 ± 0,39 ( 8,2 )
Valores correspondientes al ajuste por mínimos cuadrados de la representación del $\ln [^3\text{H}/^{14}\text{C}]_t / [^3\text{H}/^{14}\text{C}]_0$ frente al tiempo					
Ecuación	$y = -0,122 - 0,0812 x$	$y = 0,0075 - 0,0757 x$	$y = -0,136 - 0,1093 x$	$y = -0,139 - 0,0742 x$	$y = -0,105 - 0,0374 x$
Coefficiente de correlación	0,950	0,960	0,954	0,949	0,899
$K_D$ ( días <sup>-1</sup> )	0,081	0,058	0,109	0,074	0,037
$t_{1/2}$ ( días )	8,6	12,0	6,4	9,4	18,7

**TABLA 11.- RELACION DE INCORPORACION DE ISOTOPOS, CONSTANTES DE DEGRADACION Y VIDAS MEDIAS OBTENIDAS APLICANDO EL METODO DEL DOBLE ISOTOPO DURANTE UN INTERVALO ENTRE INYECCIONES DE 3 DIAS.**

<b>Fracción</b>	<b><math>^3\text{H}/^{14}\text{C}</math> X <math>\pm</math> SD ( CV )</b>	<b><math>K_D</math> ( días<sup>-1</sup> )</b>	<b><math>t_{1/2}</math> ( días )</b>	<b>Ecuación ( Coeficiente de correlación )</b>
Homogeneizado	5,02 $\pm$ 0,90 ( 17,9 )	0,195	3,55	
Mitocondria	3,86 $\pm$ 0,86 ( 22,3 )	0,135	5,10	
Microsomas	5,66 $\pm$ 1,07 ( 18,9 )	0,280	2,48	
Citosol	4,82 $\pm$ 1,06 ( 22,0 )	0,200	3,47	
OTC	4,04 $\pm$ 0,29 ( 7,2 )	0,135	5,12	
				$\ln [^3\text{H} / ^{14}\text{C}] = 1,05 + 2,55 K_D$
				( r = 0,951 )

Las fracciones se obtuvieron tal y como se describe en el apartado 4.8. de Métodos. El valor de  $K_D$  para la OTC se obtiene a partir de la ecuación indicada, que representa el ajuste por mínimos cuadrados de la curva estándar, construida a partir de los valores correspondientes al resto de fracciones.

**TABLA 12.- RELACION DE INCORPORACION DE ISOTOPOS, CONSTANTES DE DEGRADACION Y VIDAS MEDIAS OBTENIDAS APLICANDO EL METODO DEL DOBLE ISOTOPO DURANTE UN INTERVALO ENTRE INYECCIONES DE 10 DIAS.**

<b>Fracción</b>	<b><math>^3\text{H} / ^{14}\text{C}</math> X <math>\pm</math> SD ( CV )</b>	<b><math>K_D</math> ( días<sup>-1</sup> )</b>	<b><math>t_{1/2}</math> ( días )</b>	<b>Ecuación ( Coeficiente de correlación )</b>
Homogeneizado	7,05 $\pm$ 0,35 ( 5,0 )	0,20	3,47	$\ln [^3\text{H} / ^{14}\text{C}] = 1,3 + 3,21 K_D$  ( r = 0,997 )
Mitocondria	5,10 $\pm$ 0,42 ( 8,2 )	0,10	6,93	
Microsomas	9,10 $\pm$ 0,00 ( 0,0 )	0,28	2,48	
Citosol	6,80 $\pm$ 0,28 ( 4,1 )	0,20	3,47	
OTC	4,75 $\pm$ 0,39 ( 8,2 )	0,08	8,66	

Las fracciones se obtuvieron tal y como se describe en el apartado 4.8. de Métodos. El valor de  $K_D$  para la OTC se obtiene a partir de la ecuación indicada, que representa el ajuste por mínimos cuadrados de la curva estándar, construida a partir de los valores correspondientes al resto de fracciones.

En la Tabla 11 vemos que, excepto en el caso de los microsomas, todas las fracciones tienen vidas medias superiores al tiempo transcurrido entre las dos administraciones del precursor radiactivo. Por tanto, este intervalo resulta demasiado breve para permitir una buena diferenciación entre los distintos grupos en estudio. Por el contrario, al ampliar el período entre inyecciones a diez días, se obtiene una mayor correlación entre todos los valores experimentales, que además presentan una menor dispersión, y se pueden apreciar mucho mejor las diferencias existentes entre las fracciones. Así vemos que, mientras en la Tabla 11 no existían prácticamente diferencias entre las vidas medias de la OTC y de la mitocondria, al extender el tiempo del experimento hasta diez días ya se aprecian claramente las diferencias (Tabla 12).

El valor obtenido para la vida media de la OTC es de 8,7 días, que es ligeramente superior al encontrado por Nicoletti et al. para la CPS I ( $M_r = 330.000$ ,  $t_{1/2} = 7,7$  días) (468) y claramente mayor que los de la ATPasa ( $M_r = 384.000$ ,  $t_{1/2} = 2,5$  días) (496), Malato Deshidrogenasa ( $M_r = 66.300$ ,  $t_{1/2} = 2,5$  días) y Glutamato Deshidrogenasa ( $M_r = 350.000$ ,  $t_{1/2} = 1$  día) (468). También confirma los resultados de estos autores en lo que se refiere a la falta de correlación, por parte de las enzimas mitocondriales, entre el tamaño de la proteína, o de sus subunidades, y su vida media, en el sentido de que a un mayor tamaño no corresponde una mayor velocidad de degradación, en contra de lo descrito para otras enzimas hepáticas del citosol (199).

Los valores obtenidos aplicando el método del doble isótopo, resultarán tan fiables como lo sean los de las constantes de velocidad de degradación utilizadas en el cálculo, puesto que dependen directamente de éstas. Esto se ilustra en la Tabla 13, donde vemos la influencia que tiene la elección de uno u otro precursor radiactivo en la estimación de las  $K_D$  correspondientes a las fracciones hepáticas en estudio, así como la de aquéllas sobre el resultado que vamos a obtener al aplicar el método del doble isótopo para la determinación de la vida media de la OTC.

Ya vimos que el aminoácido L-leucina no era adecuado debido a la gran reutilización que sufre, y de ahí los elevados valores de  $t_{1/2}$  que con él se obtienen. En el caso de la [guanidino- $^{14}\text{C}$ ] arginina, se puede considerar, en una primera aproximación, que no estará sujeta a reutilización en el hígado, puesto que es hidrolizada por la Arginasa a urea, donde queda incorporado el carbono que lleva el marcaje. No obstante, este precursor también es incorporado a la fracción proteica de otros tejidos que, en contraste con el hígado, apenas poseen Arginasa, y es liberado por aquellos a través de los mecanismos de degradación, por lo que va a ser utilizado de nuevo para la biosíntesis de proteínas.

Consecuentemente, este precursor también está sometido a una cierta reutilización. Así, Swick e Ip (626) han demostrado que la velocidad de pérdida de radiactividad de albúmina marcada

**TABLA 13.- COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS VALORES DE VIDA MEDIA OBTENIDOS PARA LA OTC MEDIANTE EL METODO DEL DOBLE ISOTOPO EN FUNCION DE LAS CONSTANTES DE DEGRADACION EMPLEADAS PARA SU CALCULO.**

Parámetros	Constantes de degradación obtenidas en este trabajo mediante la administración de L-[ <sup>14</sup> C] leucina		Constantes de degradación obtenidas mediante la administración de [ <sup>14</sup> C] guanidino-arginina y empleadas por-Glass y Doyle ( 83 )		Constantes de degradación obtenidas mediante la administración de [ <sup>14</sup> C] bicarbonato, según Lipsky y Pedersen ( 262 )	
	3 días	10 días	3 días	10 días	3 días	10 días
Intervalo	3 días	10 días	3 días	10 días	3 días	10 días
Ecuación	y = 1,0 + 7,05 x	y = 1,05 + 10,87 x	y = 1,05 + 2,55 x	y = 1,3 + 3,21 x	y = 0,68 + 10,95 x	y = 0,87 + 13,5 x
Coefficiente de correlación	0,940	0,977	0,951	0,997	n. a.	n. a.
[ <sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C] <sub>OTC</sub>	4,04	4,75	4,04	4,75	4,04	4,75
<b>K<sub>D</sub> ( días<sup>-1</sup> ) para:</b>						
Homogeneizado	0,081	0,081	0,195	0,200	0,209	0,209
Mitocondria	0,058	0,058	0,135	0,100	0,185	0,185
Microsomas	0,109	0,109	0,280	0,280	-	-
Citosol	0,074	0,074	0,200	0,200	-	-
OTC	0,056	0,047	0,135	0,080	0,189	0,179
t <sub>1/2</sub> ( días )	12,3	14,9	5,1	8,7	3,7	3,9

Los valores de t<sub>1/2</sub> corresponden a las que se obtienen para la OTC según los distintos valores de K<sub>D</sub> calculados mediante las ecuaciones indicadas, que representan el ajuste por mínimos cuadrados de las curvas estándar que se construyen a partir de los valores experimentales de relación de incorporación de isótopos a las diversas fracciones y de sus K<sub>D</sub> correspondientes, n.a. indica no aplicable

con [guanidino- $^{14}\text{C}$ ] arginina es un 30 % más lenta que cuando se marca con [ $^{14}\text{C}$ ] carbonato. Este efecto es todavía más acusado en el caso del hígado en regeneración, en el que no parece haber degradación de proteínas cuando se mide con [guanidino- $^{14}\text{C}$ ] arginina, mientras que la degradación es normal cuando se utiliza el [ $^{14}\text{C}$ ] carbonato. Por tanto, éste puede ser el precursor radiactivo a elegir cuando se pretenda estudiar el recambio proteico en hígado, puesto que es rápidamente incorporado a las proteínas hepáticas debido a que el hígado es el único órgano que posee un apreciable ciclo de la urea, a través del cual el carbonato marcado se introduce en el grupo guanidino de la arginina. No obstante, en algunos aminoácidos tales como glutamato, aspartato y la propia arginina, también se produce una incorporación al grupo carboxilo, aunque la reutilización de estos aminoácidos en animales alimentados con una dieta completa es mínima, pues son descarboxilados en el ciclo de Krebs y el marcaje es diluido por el gran acervo intracelular de carbonato libre.

Otra fuente de error en la determinación de la vida media de la OTC podría proceder del hecho de que, muy probablemente, cualquier proteína sufre un proceso de recambio de acuerdo con una doble cinética (229, 679, 680). Es decir, la curva de pérdida de marcaje en función del tiempo es la resultante de dos cinéticas de degradación de muy distinta pendiente (velocidad) y cuya respectiva contribución a la velocidad de degradación que se observa experimentalmente, es función de la duración del periodo de " pulso ". Sin embargo, al haber seguido en nuestro caso el método del doble isótopo para determinar la velocidad de recambio de la OTC, el periodo mínimo de marcaje que se ha empleado es ya lo suficientemente largo como para que la contribución de la población de moléculas de OTC que son degradadas inmediatamente después de su síntesis - y que se marcan preferencialmente cuanto más breve sea el " pulso " - al valor global de  $t_{1/2}$  sea prácticamente despreciable. Más aún, si tenemos en cuenta que el valor encontrado corresponde a una vida media muy larga.

En resumen, los valores más fiables de las constantes de velocidad de degradación, por lo menos en hígado, son los obtenidos con carbonato o bicarbonato marcados con carbono 14 y, por consiguiente, los datos de vidas medias que se obtengan con dichas constantes serán los más aproximados a la realidad. Trasladando estas consideraciones a los resultados de la Tabla 13, vemos que cuando se emplean precursores radiactivos sujetos a menor reutilización aumentan los valores de las constantes de velocidad de degradación de las distintas fracciones hepáticas, así también conforme aumentan éstas  $K_D$  disminuyen los valores de vida media que se encuentran para la OTC.

La comparación entre el valor de  $t_{1/2}$  de la OTC, calculado haciendo uso de las constantes de degradación obtenidas por Lipsky y Pedersen (370) mediante la administración de [ $^{14}\text{C}$ ] bicarbonato, y los valores de  $t_{1/2}$  que estos autores encuentran para el conjunto de proteínas de

la matriz mitocondrial y de la membrana interna, confirma sus resultados en cuanto a que no existen diferencias significativas en la velocidad de recambio de los polipéptidos que integran ambas subfracciones mitocondriales que, por tanto, parecen ser degradadas de forma coordinada como una sola unidad.

Análogamente, los valores de las vidas medias de la OTC y de la CPS I calculados por el método del doble isótopo se encuentran bastante próximos entre sí y, a su vez, estos resultados concuerdan con la velocidad de recambio que se observa para el conjunto de la mitocondria. Por tanto, nuestros datos indican que estas dos enzimas, que juntas constituyen más del 20 % de la proteína total de la matriz mitocondrial, son degradadas principalmente por medio de la vía autofágica de destrucción lisosómica de la mitocondria. Esta conclusión se ve corroborada por otros estudios (3, 442) que indican que, en el hígado de rata, entre el 70 y el 90 % de la degradación de proteínas transcurre a través de la vía lisosómica, por lo que los lisosomas también deben de estar implicados en la degradación de las proteínas mitocondriales que representan el 20 % de la proteína total y que, como se desprende de nuestros resultados, presentan una velocidad de recambio no muy distinta del resto de las proteínas intracelulares.

#### 5.6.- INACTIVACION Y PROTEOLISIS LISOSOMICA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.

El término degradación proteica describe un proceso por el cual las proteínas nativas se convierten en sus aminoácidos constituyentes. Las reacciones iniciales de esta ruta metabólica pueden no implicar necesariamente la hidrólisis de enlaces peptídicos, sino otro tipo de modificación proteica (inactivación, fosforilación, desnaturalización, interacción con substratos, cofactores o agentes alostéricos, glicosilación, metilación, acetilación, carbamilación, deamidación, unión al polipéptido ubiquitina, etc.) y también pueden, en cierta forma, ser reversibles. Este trabajo parte de la hipótesis de que, tal y como ya se vio en la Introducción con la exposición de los trabajos precedentes de otros autores, son estas primeras reacciones las más importantes en la regulación de la degradación de proteínas - especialmente en la de aquellas que integran un mismo orgánulo, como la mitocondria, y que presentan muy diversas  $t_{1/2}$  - y, por tanto, es hacia el estudio de este tipo de regulación hacia el que se dirige este apartado.

A la hora de adoptar un modelo se eligió trabajar con preparaciones subcelulares *in vitro*, lo que evita todos los problemas técnicos derivados del manejo de sistemas *in vivo*. Con esta aproximación se obtiene un sistema más accesible para la manipulación experimental y, así, el seguimiento de la degradación de una proteína o sus cambios de actividad enzimática se pueden analizar con mayor flexibilidad y fiabilidad. Además, permite identificar reacciones individuales y

Los posibles pasos limitantes de la velocidad en la secuencia degradativa, estudiar por qué medios se podría alterar la degradación de una proteína en particular y, en definitiva, llevar a cabo estudios muy concretos sobre los distintos factores que controlan los procesos intracelulares de degradación proteica. No obstante, mediante estos procedimientos *in vitro* sólo se puede llegar a establecer una serie de relaciones y/o correlaciones con lo que ocurre en el tejido intacto, que deben de servir como base para experimentos más directos.

La degradación de las proteínas de las células de mamíferos tiene lugar por mecanismos lisosomales y no lisosomales, y se puede realizar una clasificación general de las proteínas, en cuanto a su cinética de degradación, en dos categorías. La primera corresponde a las proteínas de vida media corta cuyo proceso degradativo no tiene naturaleza lisosómica, puesto que es resistente a muchos inhibidores de las proteasas lisosomales y se ve poco influenciada por las condiciones nutricionales, hormonas o inhibidores de la síntesis proteica. Con respecto al segundo grupo o proteínas de vida media larga, se debe distinguir entre los estados metabólicos basal y acelerado. Mientras que prácticamente no existen dudas de que la mayor parte, si no toda, de la degradación proteica en el estado acelerado se lleva a cabo por parte del sistema lisosomal, no existe todavía una clara explicación del mecanismo degradativo de las proteínas en el estado basal, ni del papel desempeñado por los lisosomas en condiciones de estado estacionario.

Generalmente se ha postulado que los orgánulos celulares como la mitocondria son degradados en el interior del lisosoma y, así, bajo ciertas condiciones, se han observado mitocondrias enteras o enzimas mitocondriales en el interior de vacuolas autofágicas (197, 222, 328, 329). Sin embargo, la autofagia por sí sola no puede explicar todo el mecanismo de degradación de las proteínas mitocondriales cuando se considera el extenso mosaico de vidas medias que éstas presentan. Cada subcompartimiento mitocondrial tiene su valor promedio de  $t_{1/2}$  que es distinto de los demás; dentro de una misma subfracción mitocondrial se observa una variabilidad en las velocidades de recambio de las diferentes proteínas que la integran, e incluso se encuentran diferencias de velocidades de degradación entre los diversos componentes proteicos de un mismo complejo enzimático o entre las diferentes subunidades de una misma enzima. Por tanto, se puede concluir que la degradación intracelular de las proteínas mitocondriales transcurre por diversos y complejos mecanismos.

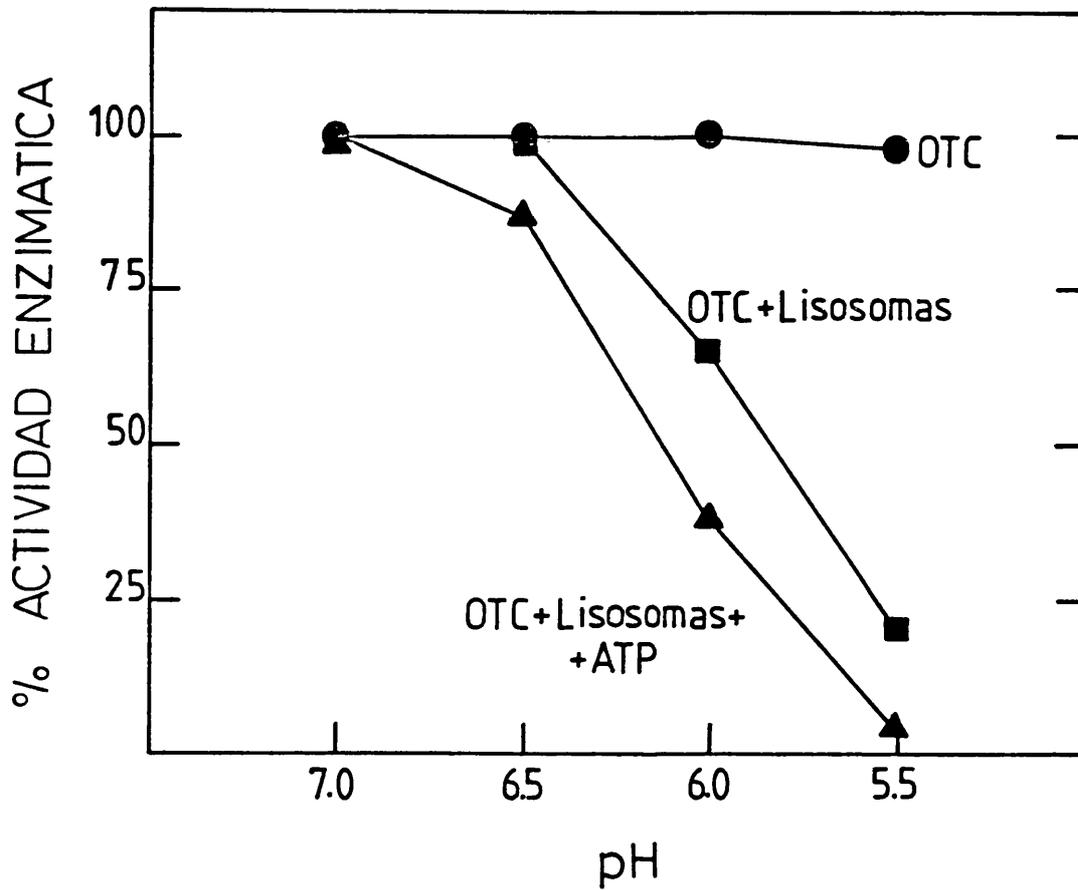
Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, habían demostrado que la degradación de varias enzimas mitocondriales (CPS I, GDH y ATPasa) necesitaba de la cooperación de componentes lisosomales y mitocondriales (228, 606, 651, 653). Cuando comenzamos a trabajar sobre la degradación de la OTC, los primeros resultados mostraron una remarcable estabilidad de su actividad enzimática en homogeneizados de hígado y en preparaciones de mitocondrias y de las subfracciones de éstas, es decir, en mitoplastos y en matriz mitocondrial

(457). Aunque fue precisamente su estabilidad al calor lo que condujo a su descubrimiento (220), resultaba sorprendente que, aun en presencia de la considerable actividad proteolítica que presentan las preparaciones mitocondriales a pH neutro, la OTC no se viera afectada. La única fracción subcelular del hepatocito de rata que muestra una capacidad para inactivar la OTC es la fracción lisosomal y esta inactivación es dependiente del pH. Así, tal y como aparece en la Figura 17, la enzima *per se* es muy estable incluso a pH 5,5, pero es inactivada cada vez más rápidamente por las enzimas lisosomales conforme disminuye el pH, coincidiendo con el conocido hecho de que el lisosoma contiene proteasas ácidas. Sin embargo, no parece tratarse de una mera acción proteolítica indiscriminada, puesto que, como vemos en la misma Figura 17, la inactivación de la OTC por los lisosomas es estimulada por la presencia de ATP.

Una de las principales causas que más ha limitado los avances en la elucidación de los requerimientos energéticos de la proteólisis intracelular ha sido, en muchos casos, la imposibilidad de reproducir este fenómeno *in vitro*, es decir, en preparaciones libres de células. Además, otra complicación adicional es que parecen ser múltiples los papeles que desempeña la energía en la degradación proteica y que, por tanto, esta dependencia energética puede derivarse de un efecto indirecto. No obstante, nos parecía razonable y justificado asumir que el sistema lisosomal podía necesitar energía celular, bien directa o indirectamente.

Así pues, una vez observado el hecho de que la presencia de ATP aumentaba la velocidad de inactivación de la OTC por el conjunto de proteasas ácidas de las preparaciones de lisosomas rotos, comenzamos por una parte a completar la descripción fenomenológica de este efecto, y por otra a intentar esclarecer el mecanismo bioquímico subyacente.

En primer lugar, parecía interesante conocer si la inactivación se debía a proteasas lisosomales solubles o asociadas a membranas. Se fraccionaron las suspensiones de lisosomas rotos mediante centrifugación y se determinó la capacidad de inactivación de la OTC, tanto en el sobrenadante como en el precipitado. De los resultados obtenidos, que se presentan en la Tabla 14, se desprende que, si bien la mayor parte de este efecto reside en la fracción soluble de los lisosomas, también las membranas son capaces de producir inactivación sobre la OTC, y en ambas subfracciones se estimula la inactivación por la presencia de ATP. En realidad, conviene recordar que lo que hemos denominado como membranas constituye la fracción sedimentable, que contendrá no sólo membranas lisosomales, sino restos de membrana plasmática y de otros orgánulos. En este material membranoso, muchas de las actividades enzimáticas pueden pertenecer a la estructura interna del lisosoma, pero también pueden encontrarse adsorbidas de forma inespecífica - muy probablemente mediante interacciones de tipo electrostático - a estos restos estructurales. De hecho, se ha demostrado que varias enzimas lisosomales, cuya actividad está parcialmente ligada a la fracción sedimentable, pueden ser solubilizadas diferencial y reversiblemente en función del pH y



**FIGURA 17.- EFECTO DEL pH SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC Y SU ESTIMULACION POR ATP.**

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 30 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH del pH correspondiente, 5 mM DTE, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,008 unidades de  $\beta$ -NAGASA y, cuando se añadió, 1 mM ATP.

**TABLA 14.- INACTIVACION DE LA OTC POR LISOSOMAS ROTOS Y SUBFRACCIONES DE LOS MISMOS.**

Adiciones	% de la actividad enzimática inicial
Ninguna	100
Lisosomas	25
Lisosomas + ATP	4
Fracción soluble lisosomal	41
Fracción soluble lisosomal + ATP	16
Membranas	65
Membranas + ATP	33
Fracción soluble lisosomal + Membranas	22
Fracción soluble lisosomal + Membranas + ATP	4

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: 0,2 M tampón fosfato potásico pH 5,5, 5 mM MSH, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,03 unidades de  $\beta$ -NAGASA o sus subfracciones correspondientes y, en los casos en que se añadió, 1 mM ATP.

de la fuerza iónica (49, 254). En cualquier caso, mediante esta aproximación de rotura del lisosoma por hipotonicidad y congelación y descongelación, no se puede concluir si la partición del efecto de inactivación de la OTC entre ambas fracciones responde a la organización real *in vivo* del lisosoma.

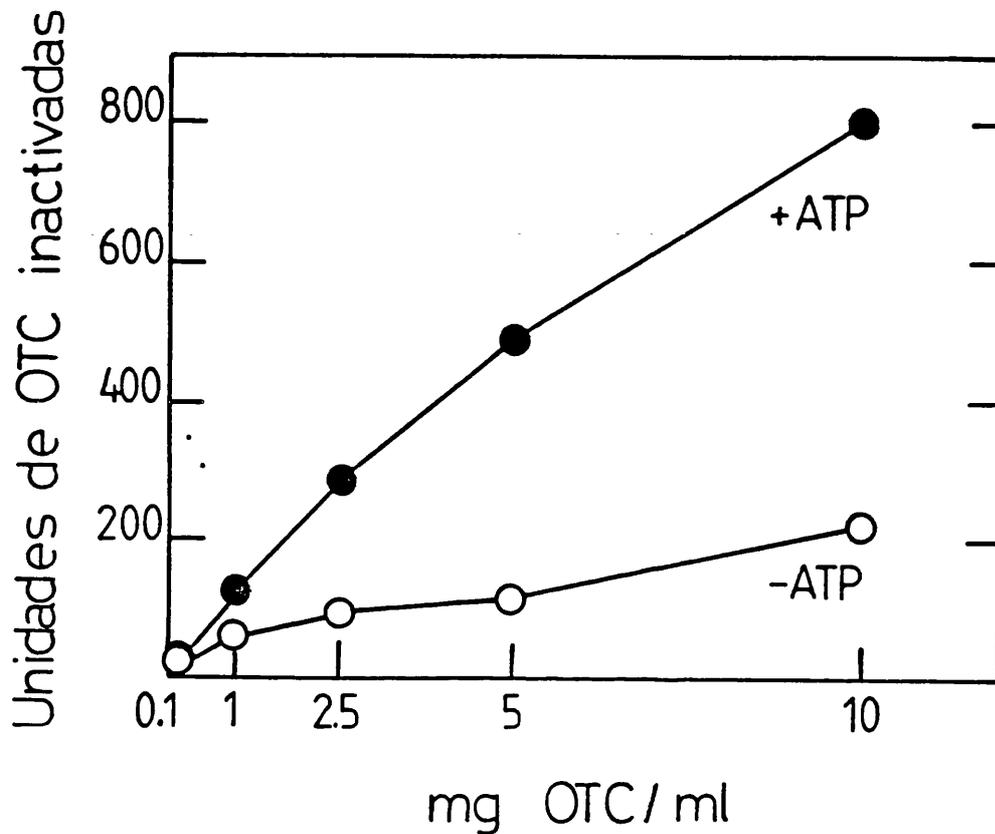
La velocidad de inactivación de la OTC por lisosomas aumenta conforme lo hace la concentración de esta proteína sustrato. Además, este incremento es mucho mayor en presencia de ATP. Así, en la Figura 18, vemos que para una misma cantidad de ATP y de lisosomas, el efecto de estimulación sobre la velocidad de inactivación se hace cada vez más patente conforme aumentamos la concentración del sustrato, es decir, de OTC.

Una característica interesante de este efecto de estimulación, es que tiene lugar en el intervalo de concentraciones fisiológicas de ATP. Así, si consideramos que la curva de la Figura 19 se puede aproximar a una hipérbola, obtenemos una  $K_s$  aparente aproximadamente igual a 0,2 mM. Además, otra peculiaridad destacable es la ausencia de una necesidad de iones magnesio para que se produzca la estimulación. Más bien ocurre al contrario y, tal y como vemos en la Tabla 15, al ir aumentando la concentración de  $Mg^{2+}$ , va disminuyendo el efecto del ATP, muy probablemente debido a que el complejo que forman ambos compuestos no tiene capacidad para inducir el mencionado aumento de la velocidad de inactivación de la OTC.

En la Tabla 16, podemos observar el efecto que ejercen los sustratos y productos de la reacción catalizada por la OTC, sobre su inactivación por los lisosomas. En presencia de carbamil fosfato se obtiene una protección total de la enzima frente a cantidades de lisosomas que la inactivan por completo en su ausencia. Los otros ligandos ejercen una influencia muy pequeña, siendo el fosfato inorgánico el único que presenta un cierto efecto protector. La N- $\alpha$ -acetilornitina, el ion  $Ca^{2+}$  o el NADPH, tampoco presentan efecto alguno sobre la inactivación lisosómica de la OTC (datos no presentados).

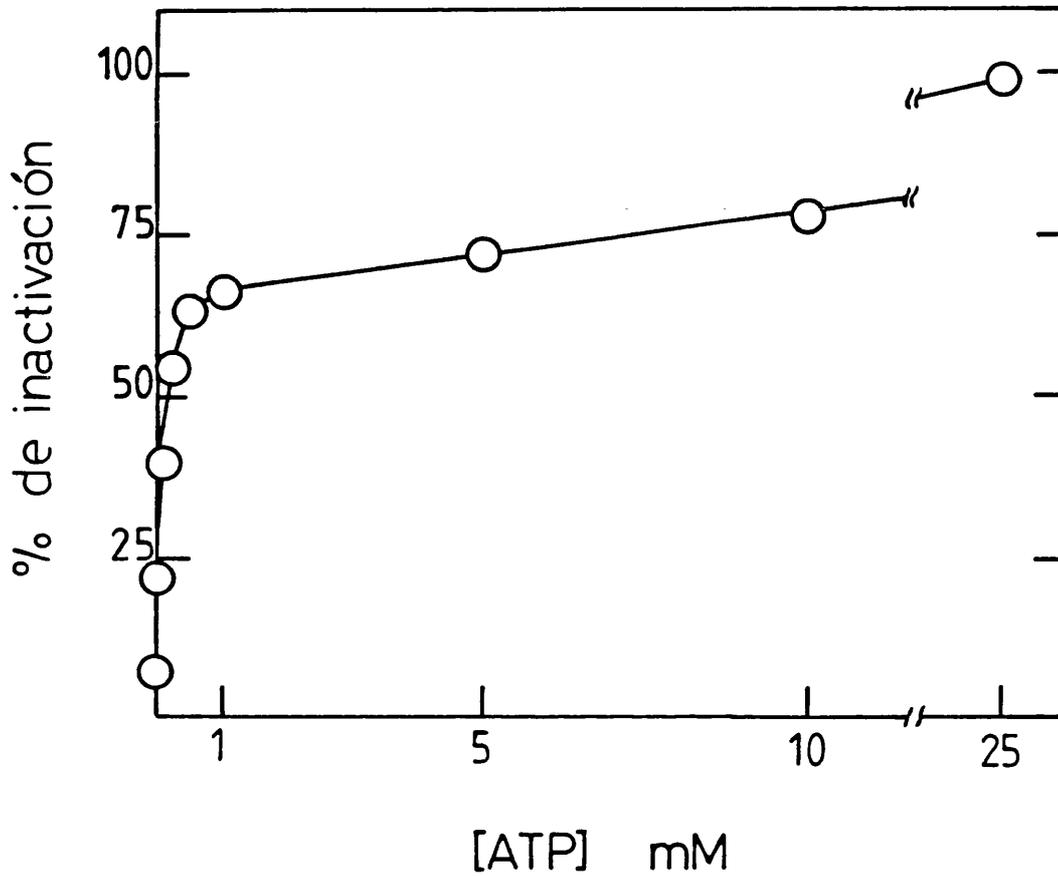
En este rango de valores de pH ácido, la enzima no se une al carbamil fosfato tan fuertemente como lo hace en el pH óptimo para su actividad enzimática. Sin embargo, tal y como vemos en la Figura 20, la presencia de ATP aumenta considerablemente la afinidad de la enzima por el carbamil fosfato, y de esta curva podemos obtener una  $K_s$  aparente para el efecto protector del carbamil fosfato, en presencia de ATP, aproximadamente igual a 20  $\mu$ M, encontrándose este valor muy próximo al que otros autores han descrito a partir de las medidas de actividad enzimática a pH 7,9 (381).

Con objeto de esclarecer la especificidad del efecto estimulador del ATP, ensayamos diversos nucleótidos de bases púricas y pirimidínicas. De los resultados de la Tabla 17, se deduce que sólo los nucleótidos de bases púricas son capaces de estimular la inactivación de la OTC por



**FIGURA 18.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE OTC Y DE LA PRESENCIA DE ATP SOBRE SU VELOCIDAD DE INACTIVACION POR LISOSOMAS.**

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 15 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,0015 unidades de  $\beta$ -NAGASA, las cantidades indicadas de OTC de vaca y, cuando se añadió, 1 mM ATP.



**FIGURA 19.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ATP SOBRE LA INACTIVACION DE LA OTC POR LISOSOMAS.**

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 1 hora, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 20  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,003 unidades de  $\beta$ -NAGASA, y las cantidades indicadas de ATP.

**TABLA 15.- EFECTO DEL ION MAGNESIO SOBRE LA ESTIMULACION DEL ATP EN LA DEGRADACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

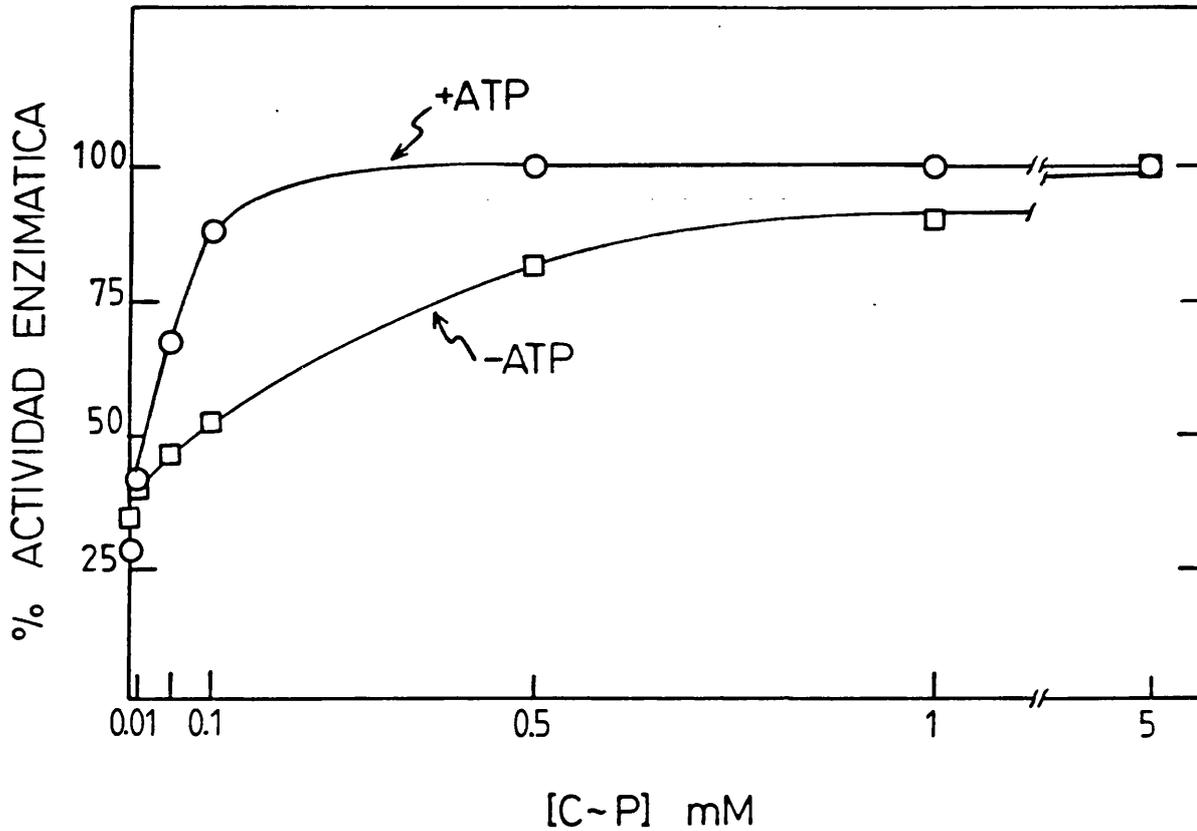
Adiciones	% de la actividad enzimática inicial	
	Tiempo de incubación	
	15'	30'
Ninguna	100	100
Lisosomas	88	78
Lisosomas + ATP + EDTA 5 mM	83	63
Lisosomas + ATP	67	45
Lisosomas + ATP + Mg <sup>2+</sup> 0,5 mM	70	54
Lisosomas + ATP + Mg <sup>2+</sup> 2 mM	74	59
Lisosomas + ATP + Mg <sup>2+</sup> 5 mM	78	66

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 10 µg de OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad igual a 0,015 unidades de β-NAGASA, 1 mM ATP en los casos en que se añadió y las cantidades indicadas de EDTA y MgCl<sub>2</sub>.

**TABLA 16.- INFLUENCIA DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE LA REACCION CATALIZADA POR LA OTC SOBRE SU INACTIVACION LISOSOMICA.**

Adiciones	% de la actividad enzimática inicial		
	pH		
	6,5	6,0	5,5
<b><u>Experimento 1</u></b>			
Ninguna	100	100	100
Lisosomas	91	47	2
Lisosomas + ornitina 10 mM	97	64	9
Lisosomas + citrulina 10 mM	96	62	11
Lisosomas + P <sub>i</sub> 20 mM	100	70	20
<b><u>Experimento 2</u></b>			
Ninguna	100	100	100
Lisosomas	67	33	0
Lisosomas + carbamil fosfato 10 mM	100	100	97

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante una hora, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH del pH indicado, 10  $\mu$ g de OTC, 5 mM DTE, las concentraciones indicadas de sustratos o productos, cuando estos se añadieron, y lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,05 unidades de  $\beta$ -NAGASA en el Experimento 1, y 0,06 unidades en el Experimento 2.



**FIGURA 20.- EFECTO PROTECTOR DEL CARBAMIL FOSFATO SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 30 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,009 unidades de  $\beta$ -NAGASA, 1 mM ATP en los casos en que se añadió y las cantidades indicadas de carbamil fosfato.

**TABLA 17.- EFECTO DE DIVERSOS NUCLEOTIDOS DE BASES PURICAS Y PIRIMIDINICAS SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

Nucleotido adicionado	% de la actividad enzimática inicial		Nucleotido adicionado	% de la actividad enzimática inicial
Ninguno	72		UTP	79
ATP	54		UDP	78
ADP	51		CTP	71
AMP	71		CDP	66
GTP	34		IDP	76
GDP	35		$\epsilon$ -ATP	1

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante una hora, contenía: 0,2 M tampón fosfato potásico pH 5,5, 5 mM MSH, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,08 unidades de  $\beta$ -NAGASA, y 1 mM de los nucleótidos indicados. En todos los casos se realizaron controles que contenían sólo OTC y los distintos nucleótidos, sin que la presencia de éstos afectara en modo alguno a su estabilidad o actividad enzimática.

los lisosomas. Además, también es necesario que sean compuestos ricos en energía, puesto que solo las formas tri- y difosfatadas de dichos nucleótidos son efectivas. Es de destacar que, tal y como muestra la Tabla 18, los nucleótidos de guanina son más efectivos en la estimulación que los nucleótidos de adenina.

Para intentar clarificar la naturaleza de esta estimulación ATP-dependiente, hemos empleado diversos análogos de ATP, según se indica en la Tabla 19. Algunos de estos análogos solo presentan un discreto efecto estimulador en presencia de fosfato y se vuelve a confirmar el hecho de que aquellos que no tienen capacidad de transferencia de grupos fosfato, tales como el  $AP_3A$  y el  $AP_2A$ , no manifiestan efecto alguno. Resulta interesante que el nucleótido que mayor estimulación produce es un análogo del ATP, el  $\epsilon$ -ATP o 1,N<sup>6</sup> etenoadenosina 5'-trifosfato, y esta acción también es dependiente de la concentración, como se demuestra en la Figura 21.

Este  $\epsilon$ -ATP (ver Fig. 22), es un análogo del ATP que presenta dos características muy importantes, que son: su alta fluorescencia y su actividad biológica como sustrato, en sustitución del ATP, en muchos sistemas enzimáticos (585, 586). En relación con la primera de estas propiedades, presenta un espectro de emisión con un máximo a 415 nm. al ser excitado, bien a 275 (máximo del espectro de absorción) o 300 nm. Por tanto, puede ser excitado y detectado sin interferencias debidas a la presencia de proteínas o ácidos nucleicos, y la intensidad de su fluorescencia es tal que el  $\epsilon$ -ATP se puede detectar en el rango de concentración de  $10^{-8}$  M. Pero es su actividad biológica lo que lo convierte en una herramienta verdaderamente útil, pues se ha demostrado que puede sustituir al ATP en reacciones de transferencia de grupos fosfato, pirofosfato y adenina, pudiendo servir como sustrato a enzimas tales como: Hexokinasa, Piruvato Kinasa, Adenilato Kinasa o Fosforibosilpirofosfato Sintetasa (585, 586). Aún más destacable es el papel que puede desempeñar como agente alostérico. Así, la Fosfofructokinasa que presenta una inhibición alostérica por altas concentraciones de ATP o UTP, pero no por GTP, ITP, o CTP, puede utilizar  $\epsilon$ -ATP ( $K_m = 0,030$  mM frente a 0,013 mM para el ATP), y también se ve inhibida alostéricamente por altas concentraciones de este análogo. Muy probablemente, la clave de la actividad biológica del  $\epsilon$ -ATP se encuentra en el relativamente pequeño cambio que se introduce en la estructura del núcleo de adenina, y en que el nuevo anillo formado es prácticamente coplanar con los dos de la base púrica.

A pesar de la presencia de una actividad ATPasa en las preparaciones lisosomales, la Tabla 20 muestra claramente que durante la inactivación de la OTC por los lisosomas se produce un notable aumento en el consumo de ATP. Es decir, la estimulación que se produce en la velocidad de inactivación de la OTC por los lisosomas al añadir ATP, va acompañada de la hidrólisis de éste. Por consiguiente, decidimos ensayar el efecto de diversos inhibidores de ATPasas sobre esta inactivación lisosómica de la OTC. Los resultados, que se presentan en la Tabla 21, indican que ni

**TABLA 18.- EFECTO DE DIVERSOS NUCLEOTIDOS DE GUANINA SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

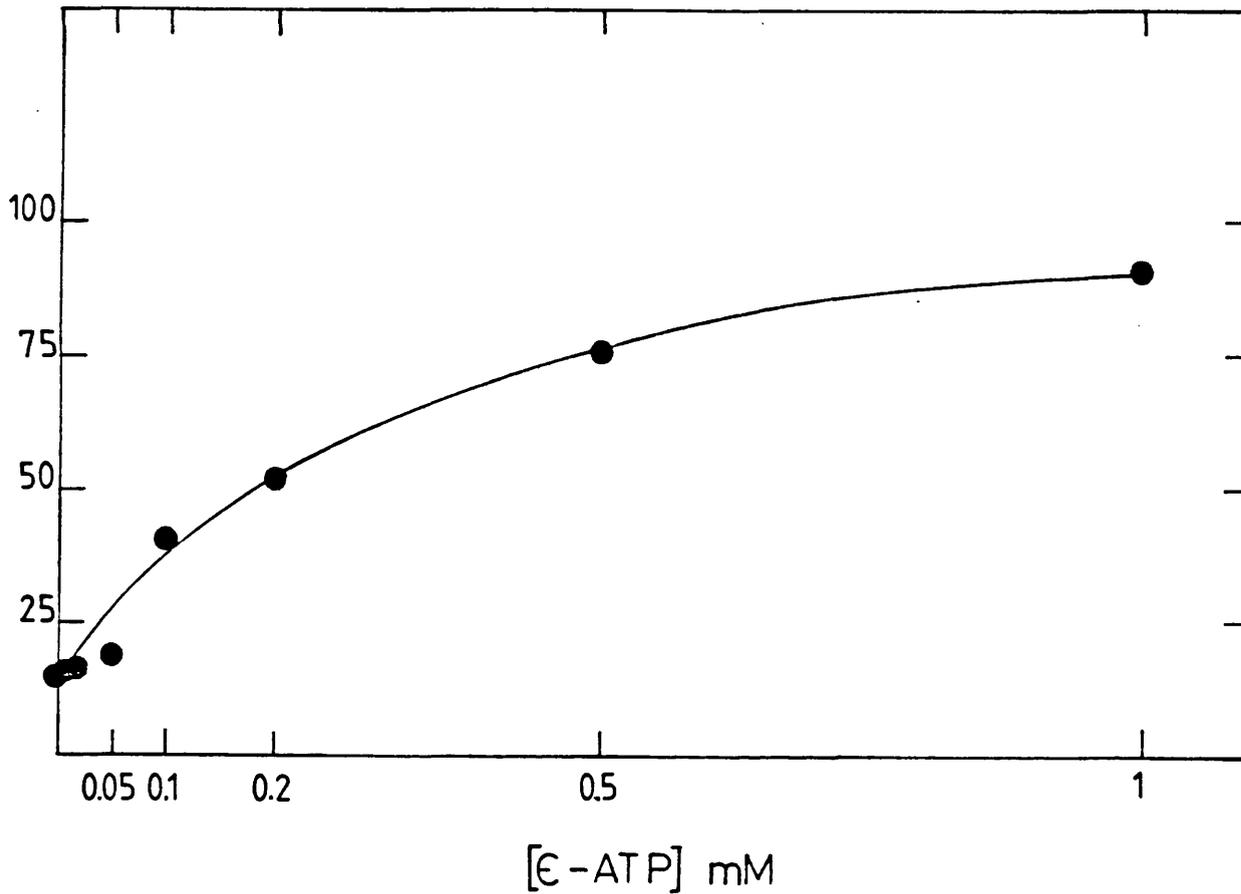
Adiciones	% de la actividad enzimática inicial	
	Tiempo de incubación	
	15'	30'
Ninguna	100	100
NXP*	100	100
Lisosomas	90	64
Lisosomas + ATP	31	11
Lisosomas + GTP	16	3
Lisosomas + GDP	17	6
Lisosomas + GMP	90	62
Lisosomas + c-GMP	81	55
Lisosomas + d-GTP	25	11
Lisosomas + d-GMP	84	67

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 20  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,01 unidades de  $\beta$ -NAGASA y 1 mM de los nucleotidos indicados. \* NXP indica y resume todos los controles efectuados incubando sólo la OTC con los diversos nucleótidos.

**TABLA 19.- EFECTO DE DIVERSOS NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y ANALOGOS DE LOS MISMOS SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

<b>Nucleotido adicionado</b>	<b>% de la actividad enzimática inicial</b>
Ninguno	58
ATP	22
d-ATP	29
d-AMP	60
c-AMP	56
ATP- $\gamma$ -S	44
ADP- $\beta$ -S	58
AP <sub>5</sub> A	57
AP <sub>6</sub> A	62
$\epsilon$ -ATP	1
dibutilil-c-AMP	50
Ado-PP[CH <sub>2</sub> ]P	58
Ado-PP[NH]P	69
Ado-P[CH <sub>2</sub> ]PP	60

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 30 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,008 unidades de  $\beta$ -NAGASA y 1 mM de los nucleótidos indicados. En todos los casos se efectuaron controles, incubando los diversos nucleótidos y análogos de los mismos sólo con la OTC, sin que en ningún caso se viera afectada su estabilidad o su actividad enzimática.



**FIGURA 21.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE  $\epsilon$ -ATP SOBRE LA INACTIVACION DE LA OTC POR LISOSOMAS.**

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 3 horas, contenía: 0,2 M tampón fosfato potásico pH 5,5, 5 mM MSH, 1,2  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,02 unidades de  $\beta$ -NAGASA y las cantidades indicadas de  $\epsilon$ -ATP.

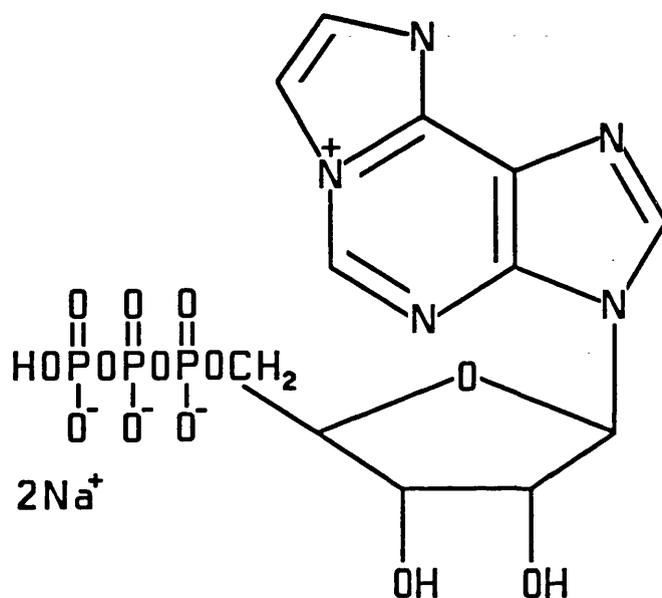


FIGURA 22.- ESTRUCTURA DEL  $\epsilon$ -ATP.

Se muestra la estructura del 1,N<sup>6</sup> etenoadenosina 5'-trifosfato (sal disódica). La fórmula del producto comercial y su peso molecular son, respectivamente:  $C_{12}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2 \cdot 2 H_2O$  y 611,22. Se prepara mediante síntesis química por reacción en medio acuoso del ATP con el cloroacetaldehído.

**TABLA 20.- CONSUMO DE ATP DURANTE LA INACTIVACION Y PROTEOLISIS LISOSOMICA DE LA OTC.**

Adiciones	% de la concentración inicial de ATP			
	Tiempo de incubación (minutos)			
	0	10	20	30
OTC + ATP	100	105	101	98
Lisomas + ATP	100	63	28	12
OTC + Lisomas + ATP	100	18	5	0,5

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 1 mM ATP y, en los casos en que se añadieron, 75  $\mu$ g de OTC de vaca y lisomas rotos en una cantidad equivalente a 0,026 unidades de  $\beta$ -NAGASA. En los intervalos de tiempo indicados se tomaban alícuotas para la determinación de ATP por bioluminiscencia, según se detalla en el apartado 4.19. de Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de cpm. medidas en el contador de centelleo para cada muestra, respecto de las cpm determinadas para una solución 1 mM de ATP, incubada en las mismas condiciones y durante los mismos intervalos de tiempo.

**TABLA 21.- EFECTO DE DIVERSOS INHIBIDORES DE ATPASAS SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

Adiciones	Concentración	% de la actividad enzimática inicial	
		Sin adición de ATP	+ ATP 1 mM
Ninguna		100	100
Lisosomas		35	2
Lisosomas + Ouabaina	0,1 mM	36	2
Lisosomas + Oligomicina	0,1 mM	38	8
Lisosomas + Quercetina	0,5 mM	49	8
Lisosomas + Vanadato	1 mM	8	2

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estandar durante 30 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,022 unidades de  $\beta$ -NAGASA y las concentraciones indicadas de los correspondientes inhibidores y de ATP. En todos los casos se efectuaron controles, incubando los diversos inhibidores sólo con la OTC, sin que nunca se viera afectada su estabilidad o actividad enzimática.

los inhibidores específicos de las ATPasas de membrana, como son la oligomicina y la ouabafina, ni los inhibidores de las ATPasas solubles, como la quercetina y el vanadato, ejercen efecto alguno sobre la inactivación lisosómica ATP-dependiente de la OTC. Sin embargo, sí que resulta interesante el hecho de que el vanadato, que ha sido propuesto como un análogo del fosfato inorgánico en reacciones llevadas a cabo por fosfotransferasas o fosfohidrolasas, aumente la velocidad de la inactivación lisosómica de la OTC independientemente de la presencia de ATP.

Para conseguir una evidencia más clara sobre la naturaleza del efecto de los nucleótidos de bases púricas, recurrimos al empleo de dos proteasas no lisosomales: la Tripsina y la Elastasa de las que se conoce sin ninguna ambigüedad que no requieren o utilizan ATP ni otros nucleótidos de purinas. También en este caso (ver Tabla 22), la presencia de estos nucleótidos produce una estimulación de la pérdida de la actividad de la OTC, sobre todo en el caso del  $\epsilon$ -ATP, aunque la magnitud del efecto es menor que cuando se utiliza el sistema proteolítico lisosomal. Por tanto, la acción de los nucleótidos se produce sobre la OTC y no sobre las proteasas lisosomales, si bien éstas presentan una marcada especificidad para degradar a la OTC, sobre todo en presencia de nucleótidos de purina. Además, esta selectividad del sistema lisosomal hepático se ve corroborada, por una parte por el hecho de que los lisosomas de cerebro de rata no son capaces de inactivar a la OTC ni en presencia ni en ausencia de ATP, y por otra debido a que el sistema proteolítico ATP-dependiente de los reticulocitos tampoco presenta efecto alguno sobre la OTC (ver Tabla 23).

La inactivación de la OTC por las proteasas lisosomales va seguida de una extensa proteólisis, tal y como se demuestra midiendo bien la aparición de material ninhidrina-positivo (datos no presentados), o bien la liberación de radiactividad  $\text{Cl}_2\text{AcOH}$ -soluble a partir de  $^{125}\text{I}$ -OTC (ver Figura 23). Sin embargo, aunque en ambos casos la adición de ATP provoca una caída de la actividad enzimática mucho mayor que en su ausencia, esta estimulación de la velocidad de degradación no va acompañada de un aumento proporcional de la proteólisis, sino que ésta no se ve modificada, aunque sí que se produce una más rápida desaparición de la banda correspondiente a la OTC. Así, vemos en la Figura 24 que el patrón de ruptura proteolítica que producen los lisosomas sobre la OTC no se modifica cualitativamente por la presencia de ATP, pero sí que lo hace cuantitativamente, puesto que la velocidad de desaparición de la banda correspondiente a la OTC y de aparición de los péptidos resultantes es mayor cuando se añade ATP, detectándose sólo la presencia de dos fragmentos peptídicos de pesos moleculares alrededor de 24.000 y 15.000, respectivamente (ver Figura 25).

Todo lo expuesto anteriormente, parece indicar que el papel que desempeñan el ATP y los otros nucleótidos de purina es el de modificadores alostéricos que, al inducir un cambio conformacional en la OTC, provocan que la forma fisiológicamente activa de la enzima sea más susceptible a una desnaturalización y/o ruptura proteolítica inicial. Muy probablemente, esta

**TABLA 22: EFECTO DE DIVERSOS NUCLEOTIDOS DE PURINA SOBRE LA INACTIVACION DE LA OTC POR TRIPSINA Y ELASTASA.**

Nucleótido adicionado	% de la actividad enzimática inicial	
	Tripsina	Elastasa
Ninguno	61	37
ATP	61	33
GTP	54	30
$\epsilon$ -ATP	21	10

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 1 hora, contenía: 0,2 M tampón fosfato potásico pH 5,5, 5 mM MSH, 10  $\mu$ g de OTC de vaca, 80 ng de tripsina o 10  $\mu$ g de elastasa y, cuando se adicionaron, 1mM del nucleótido correspondiente.

**TABLA 23.- EFECTO DE DIVERSOS SISTEMAS PROTEOLITICOS SOBRE LA OTC.**

Adiciones	% de la actividad enzimática inicial	
	Sin adición de ATP	Con adición de ATP
Ninguna	100	100
Lisosomas hepáticos obtenidos según Ragab et al.	27	5
Lisosomas hepáticos obtenidos según Wattiaux et al.	0	0
Lisosomas de cerebro	149	121
Sistema proteolítico del reticulocito	123	110
[ <sup>125</sup> I]-BSA + Sistema proteolítico del reticulocito	1,5*	12,5*

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: a) en los casos en que el sistema proteolítico era de procedencia lisosomal, 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 10 µg OTC de vaca, lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,007 unidades de β-NAGASA y 1 mM ATP, siendo el tiempo de incubación de 30 minutos; b) en las incubaciones con el sistema proteolítico de los reticulocitos y dependiente de ubiquitina, 0,1 M Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 10 mM fosfocreatina, 10 µg Fosfocreatina Kinasa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µg de proteína de la fracción APF-I, 1,3 mg de proteína de la fracción II (ambas purificadas según se describe en la referencia 567), 3 µg de OTC ó 2 µg de [<sup>125</sup>I]-BSA (10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> cpm/µg de proteína) y 0,5 mM ATP, siendo el tiempo de incubación de 2 horas. Los valores marcados con un asterisco (\*) indican el % de radiactividad Cl<sub>3</sub>AcOH soluble que se produce por la acción del sistema proteolítico sobre la [<sup>125</sup>I]-BSA.



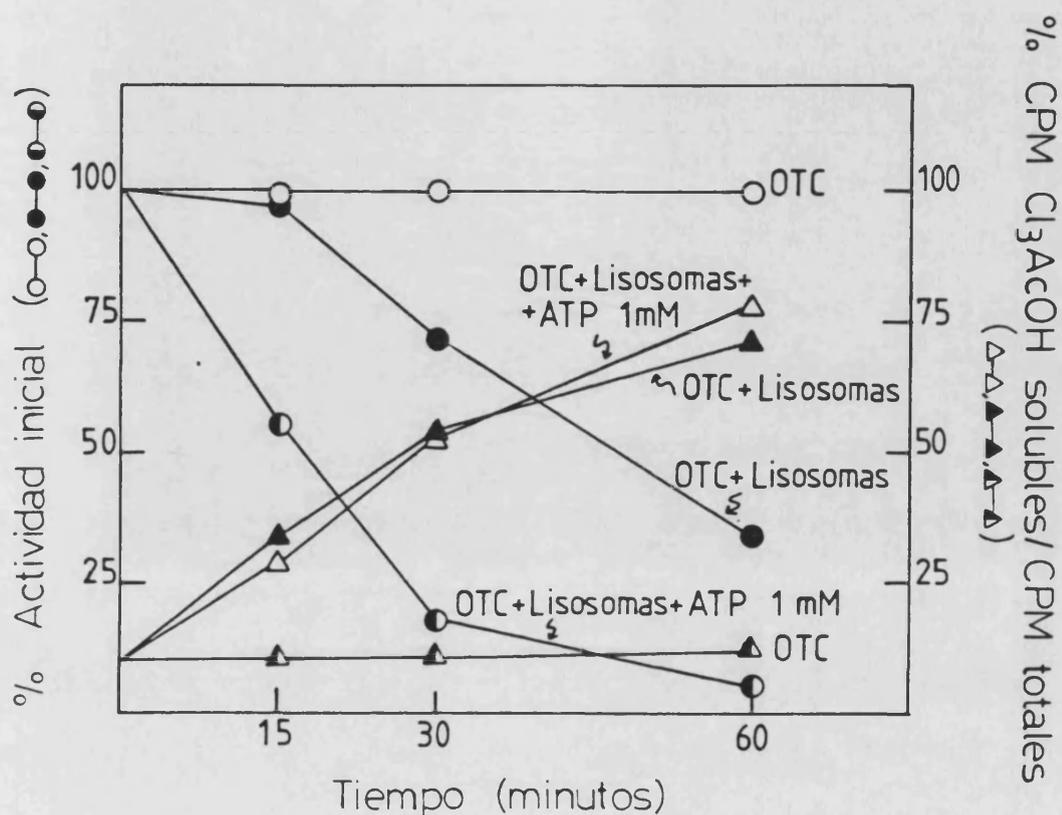
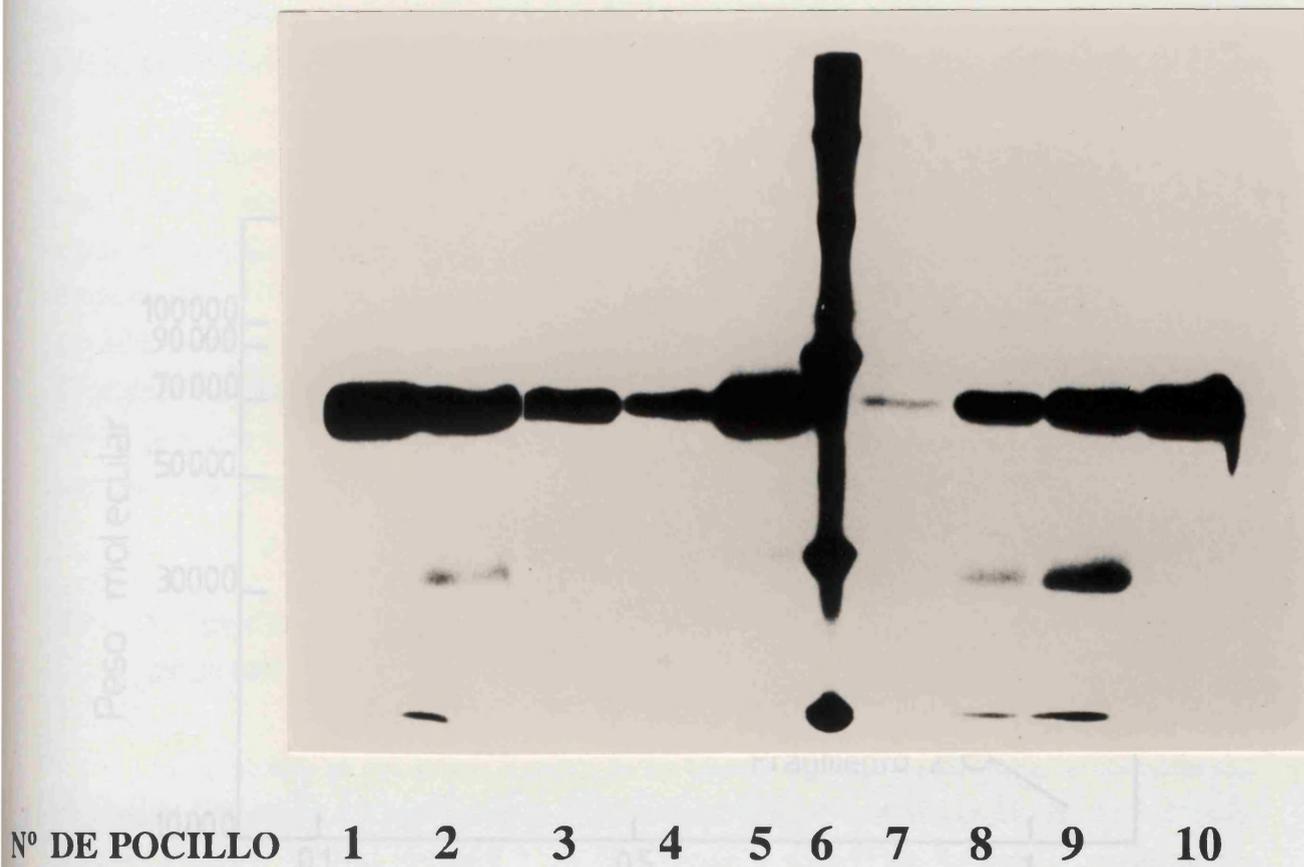


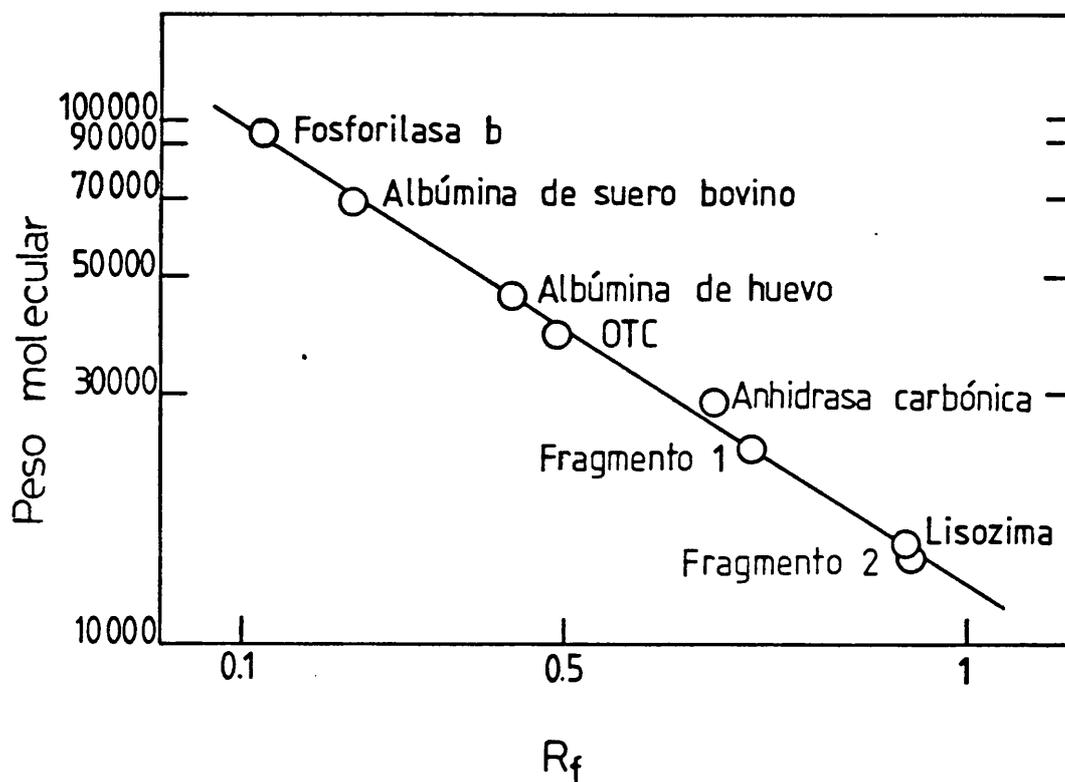
FIGURA 23.- INACTIVACION Y PROTEOLISIS DE [ $^{125}$ I]-OTC POR LISOSOMAS.

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, [ $^{125}$ I]-OTC (28.000 cpm; 7.000 cpm./U) y 20  $\mu$ g de OTC de vaca, y lisosomas rotos en una cantidad equivalente a 0,015 unidades de  $\beta$ -NAGASA. En los intervalos de tiempo indicados se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de OTC y la radiactividad  $\text{Cl}_3\text{AcOH}$  soluble e insoluble.



**FIGURA 24.- DEGRADACION Y PATRON DE RUPTURA PROTEOLITICA DE LA OTC POR LISOSOMAS.**

Los precipitados resultantes de la adición de  $\text{Cl}_3\text{AcOH}$  a las alícuotas del experimento de la Fig. 23, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior fluorografía (1 mes de exposición a  $-80^\circ\text{C}$ ). Los pocillos 1 a 4 contienen las muestras de OTC tratadas con lisosomas rotos tras 0, 15, 30 y 60 minutos de incubación, respectivamente; el pocillo 5 corresponde a la OTC de vaca purificada y radioyodurada; el pocillo 6 contiene los marcadores de peso molecular (ver Fig. 25) y los pocillos 7 al 10 las muestras de OTC tratadas con lisosomas rotos y 1 mM ATP a 60, 30, 15 y 0 minutos de incubación, respectivamente.



**FIGURA 25.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS FRAGMENTOS PEPTIDICOS QUE ORIGINA LA ACCION PROTEOLITICA DE LOS LISOSOMAS SOBRE LA OTC.**

Se ha representado el logaritmo del peso molecular de los diferentes patrones empleados (Fosforilasa b, 92.500; Albúmina de suero bovino, 69.000; Ovoalbúmina, 46.000; Anhidrasa Carbónica, 30.000; Lisozima, 14.300) en función de su movilidad relativa ( $R_f$ ). El cálculo del peso molecular de los fragmentos peptídicos que origina la acción de los lisosomas rotos sobre la OTC, se efectúa introduciendo los correspondientes valores de  $R_f$  en la ecuación de la recta de ajuste resultante para los patrones.

primera etapa es el paso limitante de la velocidad de la reacción de degradación y en la que se produce el consumo de energía, después de la cual la OTC es sometida a una proteólisis indiscriminada por el conjunto de las peptidasas lisosomales.

Con objeto de caracterizar la o las proteasas responsables de este primer paso hidrolítico, estudiamos el efecto de diversos inhibidores (ver Tabla 24). La inactivación de la OTC es totalmente anulada por la leupeptina (un inhibidor de la Catepsina B y otras cisteínproteinasas), la antipafina (un inhibidor de las Catepsinas A y B, de la Papafina y de la Tripsina) y el TosPheCH<sub>2</sub>Cl (un inhibidor de serín- y cisteínproteinasas), pero no por la pepstatina (un inhibidor específico de la Catepsina D), todo lo cual sugiere que la susceptibilidad proteolítica de la OTC a los lisosomas se deba a la acción de una(s) cisteín-endopeptidasa(s), aunque no se pueda descartar la actuación de serínproteasas, pese a que su presencia en los lisosomas es muy minoritaria (62, 67).

#### **5.7.- ESTRUCTURA PROTEICA Y ESTABILIDAD INTRACELULAR DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES.**

Las proteínas se construyen a partir de un número limitado de elementos arquitectónicos, muchos de los cuales están implicados en el plegamiento general de dichas moléculas. Pero además, también existen " motivos proteicos ", es decir, cortas y conservadas secuencias peptídicas que están implicadas en multitud de funciones como, por ejemplo, reconocimiento, catálisis, unión de ligandos, etc, (38), y que se encuentran separadas de las otras propiedades funcionales de la molécula proteica en donde se presentan. Por tanto, estos motivos son lineales en el sentido de que no es necesaria una organización tridimensional de la molécula que permita reunir partes distantes de la secuencia proteica y haga posible su identificación como una unidad.

La presencia de un determinado motivo en la secuencia de una proteína, puede servir como " huella dactilar " que identifique una posible función que haya podido pasar inadvertida. Con esta idea, se han sometido las secuencias peptídicas de las OTC humana, de rata y de ratón, a un análisis computerizado para intentar detectar la presencia de algún motivo proteico. Mediante el uso del paquete informático GCG se han ensayado la totalidad de los 609 motivos descritos y recopilados hasta la fecha (38). Tan sólo cinco de entre ellos han dado un resultado positivo (ver Tabla 25, donde se presentan los resultados correspondientes a la OTC de rata, ya que dada la alta conservación en la secuencia de aminoácidos entre las distintas OTC, se repiten y sólo se presentan los mismos motivos en todas ellas, y las pequeñas diferencias que existen en algún caso no son significativas), que son:

**TABLA 24.- EFECTO DE DIVERSOS INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA INACTIVACION LISOSOMICA DE LA OTC.**

Adiciones	Concentración	% de la actividad enzimática inicial	
		Sin adición de ATP	+ ATP 1 mM
<u>Experimento 1</u>			
Ninguna		46	5
PheMeSO <sub>2</sub> F	1 mM	46	7
Pepstatina A	20 µg/ml	50	8
Leupeptina	20 µg/ml	100	100
<u>Experimento 2</u>			
Ninguna		25	0,5
Elastatinal	20 µg/ml	48	2,5
TosPheCH <sub>2</sub> Cl	1 mM	100	98
Antipafna	20 µg/ml	100	100
N-Etilmaleimida	5 mM	37	2

El medio de reacción, incubado bajo condiciones estándar durante 30 minutos, contenía: 0,2 M tampón Mes/NaOH pH 5,5, 5 mM DTE, 20 µg de OTC de vaca, lisosomas en una cantidad equivalente a 0,02 unidades de β-NAGASA en el experimento 1 y 0,03 unidades en el experimento 2 y, cuando se añadieron, las concentraciones indicadas de ATP y de los distintos inhibidores.

**TABLA 25: MOTIVOS PROTEICOS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE RATA.**

MOTIVO <sup>a</sup>	SECUENCIA CONSENSO <sup>b</sup>	DESCRIPCION Y LOCALIZACION DE LA SECUENCIA ENCONTRADA <sup>c</sup>
Asn-Glicosilación	N-{P}-[ST]-{P}	47: LLTLK NFTG EEIQV 121: IHLGV NESL TDTAR 240: QYAKE NGTR LSMTN
cAMP-fosforilación	[RK] <sub>(2)</sub> -X-[ST]	88: GMIFE KRST RTRLS 330: PEAEN RKWT IMAVM
Carbamiltransferasa	F-X-[EK]-X-S-T-R-T	86: SLGMI FEKRSTR RTSTE
CK-2-fosforilación	[ST]-X <sub>(2)</sub> -[DE]	49: TLKNF TGEE IQYML 112: HPSFL TTQD IHLGV 123: LGVNE SLTD TARVL 133: ARVLE SMTD AVLAR 146: RVYKQ SDL ILAKE 178: LADYL TLQE HYGSL
PKC-fosforilación	[ST]-X-[RK]	44: GRDLL TLK NFTGE 90: IFEKR STR TRLST 127: ESLTD TAR VLSSM 185: QEHYG SLK GLTSL 219: HLQAA TPK GYEPD 287: QGYQV TMK TAKVA 290: QVTMK TAK VAASD 318: DEVFY SPR SLVFP

<sup>a</sup> La definición completa de cada motivo se detalla en el apartado 5.7. de Resultados.

<sup>b</sup> Se ha seguido la nomenclatura I.U.B. en las abreviaturas de los aminoácidos. Entre [ ] se indican los aminoácidos permitidos en esa posición, y entre { } los prohibidos. El subíndice entre paréntesis indica el número de residuos de aminoácidos posibles.

<sup>c</sup> La secuencia detectada por responder al motivo aparece en negrilla, y se muestran los cinco residuos de aminoácidos anteriores y posteriores. El número indica la posición, en la secuencia del pOTC de rata, del primer residuo de aminoácido que está en negrilla.

- Asn-Glicosilación: indica un sitio potencial de N-glicosilación. No obstante, la presencia de la secuencia consenso no es concluyente para determinar que el residuo de asparragina esté glicosilado *in vivo*, puesto que el plegado de la proteína juega un papel importante en la regulación de la N-glicosilación y, además, la presencia de residuos de prolina la inhibe (185).
- cAMP-fosforilación: indica sitios preferenciales de fosforilación por Proteína Kinasas dependientes de cAMP o cGMP, aunque es importante destacar que hay bastantes excepciones a esta regla.
- Carbamiltransferasa: identifica una región que incluye a los residuos de aminoácidos implicados en el enlace del grupo fosforilo del carbamil fosfato. La secuencia consenso no tiene excepciones, y permite distinguir entre Aspartato y Ornitina Transcarbamilasas (E y K, respectivamente, en la posición 3).
- CK-2-fosforilación: representa las secuencias de fosforilación por la Caseína Kinasa II (CK-2), de residuos de serina o de treonina. Residuos ácidos adicionales en las posiciones +1, +2, +4 y +5 incrementan la velocidad de fosforilación.
- PKC-fosforilación: indica la preferencia *in vivo* de la Proteína Kinasa C (PKC). La presencia de residuos de aminoácidos básicos en los extremos amino- o carboxiterminal del residuo que es fosforilado (S/T) aumenta la velocidad de la reacción.

De los datos presentados en la Tabla 25, cabe resaltar que la zona que comprende a los residuos de aminoácidos entre las posiciones 86 a la 93, que corresponde a los residuos implicados en el enlace del grupo fosforilo del carbamil fosfato, aparece como una región susceptible de fosforilación. Además, en todas las OTC de mamíferos, se repite el motivo GKS entre los residuos 79 y 81, es decir, en una zona muy próxima a los residuos implicados en la unión del carbamil fosfato. Dicha secuencia, podría constituir el núcleo de lo que se conoce como bucle de unión de fosfato (P-loop), que es un motivo que está presente en muchas, aunque no en todas, las proteínas que unen nucleótidos de adenina y guanina, y que aparece en la literatura y responde, en general, a la secuencia consenso: GXXXXGK[TS], aunque dicha secuencia consenso se ha perfeccionado al subdividirse en otras siete que detectan igual número de familias proteicas (565). En todos los casos de proteínas que responden al motivo P-loop, se conserva el residuo de lisina que, además, parece tener un papel estructural y/o funcional (529, 565). Sin embargo, hay que volver a insistir en que, a pesar de que se puedan identificar o diagnosticar motivos relacionados con una

determinada estructura o función, su presencia sólo puede interpretarse correctamente a partir de datos bioquímicos, sin los cuales no se pueden obtener conclusiones definitivas.

Como ya vimos en la Introducción, las características globales de las proteínas (tamaño, carga, hidrofobicidad, etc.) se han intentado correlacionar con sus vidas medias, con resultados cuanto menos contradictorios. Las relaciones establecidas entre estos dos parámetros, se han basado en las determinaciones de vidas medias llevadas a cabo mediante procedimientos de marcaje radiactivo, principalmente a través del método del doble isótopo. Mayor interés han despertado últimamente las correlaciones establecidas entre la composición o secuencia de aminoácidos de una proteína y su velocidad de degradación. Las tres principales hipótesis que se han formulado (las regiones PEST, el aminoácido N-terminal y las secuencias KFERQ), ya se expusieron con detalle en la Introducción. En esta parte del trabajo, se ha intentado establecer si alguna de estas características afectan o presentan alguna relación con las  $t_{1/2}$  de un grupo específico de proteínas celulares: las proteínas mitocondriales.

Actualmente, se conocen las secuencias de aminoácidos de unas 27.000 proteínas. De entre ellas, y mediante el uso de los programas de los siguientes paquetes informáticos de manejo de secuencias de DNA y proteína: DNASIS, PROSIS, PC/GENE y GCG (130), junto con las correspondientes bases de datos asociadas a estos programas: EMBL, GENE BANK, NBRF-PIR y SWISS-PROT, hemos podido determinar que, aproximadamente, unas 1.200 corresponden a proteínas mitocondriales. Con objeto de reducir el número de secuencias a manejar, nos hemos centrado en aquellas que corresponden a proteínas de animales superiores mamíferos, lo cual, además de simplificar los cálculos, uniformiza aún más el conjunto sometido a estudio. No obstante, también se ha incluido en el análisis a la Hexokinasa, puesto que, a pesar de no ser una enzima mitocondrial, se ha descrito que está enlazada de forma reversible, al menos en cerebro, a la membrana externa mitocondrial (576), a través de una secuencia N-terminal hidrofóbica que se inserta en dicha membrana (694).

Los resultados que se han obtenido aparecen en la Tabla 26, cuya construcción se ha realizado de la forma que se expone a continuación. En primer lugar, los valores correspondientes a las vidas medias de las proteínas estudiadas tan sólo se han agrupado por intervalos y no por valores puntuales, pues en la mayoría de los casos se han determinado en organismos o sistemas celulares distintos de aquellos para los que se conoce la secuencia de la proteína en cuestión. Desafortunadamente, se conocen muy pocos valores de vidas medias de proteínas mitocondriales, aunque para la gran mayoría de los datos disponibles se ha podido encontrar la correspondiente secuencia proteica. En relación con éstas, se ha preferido incluir en el análisis las distintas secuencias de una misma proteína en diversos organismos, pues así se muestran mucho mejor las

**TABLA 26.- DETECCION DE PARAMETROS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES QUE PUEDEN INFLUIR SOBRE SU VELOCIDAD DE DEGRADACION.**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
> 200	Fumarasa	Hombre/hígado	A	RSGLGELILPENEPGSSIMPGK		316
		Rata/hígado	A	RSGLGELILPENEPGSSIMPGK		623
		Cerdo/corazón	A	RSGLGELILPENEPGSSIMPGK		563
> 200	Ornitina Transcarbamilasa	Hombre/hígado	N	RKPEEVDDEVFYSPR		247, 269
		Rata/hígado	S	RKPEEVDDEVFYSPR		631, 344
		Ratón/hígado	S	RKPEEVDDEVFYSPR		570, 657
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad α	Vaca/corazón	Q		QRELI	667
		Rata/hígado	Q		ELLKQ QRELI QKRFD ELLKQ	358
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad β del componente F <sub>1</sub>	Hombre/n.i.	T		QKVLD	483
		Vaca/corazón	Q		QKVLD	71
		Rata/hígado	A		QKVLD	184
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad β del componente F <sub>0</sub>	Rata/hígado	P			647
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad δ del componente F <sub>1</sub>	Vaca/músculo cardíaco	A		QIRIE	558
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad δ del componente F <sub>0</sub>	Vaca/n.e.	A (acetilado)			668
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad γ	Vaca/hígado	A			150
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad ε	Vaca/corazón	n.i.			660
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad sensible a oligomicina	Vaca/hígado y corazón	F		QILKE	666

TABLA 26: (continuación)

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, factor acoplador 6 (F <sub>0</sub> )	Hombre/músculo fetal	N			289
		Vaca/hígado	N			666
		Cerdo/intestino	N			86
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad 6	Hombre/placenta y células HeLa	N			15
		Vaca/corazón	N			14
		Ratón/células LA9	N			57
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad 8	Hombre/placenta y células HeLa	P			15
		Vaca/corazón	P			14
		Ratón/células LA9	P	KVSSQTFPLAPSPK		57
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad 9 P1	Hombre/hígado	D			162
		Vaca/corazón	D		RREFQ	186
41-200 <sup>b</sup>	ATPasa, subunidad 9 P2	Vaca/corazón	D			186
41-200	Carbamil Fosfato Sintetasa I	Rata/hígado	L	HPEVSPGPTDTEYLFDSFFSLIK		478
41-200	Citocromo B	Hombre/placenta y células HeLa	T			15
		Vaca/corazón	T			14
		Rata/n.e.	T			337
		Ratón/células LA9	T			57
41-200	Citocromo b <sub>5</sub> (fragmento)	Rata/hígado	D			357
41-200	Citocromo c	Hombre/n.e.	G (acetilado)			391
		Vaca/n.e.	G (acetilado)			614
		Conejo/n.e.	G (acetilado)			458
		Rata/testículos	G (acetilado)			661
		Ratón/testículos	G (acetilado)			661

TABLA 26: (continuación)

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad I	Hombre/placenta y células HeLa	F			15
		Vaca/corazón	F			14
		Rata/n.e.	F			181
		Ratón/células LA9	F			57
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad II	Hombre/linfocitos	A			511
		Vaca/corazón	A			14
		Rata/hígado	A			75, 181
		Ratón/células LA9	A			57
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad III	Hombre/placenta y células HeLa	T			15
		Vaca/corazón	T	HSSLAPTPELGGCWPTGIH		14
		Rata/n.e.	T			181
		Ratón/células LA9	T			57
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad IV	Hombre/hígado	A			372
		Vaca/hígado	A			705
		Rata/hígado	A			696
		Ratón/corazón	A			
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad Va	Hombre/músculo fetal y células endoteliales	S	RPTLNELGISTPEELGLDK	527	538
		Vaca/corazón	S	RPTLNELGISTPEELGLDK		702
		Rata/corazón	S	RPTLNELGISTPEELGLDK		140
		Ratón/n.e.	S	RPTLNELGISTPEELGLDK		31
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad Vb	Hombre/músculo fetal	A	REDPNLVVPSISNKR		706
		Vaca/hígado	A	KEDPNLVVPSITNKR		706
		Rata/cerebro	A	KEDPNLVVPSISNKR		204
		Ratón/tumor médula ósea	A	KEDPNLVVPSISNKR		44
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIa	Hombre/hígado	S			157
		Vaca/corazón	A			410
		Rata/hígado	S			300

TABLA 26: (continuación)

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIb	Hombre/músculo esquelético	A			628
		Vaca/corazón	A (acetilado)			364
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIc	Hombre/fibroblastos	P			488
		Vaca/hígado	S			702
		Rata/hígado	G			621
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIIa	Hombre/hígado	F			158
		Vaca/hígado	F			587
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIIb	Vaca/corazón	I			366
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIIc	Hombre/músculo esquelético	S			335
		Vaca/hígado	S			22
		Ratón/corazón	S			6
41-200 <sup>b</sup>	Citocromo c Oxidasa, subunidad VIII	Hombre/hígado	I			537
		Vaca/hígado	I			365
		Vaca/corazón	I			365
41-200	Glicerol-3-fosfato Deshidrogenasa	Ratón/n.e.	n.i.		QLLKD	136
41-200	Malato Deshidrogenasa	Rata/corazón	A			211
		Ratón/hígado	A			629
		Cerdo/hígado	A			292
41-200	Monoamino Oxidasa A	Hombre/hígado	(V)		ERLVQ QERKF	33
		Vaca/n.i.	V		QERKF	510
		Rata/n.i.	n.i.		ERLVQ QERKF	350
41-200	Monoamino Oxidasa B	Hombre/hígado	(V)	KIPEDEIWQSEPEVDVPAQPITTTFLERRH	QERKF	286
		Rata/hígado	n.i.		QERKF	286

TABLA 26: (continuación)

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
41-200	Ornitina Aminotransferasa	Hombre/retinoblastoma	T			283
		Rata/hígado	Q			443
9-40	Glutamato Deshidrogenasa	Hombre/hígado	S		DFKLQ	399
		Vaca/hígado	A		DFKLQ	297
		Rata/hígado	S		DFKLQ	12
< 2	δ-Aminolevulinato Sintetasa	Hombre/hígado	D	HCSSTLPQ <sup>↓</sup> DQETPPASEK	RRDVQ	46
		Rata/hígado	Q	HPSPTSQSSGSK	RELLQ	699
		Ratón/hígado	D	HSFPSFOE <sup>↓</sup> EQTEGAVPH	QFFRD	579
s.d.	Acetil-CoA-Acetiltransferasa	Hombre/n.e.	V			177
s.d.	Acetoacetil-CoA Tiolasa	Rata/n.e.	A			176
s.d.	Acil-CoA Deshidrogenasa, específica de cadena larga	Rata/n.e.	G		QERLL	392
s.d.	Acil-CoA Deshidrogenasa, específica de cadena media	Hombre/hígado	K			310
		Rata/hígado	K			393
s.d.	Acil-CoA Deshidrogenasa, específica de cadena corta	Hombre/n.e.	L	HTIYQSVELPETH		454
		Rata/n.e.	L	HTVYQSVELPETH		392
s.d.	Aconitasa	Cerdo/corazón	R		QVLRD QRVDV	710
s.d.	Adenilato Kinasa 2A	Vaca/hígado	A			318
s.d.	Adenilato Kinasa 2B	Vaca/hígado	A			318
s.d.	ADP/ATP Translocasa T1	Vaca/varios	S (acetilado)			509
s.d.	ADP/ATP Translocasa T2	Vaca/varios	(T)			509

**TABLA 26: (continuación)**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	Adrenodoxina	Hombre/cortex adrenal Vaca/cortex adrenal	S S			497 564
s.d.	Adrenodoxina Oxidoreductasa	Vaca/cortex adrenal	S		QELRV QDRIR	474
s.d.	Aldehido Deshidrogenasa	Vaca/n.e. Rata/hígado Caballo/n.e.	S S A,S,L			163 163 293
s.d.	Aldehido Deshidrogenasa I	Hombre/músculo fetal	I	RKTFPTVNPSTGEVI		70
s.d.	Aldehido Deshidrogenasa II	Hombre/n.e.	S			276
s.d.	Aspartato Aminotransferasa	Hombre/n.e. Caballo/n.e.	S S		DLRKQ QVERL	389 137
s.d.		Rata/hígado	S		DLRKQ QVERL	394
s.d.		Ratón/hígado	S		DLRKQ QVERL	479
s.d.	Carnitina Palmitoiltransferasa II	Rata/hígado	s.d.			687
s.d.	α-Cetoácido Deshidrogenasa, subunidad E1	Hombre/hígado Rata/hígado	s.d. F			708 707
s.d.	α-Cetoácido Deshidrogenasa, subunidad E2	Hombre/hígado fetal Vaca/hígado	G G			355 214
s.d.	Citocromo bc1, proteína central II	Hombre/células GM637	S		QLKID	272
s.d.	Citocromo c1, hemoproteína	Hombre/leucocitos Vaca/corazón	S S			622 664
s.d.	Citocromo c1, subunidad de 7 kDa.	Vaca/n.e.	V			569

**TABLA 26: (continuación)**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	Citocromo P450 (SCC)	Hombre/n.e.	I	REPTFFFDPENFDPTR	QRFID RVEIQ	435
		Vaca/cortex adrenal	I		QKFID QDLRR	434
		Rata/corpora lutea	I		QRFID QKRDF RIEVQ	487
s.d.	Citocromo P450 (11B)	Hombre/tumor adrenal	G		VEKLQ	304
		Vaca/cortex adrenal	G		QILRE* ILREQ*	433
		Rata/n.e.	G		VERLQ	473
s.d.	Citrato Sintetasa	Cerdo/n.e.	A			61
s.d.	Creatina Kinasa	Hombre/placenta	A		ERLIQ QDIRI	239
s.d.					Creatina Kinasa, isoenzima de músculo sarcomérico	Hombre/corazón
s.d.	Dihidrolipoamida Acetiltransferasa	Hombre/hígado	S	KPQVPPPTPPPVAAVPPTPQ <sup>2</sup> LAPTSTPCPATPAGPK KPQAPPPVPPPVAAVPIPIQLAPTSAAPAGPK		
		Rata/hígado	n.i.		189	
s.d.	Dihidrolipoamida Deshidrogenasa	Hombre/hígado	A			489, 503
		Cerdo/médula adrenal	A			489
s.d.	Enzima málico dependiente de NAD(P) <sup>+</sup>	Hombre/fibrosarcoma HS913T	s.d.			371
s.d.	Enoil-CoA Hidratasa	Rata/hígado	G			414
s.d.	Esterol 27-Hidroxilasa	Hombre/hígado	A	RDPTAFSEPESEFQPHR		79
s.d.	Esterol 26-Hidroxilasa	Rata/hígado	A	RDPSVFPEPESEFQPHR	VRLDQ	649
		Conejo/hígado	A	RDPSVFPEPESEFQPHR		16

**TABLA 26: (continuación)**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	Glutatión Peroxidasa	Hombre/n.i. Rata/n.i. Ratón/n.i.	n.i. n.i. n.i.	REALPAPSDATALMTDPK RNALPAPSDPTALMTDPK RNALPTPSDDPTALMTDPK		620 261, 703 83
s.d.	GTP/AMP Fosfotransferasa	Vaca/corazón	G			641, 697
s.d.	3-Hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa	Cerdo/músculo cardíaco	S, A			60
s.d.	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA Sintetasa	Rata/hígado	T			32
s.d.	Inhibidor mitocondrial de la ATPasa	Vaca/corazón e hígado	G		IERLQ	60
s.d.	Isovaleril-CoA Deshidrogenasa	Rata/hígado	H			392
s.d.	Lipoamida Aciltransferasa	Vaca/hígado	G	KDSEEDVVETPAVSH		214
s.d.	L-Metilmalonil-CoA Mutasa	Hombre/hígado	L		LEKKQ	288
s.d.	NADH Deshidrogenasa, subunidad 1	Rata/hígado	n.i.			180
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 1	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	P F			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 2	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	I N			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 3	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	N N			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 4	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	L L			15 14

TABLA 26: (continuación)

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 4L	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	P S			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 5	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	T N			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, cadena 6	Hombre/placenta y células HeLa Vaca/corazón	s.d. s.d.			15 14
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, subunidad de 75 kDa.	Vaca/corazón	T			557
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, subunidad de 49 kDa.	Vaca/corazón	s.d.			165
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, subunidad de 24 kDa.	Hombre/células T Vaca/hígado Rata/n.e.	G G G	HRDTPENNPDT <u>PF</u> DFTPENYKR HRDTPENNPET <u>PF</u> DFTPENYKR HRDTPENNPDT <u>PF</u> DFTPENYKR		500 500 472
s.d.	NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, subunidad de 23 kDa.	Vaca/corazón	T			145
s.d.	NAD(P) <sup>+</sup> Transhidrogenasa	Vaca/retina	S		KEIFQ	698
s.d.	3-Oxoacil-CoA Tiolasa	Rata/hígado	A			23
s.d.	Piruvato Deshidrogenasa E1, subunidad α, versión 1	Hombre/células HeLa	F	HRLEEGPPVTTVLTR STPQTISSQPTGLTALLSPGAFPSEK		336
s.d.	Piruvato Deshidrogenasa E1, subunidad α, versión 2	Hombre/hepatoma	F			126

**TABLA 26: (continuación)**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	Piruvato Deshidrogenasa E1, subunidad β	Hombre/células HeLa	V		KIERQ QVKDI	336
s.d.	Propionil-CoA Carboxilasa, subunidad α	Hombre/fibroblastos Rata/hígado	G L		QKVVE QKVVE	353 76
s.d.	Propionil-CoA Carboxilasa, subunidad β	Rata/hígado	Q, I, N		QRRID	343
s.d.	Proteasa general de procesamiento de la matriz mitocondrial	Rata/hígado	S	HRRF <sup>h</sup> SSGATYPNIPLSSPLPGVPK RPDPEPLLTEMIH		322
s.d.	Proteína desacopladora del tejido marrón adiposo	Rata/marrón adiposo Ratón/marrón adiposo Conejo/marrón adiposo	V V V	QEFTSGEETPSLGSK	QLKKE QLKKE	69 340 40
s.d.	Proteína P1 (hsp60)	Hombre/células HL-60  Rata/varios  Hamster/n.e.	A  A A		ELKKQ QIEKR* EKRIQ* ELKKQ EKRIQ EKILQ ELKKQ QIEKR* EKRIQ* EKILQ	601  530  498
s.d.	Proteína transportadora de fosfato	Vaca/corazón Rata/hígado	A A	RSDPAGPPGPPRR RPPPEMPESLKKK RPPPEMPESLKKK		559 168
s.d.	Proteolípido mitocondrial de 6,8 kDa.	Vaca/corazón	(M)			637
s.d.	Selenoproteína de la cápsula mitocondrial	Ratón/esperma	n.i.	KPCPCPPPCPCPCPATCPCPLK		321
s.d.	Serina Hidroximetiltransferasa	Conejo/hígado	n.i.			42

**TABLA 26: (continuación)**

VIDA MEDIA <sup>a</sup> t <sub>1/2</sub> (horas)	PROTEINA	PROCEDENCIA (Organismo/tejido)	AMINOACIDO N-TERMINAL <sup>c</sup>	POSIBLES SECUENCIAS PEST <sup>d</sup>	SECUENCIAS KFERQ <sup>e</sup>	REF.
s.d.	Serina-piruvato Aminotransferasa	Rata/hígado	G	RLPTITTTVTPAGYNWR		480
s.d.	Succinato:ubiquinona oxidoreductasa, subunidad Fe-S (lp)	Hombre/hígado	A			319
s.d.	Succinil-CoA Sintetasa, subunidad α	Rata/hígado	G			255
s.d.	Superóxido Dismutasa (Mn)	Hombre/linfocitos T	K			50
s.d.	Ubiquinol-Citocromo c Reductasa, subunidad de 11 kDa.	Hombre/fibroblastos	G	<u>KMLTESEDPEEEEEEEELVDPLTTVR</u>		484
s.d.	Ubiquinol-Citocromo c Reductasa, subunidad de 14 kDa.	Hombre/células GM637	A			624
		Vaca/n.i.	A (acetilado)			665
s.d.	Ubiquinol-Citocromo c Reductasa, subunidad Fe-S Rieske	Vaca/corazón	S			648
		Rata/hígado	S			471
s.d.	Hexokinasa	Hombre/riñón	I		QLFEK	470
		Rata/cerebro	I		QLFEK	580
		Ratón/hepatoma c37	n.i.		QLFEK	26
					QRFEK	

<sup>a</sup> Abreviaturas: s.d. sin determinar; n.i. no indicado; n.e. no encontrado.

<sup>b</sup> Valor de vida media correspondiente a la proteína multimérica activa.

<sup>c</sup> Los residuos de aminoácidos N-terminales que aparecen entre paréntesis no se han confirmado experimentalmente. Cuando se han descrito varios residuos N-terminales para una misma secuencia, se citan todos.

<sup>d</sup> Los residuos de aminoácidos correspondientes a sitios potenciales de fosforilación aparecen subrayados. Cuando dos de estos sitios potenciales de fosforilación se superponen, los residuos de aminoácidos comunes se presentan con doble subrayado. El símbolo ↓ indica el lugar de corte de la secuencia señal del precursor de la proteína en cuestión, y aparece en los casos en que la posible secuencia PEST comprende parte de dicha región.

<sup>e</sup> Cuando aparecen dos secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ marcadas con un asterisco, indica que ambas secuencias se superponen.

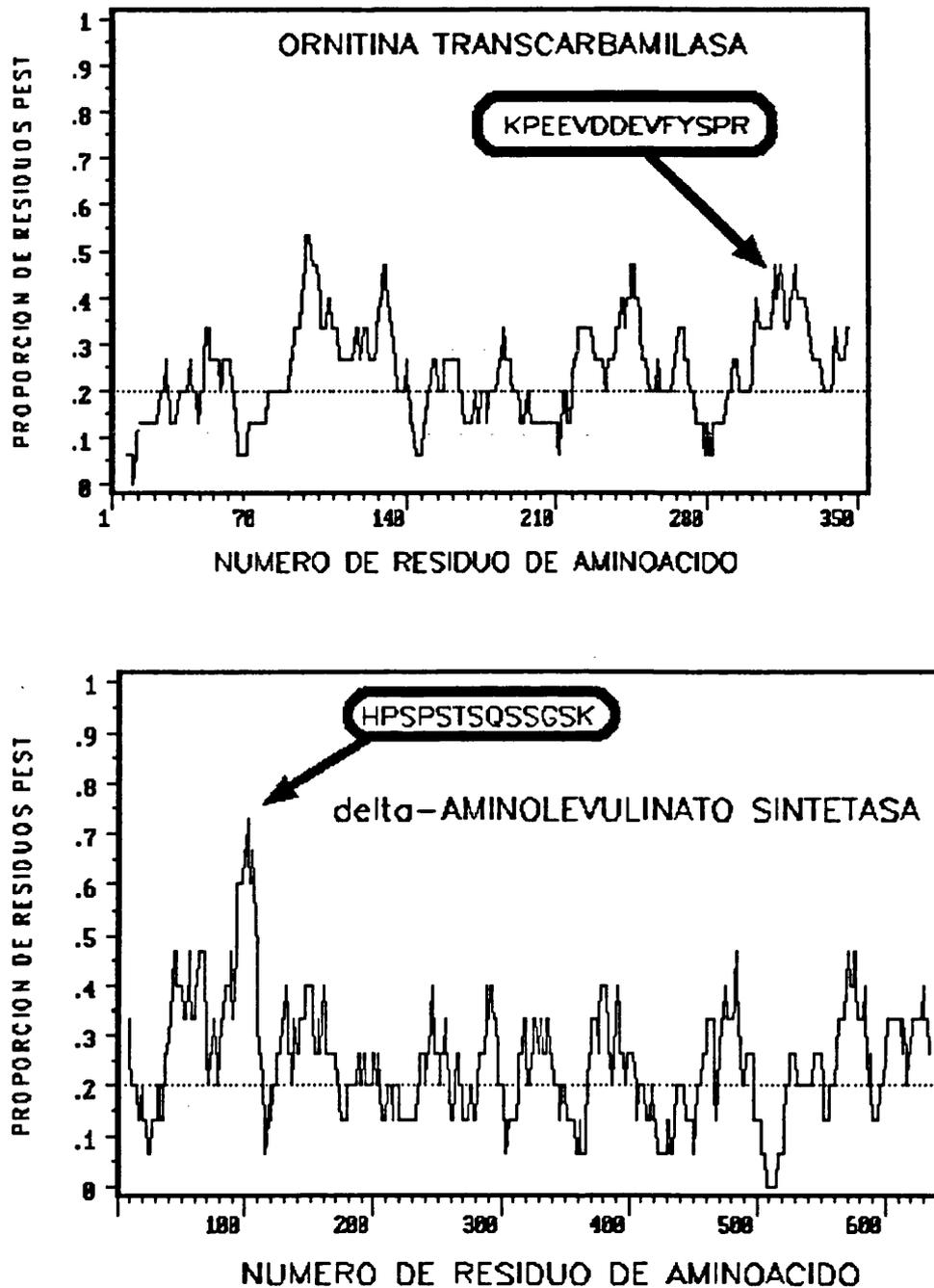
contradicciones que parecen presentar las diversas hipótesis, al menos en relación con el caso que nos ocupa, las proteínas mitocondriales.

El aminoácido N-terminal de cada proteína, cuando se conocía, corresponde al de la proteína madura, tal y como se ha descrito en las referencias correspondientes a las secuencias, y que también aparecen en la Tabla 26. Sin embargo, para el análisis de la presencia de secuencias KFERQ y de las regiones PEST, se ha utilizado, siempre que se ha podido, la información correspondiente a todo el polipéptido que es traducido, es decir, se ha incluido la secuencia del péptido señal en aquellos casos en los que la proteína se sintetiza en forma de un precursor de mayor tamaño, que luego es procesado durante su transporte a la mitocondria. En cuanto a la detección de las secuencias KFERQ, se han utilizado diversos subprogramas de los paquetes informáticos citados al comienzo de este apartado. De entre todas las secuencias de proteínas conocidas, el pentapéptido completo KFERQ no solamente se presenta en el caso de la Ribonucleasa A, como se describió originalmente por Dice et al. (36, 37, 87, 131, 132, 401), sino que ha variado esta situación con la inclusión de nuevas secuencias desde entonces hasta Agosto de 1991, que es la última fecha de actualización de las bases de datos de secuencias de proteínas que hemos manejado. Así, la secuencia KFERQ también se presenta en el antígeno JY8 humano del complejo de histocompatibilidad principal de clase I (144) y en la Proteína Kinasa 1 de *Schizosaccharomyces pombe* (361).

No obstante, ya vimos en la Introducción que el parámetro importante, en el caso de las secuencias KFERQ, puede ser una composición similar en aminoácidos, en lugar de la secuencia completa. Cuando se analiza el total de las secuencias de la base de datos, permitiendo que se puedan producir " fallos " en uno o dos aminoácidos del pentapéptido KFERQ, ya aparecen unas 100 secuencias con un aminoácido que no coincide, unas 3.000 con " fallo " en dos aminoácidos, y esto para cada una de las dos orientaciones posibles de la secuencia KFERQ. Es de destacar que, entre las proteínas que presentan estas secuencias, se encuentran algunas paradojas. Por ejemplo, entre las secuencias con tan sólo un " fallo ", aparecen proteínas de virus y de bacteriófagos, de *E. coli* (¡ como recA !), *Bacillus* y de *Vibrio*, microorganismos todos ellos carentes de lisosomas. Además, encontramos dentro de este grupo a la Catepsina D humana, lo que implicaría un curioso mecanismo de degradación para esta proteína. También se encuentran algunas proteínas mitocondriales como la Aspartato Aminotransferasa y el Citocromo C. En cualquier caso, para la construcción de la Tabla 26 se han utilizado los dos motivos peptídicos siguientes: péptidos de cinco residuos de aminoácidos y consistentes en un residuo de glutamina flanqueado, a derecha o a izquierda, por cuatro residuos, de los cuales sólo uno podía ser básico (K,R), residuos ácidos (D,E) podían existir un mínimo de uno y un máximo de dos, y residuos hidrofóbicos (F,I,V,L) uno como mínimo o dos como máximo, pudiendo ser cualquiera el orden de dichos residuos.

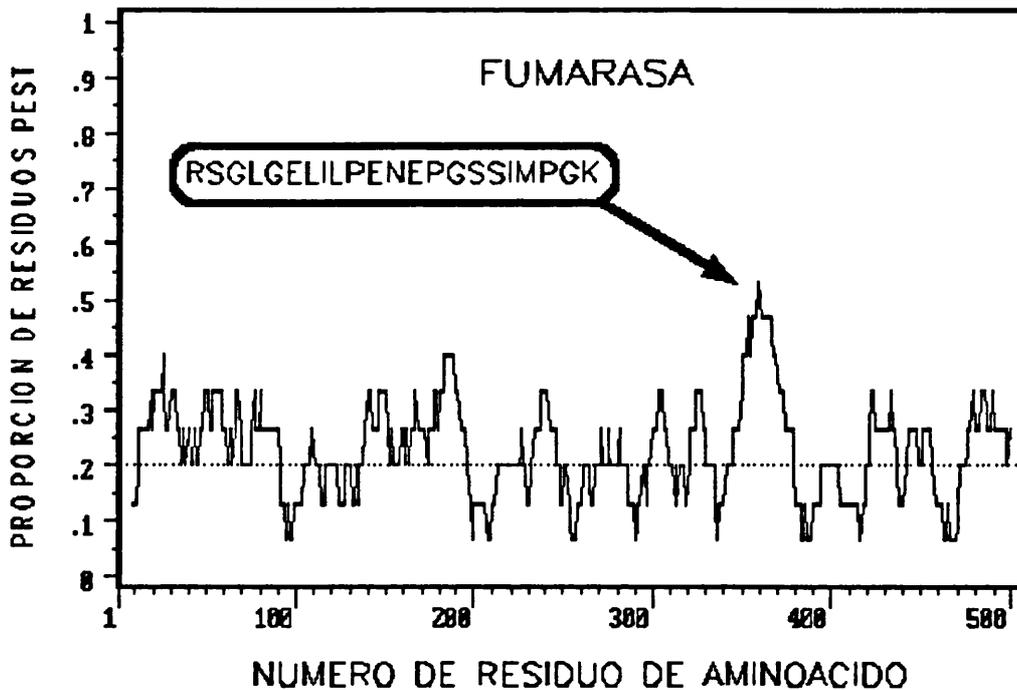
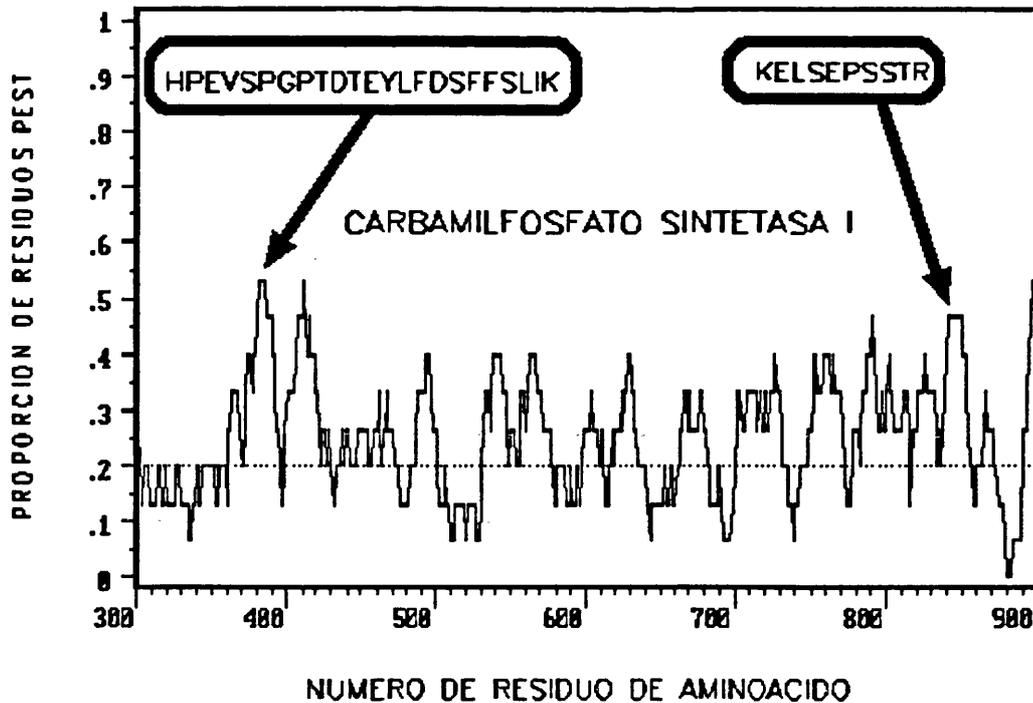
En relación con el análisis conducente a detectar la presencia de regiones PEST, y dado que no se disponía del algoritmo matemático ni del programa informático originalmente utilizados por Rogers et al (546), se ha seguido la siguiente aproximación. En primer lugar, la detección de regiones ricas en prolina, serina, treonina y ácido glutámico, se ha llevado a cabo mediante el subprograma PRESIDUE de PC/GENE, que es capaz de determinar la "concentración local" de determinados residuos de aminoácidos (P, E, S y T, en este caso) a lo largo de la secuencia de una proteína. Los resultados del análisis se presentan en una gráfica donde aparece el porcentaje de los residuos elegidos para un intervalo fijado previamente (y que en nuestro caso fue de 15 residuos) en función de la secuencia de la proteína. Por tanto, las posibles regiones PEST aparecerán como picos en este tipo de representación (ver Figs. 26 A y 26 B). A continuación las zonas detectadas por el subprograma se analizaron manualmente, comprobando que la longitud de las mismas era, como mínimo, superior a 10 residuos, que no se encontraban interrumpidas por residuos internos de lisina, arginina o histidina, y que alguno de estos aminoácidos se encontraban presentes, por lo menos, en uno de los extremos de la posible región PEST. Después, el tercer criterio de selección fue realizar un análisis de la distribución de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos a lo largo de la secuencia de las regiones candidatas. Se seleccionaron aquellas que presentaban un pronunciado valle hidrofílico seguido o precedido por un agudo pico hidrofóbico. Finalmente, y como comprobación de que este procedimiento de detección de regiones PEST es correcto, está el hecho de que ha sido capaz de detectar las mismas regiones que Rogers et al describieron en su artículo original para el Citocromo c y la Ornitina Descarboxilasa (incluida como control positivo, aunque no presentada en la Tabla 26 al no ser una proteína mitocondrial), y no detectando, al igual que los anteriores autores, ninguna posible región PEST para la RNAsa A (también incluida en el análisis como control interno negativo).

Del análisis de los datos de la Tabla 26, se puede observar un cierto número de contradicciones que resultan al intentar aplicar a las proteínas mitocondriales las diversas reglas que relacionan parámetros estructurales con velocidad de degradación. Así, la OTC humana presenta un residuo de aminoácido N-terminal clasificado como desestabilizador por esta teoría, mientras que posee la vida media más larga descrita para una proteína mitocondrial (aunque determinada en un sistema biológico distinto, la rata, cuya enzima sí que tiene un aminoácido N-terminal estabilizador). Por otra parte, esta circunstancia tampoco es de extrañar, pues ya vimos (Tabla 23) que el sistema proteolítico de los eritrocitos dependiente de ubiquitina (que es el que se postula como responsable de llevar a cabo la degradación de proteínas de acuerdo con la regla del aminoácido N-terminal), no tiene efecto alguno sobre la OTC. Sin embargo, no es la OTC el único caso en que una misma proteína presenta, según su procedencia, residuos de aminoácidos estabilizadores o desestabilizadores, lo que implicaría velocidades, y tal vez mecanismos, de degradación distintas para una determinada proteína según el organismo en estudio.



**FIGURA 26A.- DETECCIÓN DE REGIONES RICAS EN PROLINA, SERINA, TREONINA Y ACIDO GLUTAMICO EN LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA Y LA  $\delta$ -AMINOLEVULINATO SINTETASA PROCEDENTES DE HIGADO DE RATA.**

Se ha utilizado el subprograma PRESIDUE del paquete informático PC/Gene. Las gráficas muestran el porcentaje de residuos de los aminoácidos P,E, S y T, para un intervalo de 15 residuos, en función de las secuencias de las proteínas.



**FIGURA 26B.- DETECCIÓN DE REGIONES RICAS EN PROLINA, SERINA, TREONINA Y ACIDO GLUTAMICO EN LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA CARBAMIL FOSFATO SINTETASA I Y LA FUMARASA PROCEDENTES DE HIGADO DE RATA.**

Se ha utilizado el subprograma PRESIDUE del paquete informático PC/Gene. Las gráficas muestran el porcentaje de residuos de los aminoácidos P, E, S y T, para un intervalo de 15 residuos, en función de las secuencias de las proteínas. En el caso de la CPS I, sólo se presenta la región comprendida entre los residuos 300 a 900, y de las dos posibles secuencias PEST detectadas sólo una cumple con el tamaño mínimo requerido.

En el caso de proteínas oligoméricas con múltiples y distintas subunidades, como pueden ser la ATPasa o la Citocromo c Oxidasa, nos encontramos con que, en una misma enzima, hay subunidades con residuos de aminoácidos N-terminales estabilizadores y desestabilizadores al mismo tiempo. Si bien es cierto que el valor medido de  $t_{1/2}$  corresponde, en ambos casos, con el promedio resultante de la velocidad de degradación de cada una de las subunidades, la hipótesis de que cada subunidad se degradase con arreglo al residuo de su aminoácido N-terminal, nos llevaría a plantear mecanismos de recambio de compleja concepción.

Algo análogo sucede con la presencia de posibles secuencias PEST, que aparecen tanto en proteínas mitocondriales de recambio muy rápido, como la  $\delta$ -Aminolevulinato Sintetasa, o muy lento, caso de la Fumarasa. No obstante, hay que tener en cuenta que estas secuencias PEST detectadas son sólo probables o posibles, y la mayor parte de ellas corresponden a proteínas de las que se desconoce su  $t_{1/2}$  y/o mecanismo de degradación, por lo que su funcionalidad o el significado de su presencia en enzimas mitocondriales no se puede llegar a establecer todavía con claridad. Así, por ejemplo, el final de la secuencia PEST detectada en la OTC (Tabla 26) coincide con un lugar potencial de fosforilación de la Proteína Kinasa C (Tabla 25), pudiéndose especular que las secuencias PEST fosforiladas podrían generar sitios de unión de iones calcio que activarían proteasas  $Ca^{2+}$ -dependientes, como las Calpains, de localización citosólica y donde no sería conveniente para la célula que existiese actividad de OTC. En el caso de la CPS I, también la posible secuencia PEST detectada presenta algunas coincidencias notables. Así, los tres primeros aminoácidos (HPE) coinciden con el final de una de las zonas que están (incluyendo dichos residuos) totalmente conservadas en todas las Carbamil Fosfato Sintetasas para las que se conoce su estructura primaria (599). Además, los residuos de histidina y ácido glutámico forman parte del centro activo del dominio correspondiente a la actividad glutamina amidotrasferasa del tipo trpG (11). Por otra parte, el resto de la posible secuencia PEST comprende una zona bastante conservada entre todas las Carbamil Fosfato Sintetasas I conocidas, y marca el final del dominio correspondiente a la actividad glutaminasa (599).

Sobre las secuencias KFERQ, son muchos los pentapéptidos relacionados con aquella que se han encontrado. Sin embargo, también en este caso se desconoce si estos motivos peptídicos, o cuáles de entre ellos, son o no funcionales. Así, mientras que se conoce que bajo condiciones de privación de aminoácidos, o sea, en una situación de proteólisis acelerada (similar, por tanto, a la situación de privación de suero en cultivos celulares), gran parte de la proteólisis mitocondrial hepática transcurre por vía lisosomal, sin embargo, no se tienen datos individuales sobre las diversas enzimas mitocondriales. Tan sólo se puede destacar que, para proteínas multiméricas, se vuelve a dar el caso de que unas subunidades presentan secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ y otras no. Por otra parte, y desde un punto de vista evolutivo, parecen estar bastante

**TABLA 27: TIPOS DE SECUENCIAS RELACIONADAS CON EL PENTAPEPTIDO KFERQ ENCONTRADAS EN LAS PROTEINAS MITOCONDRIALES.**

Motivos: (+, -, [], []) Q						Número de secuencias encontradas	Motivos: (+, +, -, []) Q						Número de secuencias encontradas
Q (+, -, [], [])							Q (+, +, -, [])						
1	[]	[]	+	-	Q	1	25	+	+	[]	-	Q	0
2	[]	[]	-	+	QQ	1	26	+	+	-	[]	Q	2
3	[]	+	[]	-	QQ	1	27	+	[]	+	-	Q	0
4	[]	-	[]	+	QQ	0	28	+	-	+	[]	Q	0
5	[]	+	-	[]	QQ	0	29	+	[]	-	+	Q	1
6	[]	-	+	[]	QQ	3	30	+	-	[]	+	Q	0
7	-	[]	+	[]	QQ	1	31	[]	+	-	+	Q	0
8	+	[]	-	[]	QQ	2	32	-	+	[]	+	Q	0
9	-	+	[]	[]	QQ	3	33	-	[]	+	+	Q	2
10	+	-	[]	[]	QQ	2	34	[]	-	+	+	Q	1
11	-	-	[]	[]	QQ	1	35	-	+	+	[]	Q	1
12	+	[]	[]	-	Q	0	36	[]	+	+	-	Q	0
13	Q	[]	[]	+	-	5	37	Q	+	+	[]	-	2
14	Q	[]	[]	-	+	1	38	Q	+	+	-	[]	1
15	Q	[]	+	[]	-	2	39	Q	+	[]	+	-	0
16	Q	[]	-	[]	+	0	40	Q	+	-	+	[]	0
17	Q	[]	+	-	[]	1	41	Q	+	[]	-	+	1
18	Q	[]	-	+	[]	1	42	Q	+	-	[]	+	0
19	Q	-	[]	+	[]	3	43	Q	[]	+	-	+	0
20	Q	+	[]	-	[]	1	44	Q	-	+	[]	+	1
21	Q	-	+	[]	[]	1	45	Q	-	[]	+	+	1
22	Q	+	-	[]	[]	1	46	Q	[]	-	+	+	1
23	Q	-	[]	[]	+	0	47	Q	[]	+	+	-	1
24	Q	+	[]	[]	-	5	48	Q	-	+	+	[]	1

Todos los pentapéptidos relacionados con la secuencia KFERQ detectados en las 214 proteínas mitocondriales que se han estudiado, y que se presentan en la Tabla 26, se han clasificado de acuerdo con las 48 combinaciones posibles que se obtienen con los motivos genéricos: Q (+, -, [], +/[]) y (+, -, [], +/[]) Q, donde los aminoácidos permitidos en cada posición se representan mediante los símbolos siguientes: + = K,R; - = D,E; [] = F,V,L,I

conservadas, pues cuando se presenta una o varias secuencias en una determinada proteína lo suelen hacer en los diversos organismos estudiados. Sin embargo, tal y como podemos ver en la Tabla 27, no parece existir, al menos en el conjunto de las enzimas mitocondriales estudiadas, ningún tipo de motivo relacionado con la secuencia KFERQ que se presente con una frecuencia mayor que el resto. En algunos casos, como el Citocromo P450 (11 $\beta$ ) de vaca y la proteína P1 humana o de hamster, se da la curiosa coincidencia de que en una misma proteína se detectan dos secuencias KFERQ "fusionadas", es decir, un motivo peptídico en cuyos dos extremos se sitúan residuos de glutamina y a partir de cualquiera de ellos, y en dirección hacia el otro, se lee una secuencia relacionada con el pentapéptido KFERQ. En resumen, los resultados presentados en la Tabla 26 constituyen una extensa recopilación de datos, cuyo verdadero significado y trascendencia deberán ser evaluados conforme se vaya profundizando en el conocimiento de los mecanismos de degradación de las proteínas mitocondriales.

## **6.- DISCUSSION**

### 6.1.- LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA MEDIANTE LA TECNICA DE LOS COMPLEJOS PROTEINA A-ORO COLOIDAL.

La primera aplicación del oro coloidal como marcador inmunocitoquímico en la microscopía electrónica de transmisión, fue descrita en 1971 por Faulk y Taylor (164), quienes marcaron suero completo que contenía anticuerpos contra *Salmonella*. Romano y Romano fueron los primeros en preparar un complejo de proteína A y oro coloidal en 1977 (548), que utilizaron junto con técnicas indirectas de localización de antígenos en material no incluido. Posteriormente, Roth et al. (552, 553) demostraron la utilidad de esta técnica para la localización de antígenos en secciones muy finas de tejido ya incluido, lo que ha provocado que la técnica de los complejos proteína A-oro coloidal haya ido ganando popularidad y sea, hoy en día, ampliamente utilizada para la localización tanto de antígenos de superficie como intracelulares.

El método se basa en la propiedad de la proteína A de unirse a la región Fc de las moléculas IgG de muchas especies animales. La unión es muy fuerte con muchas de las subclases de IgG humanas, de conejo, perro, cerdo y cobaya, menos fuerte con las de ternera, ratón y caballo y muy débil con las de oveja, cabra, rata y pollo. Esta consideración es muy importante y se debe de tener en cuenta a la hora de elegir la especie animal a partir de la cual vamos a obtener los anticuerpos. En nuestro caso, elegimos trabajar con IgG de conejo para las que la proteína A muestra una muy alta fuerza de enlace, siendo la constante de disociación del orden de  $2 \text{ a } 5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , que resulta ser similar a la afinidad del enlace que se observa en las reacciones antígeno-anticuerpo. La cinética del enlace es muy rápida, alcanzándose el equilibrio en menos de treinta minutos para un rango de temperaturas comprendido entre 4 y 37° C (354).

La capacidad de unión del anticuerpo al antígeno no se ve modificada e incluso se ha observado que, en algunos casos, aumenta. Sin embargo, resulta más importante - sobre todo teniendo en cuenta el protocolo experimental que se ha seguido en este trabajo - el hecho de que los complejos antígeno-anticuerpo de las IgG, presentan una mayor afinidad de enlace con la proteína A que las IgG por sí solas. Otra de las grandes ventajas de esta técnica, es la completa conservación de la actividad biológica de la proteína A una vez que se ha adsorbido sobre la superficie de las partículas de oro coloidal.

En inmunocitoquímica es obligado establecer criterios de compromiso en relación con la fijación e inclusión del tejido. Un fenómeno común en las técnicas de tinción sobre materiales ya incluidos es que la adecuada preservación de estructuras produce a menudo una drástica disminución de la antigenicidad, ya que los fijadores afectan a ambos parámetros de forma inversa.

Por tanto, los factores a considerar son: la estructura objeto del estudio debe permanecer intacta, el antígeno debe quedar inmovilizado en su interior, la antigenicidad no debe alterarse y el antígeno debe quedar accesible al anticuerpo.

Glutaraldehído y formaldehído son los dos fijadores más comúnmente empleados en biología. En general, el glutaraldehído, que es un fijador más fuerte, es más adecuado para la preservación de estructuras e inmovilización de antígenos, mientras que el formaldehído, al ser más débil, respeta mejor la antigenicidad y la accesibilidad del antígeno. En nuestro caso, los resultados obtenidos indican que la antigenicidad de las tres proteínas mitocondriales estudiadas resiste bien la fijación con glutaraldehído.

Otro parámetro importante en el éxito de un procedimiento inmunocitoquímico es la resina de inclusión. En nuestro caso, el uso del Lowicryl K4M (una resina acrílica e hidrofílica compuesta de hidroxipropil- e hidroxietilmetacrilatos entrelazados por glicoldimetacrilato) conserva muy bien la ultraestructura, produce una tinción inespecífica muy baja y aumenta el marcaje específico. Estas mejoras se deben, probablemente, a que la inclusión a bajas temperaturas (- 35° C) preserva mejor la conformación de las proteínas y, por tanto, su antigenicidad. Otras ventajas son su estabilidad al haz de electrones del microscopio y que no necesita una película de soporte sobre la rejilla, lo que facilita llevar a cabo el inmunomarcado sobre las dos caras de la sección al poder realizarlo sobre la propia rejilla.

La formación de los complejos proteína A-oro coloidal es dependiente del pH y como Geoghegan y Ackerman (188) han demostrado, el valor óptimo corresponde a un pH ligeramente más alcalino que el punto isoeléctrico de la proteína que va a ser adsorbida. Por tanto, en el caso de la proteína A, cuyo pI es 5,1 hemos formado el complejo a pH 5,6 y no a 6,9 como describía originalmente Roth (552).

Los controles son de enorme importancia en inmunocitoquímica, especialmente cuando se trata de localizar por primera vez un nuevo antígeno, como es en este caso la OTC. Además, una de las ventajas de las técnicas que efectúan la tinción sobre material ya incluido, estriba en que los diferentes tipos de controles se pueden realizar sobre secciones procedentes de un mismo bloque de tejido. Todos los controles que hemos llevado a cabo (ver sección 4.14.1. de Métodos) intentan determinar el grado de tinción inespecífica que origina falsos positivos. En todos los casos, esta inmunotinción de fondo es muy baja y se distribuye al azar sobre la superficie del hepatocito, de la misma forma que también se distribuye homogéneamente el marcaje específico para cada proteína sobre la población de mitocondrias.

El marcaje tiene lugar exclusivamente sobre la superficie de la sección y sólo los lugares antigénicos que quedan expuestos después del proceso de corte son los que se detectan. Esta es la razón por la que la intensidad de marcaje se debe de calcular en relación con el área de la superficie que ocupe la estructura celular marcada.

El tamaño de las partículas de oro tiene repercusiones sobre la cuantificación, pues afecta tanto a la sensibilidad como a la resolución de la técnica. Así, aunque una molécula de IgG sólo se une a una molécula de proteína A, ésta es capaz de unir dos moléculas de inmunoglobulina y el número de moléculas de proteína A adsorbidas sobre las partículas de oro varía con su tamaño. Así, por ejemplo, en la bibliografía se encuentran datos de que las partículas de 3 nm. adsorben una molécula de proteína A, las de 8nm. adsorben aproximadamente 10 moléculas de proteína A y las de 15 nm. adsorben alrededor de 60 moléculas de proteína A (552). Por tanto, el número de sitios antigénicos que corresponden a una marca, depende del tamaño de la partícula de oro que la origina y de lo agrupado que se encuentre el antígeno en el tejido. Además, como ya discutimos anteriormente, la densidad del marcaje también disminuye conforme aumenta el tamaño de las partículas de oro coloidal debido a los impedimentos estéricos y a las fuerzas de repulsión entre dichas partículas, junto con el hecho de que los complejos de menor tamaño de oro coloidal pueden llegar a penetrar en las irregularidades y huecos de la superficie de la sección ligeramente más, por lo que tienen acceso a más moléculas de antígeno.

Cuando se comparan las densidades de marcaje que producen los conjugados de inmunoglobulina-ferritina en relación con esta técnica, se observa que el número de partículas por unidad de área es muy superior en el caso de la ferritina, pese a ser un marcador de un tamaño de partícula relativamente elevado (12 nm.). Sin embargo, este hecho no se debe a que la ferritina sea un inmunomarcador más eficaz, sino a la diferencia que existe en el mecanismo de la reacción de marcaje. La molécula de inmunoglobulina que ha reconocido específicamente al antígeno, en un caso es capaz de unir más de un complejo IgG-ferritina, mientras que en el otro solo reacciona con una molécula del complejo proteína A-oro coloidal. Por tanto, el aumento en la densidad de marcaje con ferritina se debe más bien a una amplificación de la señal, antes que a una mayor eficacia en el marcaje.

En relación con los otros métodos inmunocitoquímicos que emplean enzimas como marcadores, esta técnica, debido a la naturaleza granular de las partículas de oro y a su alta densidad electrónica, permite una detección y cuantificación directa del grado de marcaje y logra un nivel de resolución que no puede alcanzarse con los flóculos amorfos que originan los productos de las reacciones de marcaje con enzimas como, por ejemplo, la peroxidasa.

Por tanto, vemos que el creciente interés por el uso del oro coloidal como marcador inmunocitoquímico en la microscopía electrónica está más que justificado. Sus ventajas se pueden resumir en los siguientes puntos: facilidad de preparación por diversos métodos y en diferentes tamaños de partículas, la adsorción de macromoléculas sobre su superficie respeta la actividad biológica de aquéllas, las técnicas que se derivan de su empleo en inmunocitoquímica resultan relativamente fáciles, rápidas y baratas de aplicar y dan lugar a adsorciones inespecíficas muy bajas, a un aumento de la resolución, una óptima delineación del detalle estructural, flexibilidad en experimentos de doble marcaje y gran versatilidad, pues se pueden marcar con oro coloidal no sólo la proteína A, sino también el antígeno o el mismo anticuerpo, bien policlonal o monoclonal. Además, como el oro es capaz de producir una fuerte emisión de electrones secundarios, resulta ser un marcador muy útil para microscopía electrónica de barrido. Al igual que las otras técnicas de marcaje inmunocitoquímico, una de sus principales limitaciones es que sólo detecta determinantes antigénicos, sin proporcionar información sobre su actividad biológica. Finalmente, se debe enfatizar que ningún método de localización será mejor que los reactivos inmunológicos utilizados y la preservación de tejido conseguida.

## **6.2.- NIVELES INTRACELULARES DE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES.**

La localización y cuantificación inmunocitoquímica de las proteínas mitocondriales, constituye una herramienta más en el estudio de los procesos de biosíntesis y degradación de dicho orgánulo. Sin embargo, como consecuencia de las dificultades técnicas de estos métodos, se encuentran en la bibliografía pocos trabajos relacionados con las enzimas mitocondriales. La técnica de los complejos proteína A-oro coloidal resulta más sencilla que otros métodos previos, puesto que sustituye el empleo de varias preparaciones de inmunoglobulinas por un único reactivo - el complejo proteína A-oro coloidal - que, además, se prepara rápida y fácilmente sin ninguna purificación especial.

Este procedimiento permite una clara detección y una precisa cuantificación del marcaje, debido a su alta densidad electrónica y a que su pequeño tamaño permite una clara identificación de la estructura celular subyacente. La resolución lateral de la técnica, que en nuestro caso era de aproximadamente 31 nm. (el diámetro medio de una molécula de IgG es de 8 nm. + el tamaño de la molécula de proteína A es de unos 5 nm. + las partículas de oro coloidal empleadas que se encuentran alrededor de 18 nm.), permite localizar con exactitud la posición intracelular de los antígenos en estudio.

En este trabajo hemos aplicado esta técnica para la localización y cuantificación inmunocitoquímica de tres enzimas del hepatocito de rata, dos de las cuales son, además, enzimas específicas de las células del parénquima hepático.

En todos los libros de texto especializados y revisiones (99, 227, 618), estas tres enzimas se encuentran asignadas, en lo referente a su localización intracelular, a la matriz mitocondrial, todo ello de acuerdo con los resultados que se obtienen mediante los procedimientos bioquímicos de ruptura celular, fraccionamiento por centrifugación diferencial y análisis enzimático de los diferentes orgánulos y subfracciones de los mismos. Sin embargo, es un hecho bien conocido que durante tales manipulaciones una proteína puede escapar de su localización celular y quedar adsorbida a otras estructuras. Puesto que la distribución intracelular de una determinada enzima es una característica esencial, que es necesario conocer para determinar su función, es preciso disponer de métodos para su localización en la célula intacta. Actualmente, la visualización por medio del microscopio electrónico es, con mucho, la aproximación más directa a este problema.

El marcaje inmunocitoquímico de la OTC, CPS I y GDH, se ha localizado en la matriz mitocondrial del hepatocito en concordancia con todos los datos bioquímicos precedentes. En relación con la posibilidad, que otros autores han sugerido (512), de que la OTC pueda estar asociada, al menos parcialmente, con la membrana interna mitocondrial, como parece ser el caso de la GDH (330), no es posible sacar conclusiones en ningún sentido mediante nuestros resultados. La razón estriba en que, dada la resolución lateral del procedimiento empleado, el área del círculo de resolución que podríamos trazar alrededor de cada partícula de oro coloidal es lo suficientemente grande como para que estadísticamente tenga una alta probabilidad de intersectar la membrana interna mitocondrial, sin que ello signifique que esa era la verdadera localización intracelular del antígeno. Por tanto, para aclarar mediante un procedimiento inmunocitoquímico si realmente existe una cierta asociación de la OTC con la membrana interna mitocondrial, se tendría que recurrir a emplear un tamaño de partícula de oro coloidal más pequeño, así como marcar directamente con él los anticuerpos.

La densidad del marcaje en el conjunto de las mitocondrias de un mismo hepatocito o de varios próximos entre sí, presenta una distribución normal, indicando que existe una homogeneidad intracelular en la población de mitocondrias, bien procedentes de una misma célula o bien de las que se encuentran próximas entre sí en una misma zona del parénquima hepático, en lo que se refiere a la proporción relativa de sus enzimas determinada inmunocitoquímicamente. Sin embargo, estas tres proteínas presentan velocidades de recambio muy distintas y sólo una heterogeneidad mitocondrial a nivel molecular sería compatible con un mecanismo autofágico de degradación lisosómica como único responsable de la degradación de estas proteínas mitocondriales.

No obstante, por una parte, sólo hemos encontrado marcaje en las células del parénquima hepático, mientras que en las células no parenquimatosas estas tres enzimas parecen estar ausentes (resultados no presentados) y, por otro lado, estudios histoquímicos indican que la GDH - que presenta la vida media ( $t_{1/2}$  - 1 día) más corta de las tres enzimas estudiadas - tiene una localización preferencial en la zona perivenosa (299, 686), mientras que las otras dos enzimas implicadas en la biosíntesis de urea - y que tienen vidas medias muy próximas, tal y como se demuestra en este trabajo - se localizan preferentemente en la zona periportal del ácino hepático (178, 179, 248, 420). Estos datos, se han visto corroborados por recientes estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (331, 352, 651, 654, 655) y que muestran que, en hígado de rata, se pueden separar tres poblaciones de hepatocitos morfológica y funcionalmente distintas, lo que indica que la heterogeneidad mitocondrial se puede producir a nivel intercelular por una heterogeneidad hepática. Se ha encontrado que el nivel de GDH es mayor en los hepatocitos más ligeros (perivenosos), mientras que, por el contrario, los niveles de CPS I y OTC son mayores en los hepatocitos pesados. Además, el sistema autofágico-lisosomal está más desarrollado y es más activo en los hepatocitos ligeros, lo que se refleja en que la relación entre el contenido en GDH y los contenidos en OTC o CPS I es, aproximadamente, tres veces mayor en las vacuolas autofágicas que en las mitocondriales (651, 655).

Por tanto, esta heterogeneidad hepática permite explicar, al menos en parte, las diferencias en las velocidades de recambio de las proteínas mitocondriales del hígado de rata. Estos resultados tampoco excluyen la posibilidad de que existan otros mecanismos, lisosómicos y no lisosómicos, que regulen la degradación proteica en el hepatocito. De hecho, la evidencia aquí presentada de que la población intracelular de mitocondrias es homogénea, al menos en lo que se refiere al contenido de las tres enzimas mitocondriales estudiadas, OTC, CPS I y GDH, resalta de nuevo la importancia que deben de tener otros mecanismos, lisosómicos o no, pero distintos de la proteólisis incontrolada a través de la incorporación a vacuolas autofágicas, en la degradación de las proteínas mitocondriales.

### **6.3.- VELOCIDAD DE RECAMBIO DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA.**

Se ha establecido claramente que todas las proteínas intracelulares sufren un proceso de recambio y que presentan vidas medias que van desde unos minutos a varios días o semanas. Sin embargo, los valores reales de estas vidas medias son todavía objeto de gran controversia. Asimismo, no existe un modelo definitivo sobre la biosíntesis y degradación de las proteínas mitocondriales, como tampoco se ha establecido si las mitocondrias son degradadas como unidades completas o bien por procesos independientes que actúan sobre los diferentes componentes. La demostración de vidas medias similares para los mismos, sugeriría una degradación al unísono,

mientras que una evidencia sobre su heterogeneidad implicaría la existencia de procesos independientes.

Fletcher y Sanadi (171) encontraron que el Citocromo c y tres subfracciones mitocondriales hepáticas pobremente caracterizadas, tenían vidas medias muy parecidas. Beattie et al. (47) examinaron mitocondrias y cinco subfracciones de éstas, y encontraron vidas medias equivalentes para todas ellas en hígado, pero no así en riñón y cerebro. Análogamente, Gross et al. (231) observaron que el DNA mitocondrial y algunos fosfolípidos de la mitocondria tenían vidas medias iguales en el hígado, pero no en el corazón o cerebro. Todos estos estudios sugerían que, por lo menos en el hígado, las mitocondrias eran degradadas como un sólo conjunto, aunque los valores de vida media calculados para las mismas variaban de un estudio a otro.

En franco contraste con estos hallazgos, De Bernard et al. (117) y Satav et al. (566), partiendo de distintas aproximaciones, concluyeron que la membrana externa mitocondrial se recambiaba más rápidamente que la membrana interna y la matriz. Druyan et al. (141) y Aschenbrenner et al. (29) estudiaron el Citocromo b<sub>2</sub> de la membrana externa y los Citocromos b y c y el grupo hemo a de la membrana interna. Sus resultados indicaban que el componente de la membrana externa presentaba una vida media más corta que la de los otros, que además se recambiaban de forma sincrónica. Por otra parte, Lipsky y Pedersen (370) han demostrado que la vida media de las mitocondrias hepáticas es significativamente mayor que la del conjunto de proteínas hepáticas, y que dentro de la mitocondria, el conjunto membrana externa y espacio intermembranas presenta una vida media más corta que el conjunto formado por la membrana interna y la matriz.

También existen evidencias experimentales indirectas sobre la heterogeneidad de las vidas medias de las proteínas mitocondriales. Así, Swick et al. (626) y Glass y Doyle (195), utilizando dos procedimientos distintos, encontraron que al intentar determinar la constante de velocidad de degradación para la mitocondria en su conjunto, el valor que se obtenía dependía de la duración en el tiempo que tuviera el estudio, lo que teóricamente no puede ser el caso de un orgánulo con una única constante de velocidad.

Son muchas las razones que han provocado esta continuada falta de acuerdo entre los resultados de los trabajos anteriormente citados. En primer lugar tenemos que, aunque las bases del análisis de la relación entre precursor y producto en experimentos de marcaje se conocen desde nada más introducir el uso de los radionúclidos en la investigación biológica, no se han aplicado rigurosamente. La principal razón estriba en que la radiactividad específica del precursor directo de la síntesis proteica, el aminoacil-tRNA, es muy difícil de medir, dado que la cantidad de tRNA presente en el tejido es extremadamente pequeña. Por tanto, los procedimientos que normalmente

se emplean para el cálculo de las constantes de velocidad de degradación se basan en el análisis de las cinéticas de caída de la radiactividad específica. Existe, como ya hemos visto, una abrumadora evidencia experimental que ha demostrado que estas cinéticas son distorsionadas por la presencia de artefactos, sobre todo debidos a que los aminoácidos marcados que se emplean como precursores no desaparecen totalmente del acervo libre del tejido, sino que permanecen dentro del sistema durante largos períodos de tiempo, lo que da origen a una reutilización del precursor. Luego, esto se convierte en una sobrestimación de los valores de las vidas medias, desaparición del marcaje que no parece presentar una cinética de primer orden, la creación o desaparición de diferencias en las velocidades relativas de degradación de las distintas subfracciones o proteínas, etc. Todo ello ha conducido al desarrollo de una serie de aproximaciones ingeniosas, diseñadas exclusivamente para resolver estos problemas. No obstante, y hasta el momento, ninguna ha resuelto por completo los inconvenientes anteriormente citados y, a menudo, son sólo adecuadas para un sistema concreto.

Otro problema adicional viene dado por la rápida velocidad de recambio de las proteínas recién sintetizadas. Efectivamente, la degradación intracelular de una proteína transcurre mucho más deprisa inmediatamente después de su síntesis que en fases posteriores de su vida celular. Se ha postulado (229, 679, 680) que, muy probablemente, este fenómeno se deba, entre otras razones, al estado " metaestable " en que se encuentran las proteínas recién sintetizadas y que todavía no han podido ser estabilizadas por su integración en un orgánulo, interacción con substratos o cofactores, constitución de la proteína oligomérica, etc. Esta circunstancia conduce a una discontinuidad en las curvas de degradación que se obtienen mediante experimentos de marcaje radiactivo y da origen a un error en la determinación de la velocidad de recambio, puesto que la cinética aparente (que se aproxima a una de primer orden aunque no lo es realmente) es la resultante de otras dos cinéticas correspondientes a dos poblaciones de la misma proteína pero que son degradadas a velocidades distintas. Por tanto, se debe evaluar siempre la contribución de estas dos fases de la proteólisis al determinar cinéticas de degradación. En nuestro caso concreto, tal y como ya comentamos, dada la metodología seguida y la larga vida media encontrada para la OTC, se puede considerar que el error que se introduce en el cálculo de  $t_{1/2}$  por la diferente susceptibilidad proteolítica de la población total de moléculas de OTC, bien por los errores de la maquinaria sintética o antes y después de ser incorporada a la mitocondria, no alteraría prácticamente los resultados.

En este trabajo se ha utilizado una modificación de la técnica del doble marcaje de Arias et al. (25), y se han llevado a cabo los estudios durante diversos intervalos de tiempo para asegurar una adecuada discriminación entre las distintas subfracciones. Se obtienen buenas diferencias entre las constantes de velocidad de degradación de diversas proteínas, cuando el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración de los dos precursores es, por lo menos, de una vida media. Los datos relativos a la vida media de la mitocondria descritos en la bibliografía van desde 2,5 a 7

días, para precursores de poca reutilización. Por tanto, y con vistas a abarcar todo el intervalo, en este trabajo se han llevado a cabo las administraciones de precursores a 1, 3, 6 y 10 días.

No obstante, conviene recordar las condiciones de aplicación del método del doble isótopo, para una mejor comprensión de la validez de su aplicación y de los resultados obtenidos. En primer lugar, el sistema sometido a estudio debe encontrarse en estado estacionario durante todo el período que dure el experimento y las proteínas estudiadas deben de seguir una cinética de degradación de primer orden. En nuestro caso, el metabolismo hepático de las ratas utilizadas no debe de sufrir ningún cambio, pues siguen sometidas a la misma dieta y condiciones ambientales antes y durante los experimentos. Por otra parte, Zak et al. (704) han demostrado que, incluso bajo condiciones en las que el acervo proteico aumenta en un 20 % por día, el cambio en la relación entre los dos isótopos es pequeña. Así, de nuestros datos de la Tabla 10, vemos que la pérdida del marcaje para cada una de las fracciones sigue aproximadamente una cinética de primer orden.

En segundo lugar, el intervalo de tiempo elegido debe encontrarse entre una y tres veces la vida media del componente que se va a determinar. Esta circunstancia también se ha cumplido, puesto que el valor encontrado para la vida media de la OTC es inferior a diez días hasta los que se ha llegado a separar la administración de los precursores.

En tercer lugar, los isótopos no deben de ser metabolizados y transformados en otros productos susceptibles de incorporarse a las proteínas. En el caso de la leucina y de las proteínas del hígado de rata, esto ya ha sido demostrado por Arias et al. (25).

En cuarto lugar, el primer precursor se debe de administrar en forma de un " pulso " en relación con el intervalo de tiempo que transcurra hasta la segunda administración, y no debe de ser reutilizado. Como ya hemos discutido anteriormente, esta condición no se cumple estrictamente. Así, aunque la leucina presenta un máximo de incorporación entre 40 y 60 minutos después de su administración, permanece dentro del sistema en forma libre durante prácticamente toda la duración del experimento. Sin embargo, los datos de relación de incorporación de isótopos siguen siendo válidos si se dispone de valores de constantes de velocidad de degradación que no se vean afectados por esta reutilización.

Así, vemos en la Tabla 10 que el valor de la vida media de la OTC, medido como pérdida del marcaje con [<sup>14</sup>C] leucina es de 19 días, mientras que cuando se determina mediante las constantes de velocidad de degradación obtenidas con este mismo precursor, pero haciendo uso de la relación de incorporación de isótopos, el resultado se encuentra en el intervalo de 12 a 15 días. Este hecho refleja la corrección de la reutilización que se introduce al hacer uso del método del doble isótopo. En cualquier caso, los valores de vida media más fiables para la OTC son los que

utilizan las  $K_D$  calculadas con [ $^{14}\text{C}$ ] bicarbonato, que se encuentran en el intervalo de 3,7 a 3,9 días y que coinciden con los encontrados mediante el uso de este mismo precursor (370) para la mitocondria en su conjunto (3,8 días) y la membrana interna (3,8 días) o la matriz (3,9 días) por separado.

El resultado de  $t_{1/2}$  para la OTC al utilizar la  $K_D$  obtenidas con [ $^{14}\text{C}$ ] arginina, aunque está sujeto a una sobrestimación debido a la reutilización del mencionado precursor, también es útil puesto que permite establecer una base de comparación entre este valor y los correspondientes a las  $t_{1/2}$  de otras enzimas mitocondriales que se han calculado mediante el mismo procedimiento. Especial relevancia presentan los datos relativos a la CPS I y OTC, con vidas medias lo suficientemente próximas como para que las diferencias no sean significativas, sino achacables a la variabilidad del método, incluyendo dentro de este concepto la complejidad del sistema biológico empleado: una rata. Además, en estudios llevados a cabo con preparaciones hepáticas de *Rana catesbeiana*, se ha calculado que la vida media de la CPS I es de unos 3,5 días, y que se acorta a 2,3 días en presencia de tiroxina (591). En un sistema anfibio similar, se ha estimado que la  $t_{1/2}$  de la OTC es de unos 4 días (99). Cabe destacar pues, la gran proximidad entre los valores de  $t_{1/2}$  de la CPS I y de la OTC, tal y como aquí hemos demostrado aplicando el método del doble isótopo.

A partir de todos estos datos se puede obtener una cierta información sobre la degradación intracelular de las mitocondrias hepáticas. La desaparición del marcaje siguiendo cinéticas de primer orden en ausencia de una reutilización significativa y con administraciones en forma de pulso, y la gran similitud en las  $t_{1/2}$  encontradas, implican la existencia de una degradación al azar. A su vez, esto sugiere que o bien todas las mitocondrias son iguales o, si hay "mitocondrias jóvenes", éstas tienen la misma probabilidad de ser degradadas que las "mitocondrias viejas". Parece, por tanto, que la degradación de las mitocondrias no responde a criterios de tamaño o calidad, sino que pueda ser más bien función de sus posiciones en la célula, esto es, de su proximidad o lejanía con respecto a un lisosoma.

El valor de  $t_{1/2}$  que hemos obtenido para la OTC por el método del doble isótopo, corresponde a uno de los más largos descritos para una proteína mitocondrial de hígado de rata. Aunque se encuentra próximo al de la CPS I ( $t_{1/2} = 7,7$  días) que también es otra proteína de la matriz, difiere considerablemente de la GDH ( $t_{1/2} = 1$  día) que parece encontrarse parcialmente asociada a la membrana interna mitocondrial (294). Por tanto, estas diferencias aparentan estar en contradicción con nuestros resultados - tanto sobre la homogeneidad de la población intracelular de mitocondrias basada en procedimientos inmunocitoquímicos, como sobre la degradación al azar de dicha población según su cinética de recambio de primer orden - que apuntan a la vía autofágica de degradación lisosomal como la principal responsable de la destrucción de la mitocondria. Sin embargo, existen numerosas evidencias de que los hepatocitos presentan diferencias bioquímicas,

funcionales y morfológicas a lo largo del sinusoides hepático (178, 179, 233, 248, 298, 299, 331, 352, 420, 521, 651, 654, 655, 686). Así, el acino hepático, unidad microvascular del hígado, se ha dividido en tres zonas atendiendo a sus proximidades a los vasos portales: periportal o perilobular, intermedia y perivenosa o centrilobular, cuyas poblaciones celulares pueden ser separadas por centrifugación en gradientes de densidad (368, 651).

Estudios recientes procedentes de nuestro laboratorio, han demostrado variaciones en los contenidos de CPS I, OTC y GDH en tres poblaciones diferentes de hepatocitos y procedentes de las distintas zonas acinares del parénquima hepático (651, 655). Los resultados obtenidos indican que la GDH, la enzima de  $t_{1/2}$  más corta de entre las estudiadas, se encuentra en mayor cantidad en los hepatocitos ligeros, mientras que la CPS I y la OTC son más abundantes en los hepatocitos pesados. Estos datos concuerdan con otros trabajos que, mediante procedimientos inmunocitoquímicos y determinaciones microfotométricas de actividad enzimática, han demostrado un mayor contenido de GDH en los hepatocitos perivenosos (352, 686), mientras que la CPS I (178, 179, 248) y la OTC son más abundantes en los hepatocitos situados alrededor de los vasos periportales.

Esta heterogeneidad intercelular también se extiende a la actividad que presenta el sistema lisosomal, siendo ésta mayor en los hepatocitos ligeros que, además, presentan una mayor proporción de GDH, en relación a la CPS I y a la OTC, en vacuolas autofágicas respecto a su contenido en mitocondrias. Por tanto, las diferencias que se observan en la vidas medias de las proteínas mitocondriales pueden, al menos en parte, deberse a la heterogeneidad en las poblaciones de hepatocitos, y vienen a apoyar nuestras conclusiones sobre la degradación lisosómica por vía autofágica de las proteínas mitocondriales, según se desprende de sus velocidades de recambio.

#### **6.4.- SUSCEPTIBILIDAD DE LA OTC AL SISTEMA PROTEOLITICO LISOSOMAL.**

Durante las últimas décadas, se ha producido un notable avance en nuestro conocimiento de los procesos proteolíticos celulares, desde el procesado proteolítico de las cadenas nascentes de polipéptidos que acompaña a la síntesis proteica, hasta la proteólisis total que conduce a la degradación de una proteína en sus aminoácidos constituyentes. Además, se ha puesto de manifiesto que la proteólisis celular es un proceso altamente controlado y complejo que tiene lugar, prácticamente, en todos los compartimientos celulares. Sin embargo, todavía se sabe muy poco sobre los factores que inician y regulan los procesos proteolíticos, los substratos fisiológicos de muchas proteasas o qué proteasas están implicadas en funciones específicas, es decir, qué determina el tipo, el grado de participación y la regulación de los sistemas proteolíticos implicados en la degradación de las distintas clases de proteínas presentes en la amplia variedad de tipos celulares y

condiciones metabólicas existentes, y cuáles son las diferentes señales que marcan a las proteínas que van a ser degradadas.

Respecto a este último apartado, ya vimos en la Introducción que la heterogeneidad en las  $t_{1/2}$  de las diferentes proteínas celulares, indicaba que unas eran más susceptibles a la degradación que otras. Pues bien, estudios recientes (34, 131, 132, 526, 546) atribuyen un papel importante en la susceptibilidad *in vivo* del substrato que va a ser degradado, a las características estructurales de la proteína, en concreto a su estructura primaria. Así, la identidad del aminoácido amino-terminal y la presencia de secuencias específicas en el interior de la proteína (denominadas secuencias PEST) desempeñan un papel, aunque todavía por dilucidar totalmente, que podría ser el de determinar no sólo su velocidad de degradación, sino también el sistema proteolítico implicado. El hecho de que las estructuras proteicas anormales - es decir, polipéptidos que contienen análogos de aminoácidos - sean degradadas más rápidamente que las proteínas normales, también indica que la estructura de la proteína es determinante de la velocidad de degradación. Además, también vimos en la Introducción, que se ha demostrado la existencia de una correlación entre varias propiedades físico-químicas de proteínas solubles de mamífero y su vida media *in vivo*: peso molecular de la subunidad, punto isoelectrico, superficie hidrofóbica, velocidad de inactivación en homogeneizados, velocidad de inactivación por proteasas, por agitación mecánica o por bajo pH y también con el punto medio de las curvas de inactivación térmica (55, 65, 113, 135, 199, 526, 589).

En relación a los sistemas proteolíticos implicados en la degradación intracelular de proteínas, existe gran controversia sobre el grado de participación de los sistemas lisosomales y no lisosomales. En particular, se están investigando en profundidad los procesos de captura de proteínas por el sistema lisosomal y su regulación. Así, diversos laboratorios han conseguido reproducir *in vitro* la captura y degradación de proteínas por lisosomas aislados intactos, mediante un mecanismo supuestamente similar al de la autofagia (4, 5, 17), aunque no se conocen los factores reguladores de este proceso de incorporación de proteínas al lisosoma. La observación de que el número de vacuolas autofágicas aumenta durante el ayuno (663), parece indicar que su participación no sólo se limita a la degradación basal. Por último, hay que indicar que la autofagia parece ser un proceso muy rápido, lo que permitiría explicar cómo las vacuolas autofágicas, cuya fracción de volumen citoplasmático es de sólo 0,15 %, pueden ser responsables de una disminución de hasta el 25-30 % en el contenido en proteína de los hepatocitos después de 24 horas en ayuno (663). Sin embargo, todavía sigue sin conocerse con certeza si los lisosomas son capaces de llevar a cabo una degradación selectiva bajo condiciones de estado estacionario.

Aún más escaso es nuestro conocimiento sobre la degradación de las proteínas mitocondriales. Los estudios al microscopio electrónico (197, 222, 328, 329), han demostrado claramente la aparición de estos orgánulos secuestrados en autofagosomas tras una inducción del proceso autofágico. En realidad, bajo dicho tratamiento se pueden encontrar englobados en vacuolas autofágicas todos los componentes subcelulares - con las únicas excepciones del núcleo y de la membrana plasmática - siendo, en ocasiones, alguno de ellos predominante pero, en general, se suelen observar contenidos mixtos en dichas vacuolas autofágicas. También disponemos de datos sobre sistemas proteolíticos intramitocondriales que deben de participar de forma importante en el proceso de recambio de este orgánulo, pero cuyo papel está por dilucidar, e incluso, estudios procedentes de nuestro laboratorio, han encontrado evidencias preliminares de una posible cooperación entre los lisosomas y la membrana interna mitocondrial en la degradación de GDH, CPS I y ATPasa (228, 606, 651). En resumen, en la degradación de la mitocondria participan aparentemente rutas lisosómicas, no lisosómicas y mecanismos mixtos.

En este trabajo nos hemos centrado sobre una enzima de la matriz mitocondrial del hepatocito, la Ornitina Transcarbamilasa, cuya inactivación y proteólisis en dicho sistema sólo parece efectuarse por vía lisosomal, puesto que ésta es la única subestructura celular capaz de degradarla (457). Efectivamente los lisosomas, incluso a muy baja concentración, inactivan rápidamente la OTC, aumentando la velocidad de inactivación conforme disminuye el pH. Además, la capacidad hidrolítica del sistema lisosomal hepático en este caso, no parece estar limitada más que por la disponibilidad de la proteína sustrato que va a ser degradada, puesto que la velocidad de inactivación aumenta casi linealmente al hacerlo la concentración de OTC. Por otra parte, dicho sistema presenta una cierta especificidad por esta proteína de localización tisular también casi absolutamente hepática, como se desprende del hecho de que los lisosomas de cerebro no sean capaces de inactivarla.

La inactivación y proteólisis lisosómica de la OTC no parece ser un proceso hidrolítico general e indiscriminado, más bien al contrario, puesto que, como hemos visto, hay toda una serie de ligandos o agentes alostéricos que son capaces de modular esta degradación, bien acelerándola o bien inhibiéndola. Por un lado, tenemos que entre los sustratos y productos de la reacción, el carbamil fosfato es el único que muestra un marcado efecto protector. Precisamente, es este sustrato el que primero se une a la enzima en la reacción que ésta cataliza, y con el que forma complejos binarios muy estables justamente en su centro activo. No resulta extraño pues, que el otro sustrato, la ornitina, no produzca ningún efecto, ya que su enlace a la enzima depende de que ésta se haya unido previamente al carbamil fosfato (379). Es decir, que mediante estos experimentos de inactivación también se pueden obtener evidencias adicionales sobre el orden de enlace de los sustratos. Por otra parte, el hecho de que la susceptibilidad a la degradación de una enzima pueda estar regulada por las concentraciones de sus sustratos tiene bastante sentido. Así,

en ausencia de sus substratos, una determinada enzima es biológicamente inactiva y su degradación selectiva no afectaría a sus funciones metabólicas, pero aportaría aminoácidos y otros productos necesarios para la síntesis de otras proteínas esenciales para la nueva situación.

Un tema que ha sido muy controvertido en relación con la degradación lisosómica de las proteínas de hígado de rata, consiste en el papel que pueda desempeñar la Catepsina D. Dean (112) demostró que la Catepsina D no sólo era capaz de degradar las proteínas nativas del citosol de hígado de rata, sino que debía tener un papel muy importante, puesto que la velocidad de proteólisis en hepatocitos marcados disminuía en un 50 % cuando se incorporaba a los mismos, mediante lisosomas multilamelares, pepstatina, que es un inhibidor específico de la Catepsina D. Nuestros resultados indican que la Catepsina D no participa en la inactivación lisosómica de la OTC y evidencian que es el grupo de las cisteínproteinasas lisosómicas (Catepsinas B, H, L, M, N, S y T) el que está más directamente implicado. Estos resultados se ven corroborados por los trabajos precedentes de otros autores (277, 278, 281, 634), quienes han presentado evidencias de que las cisteínproteinasas son las principales responsables de la degradación proteica intracelular.

Estas cisteínproteinasas presentan unas homologías tales en actividad y especificidad, en secuencia de aminoácidos y sensibilidad a inhibidores, que las hacen difícilmente distinguibles entre sí, sobre todo al utilizar como sustrato una proteína nativa en lugar de sustratos sintéticos de bajo peso molecular. No obstante, la proteasa responsable del primer paso de inactivación e hidrólisis de la OTC, no parecen ser ni la Catepsina H, que sólo se inhibe moderadamente por la leupeptina, ni la Catepsina L que es activada por EDTA. Por otra parte, resulta significativo destacar que la Catepsina B se encuentra en el interior del lisosoma en altísima concentración, aproximadamente 1 mM (116), lo que indica que debe de jugar un papel importante en la proteólisis lisosómica.

Como ya vimos, el carbamil fosfato protege a la OTC contra inactivación y proteólisis mientras que la presencia de ATP aumenta la susceptibilidad de la enzima a la inactivación. Por otra parte, la adición de ATP aumenta considerablemente la afinidad de la enzima por el carbamil fosfato a pH 5,5. Por tanto, todo parece sugerir que el papel de los nucleótidos de purina es el de actuar como agentes alostéricos que interaccionan con la OTC en el sitio de enlace - o muy cerca de éste - del grupo fosforilo del carbamil fosfato, donde se han localizado un residuo de una lisina esencial (383) y otro residuo, excepcionalmente reactivo, de arginina (387).

Precisamente, resulta muy interesante el hecho de que la Catepsina B y otras cisteínproteinasas, se caracterizan porque a pH ácido hidrolizan los enlaces amida o éster en los que existe una L-arginina o L-lisina  $\alpha$ -N-aciladas (213). Todo ello nos conduce a sugerir que, muy posiblemente, el o los enlaces que son susceptibles a las cisteínproteinasas se encuentran en una

zona hidrofóbica de la proteína, en el interior de las subunidades, y que quedan expuestos durante los cambios conformacionales que induce la unión del ATP y protegidos cuando la enzima forma los complejos binarios con el carbamil fosfato. Este mismo argumento serviría para explicar por qué el  $\epsilon$ -ATP resulta ser el nucleótido más efectivo en estimular la inactivación lisosómica de la OTC, puesto que al poseer un anillo extra, el cambio conformacional que induce debe de ser más drástico y, por tanto, quizás exponga todavía más el centro activo de la enzima y/o el lugar de ataque de las cisteínproteinasas. Además, este compuesto presenta por un lado unas propiedades fluorescentes muy útiles, puesto que se puede excitar fuera del rango de absorción de ácidos nucleicos y proteínas, y emite en una región en la que no interfiere con la fluorescencia de éstas, y por otra parte conserva una gran actividad biológica como sustrato en sustitución del ATP (585, 586), todo lo cual permitirá realizar estudios posteriores para determinar el sitio y el tipo de unión a la enzima de los nucleótidos de purina, ya que hasta este momento no se conocía ningún agente alostérico de la OTC. Esta capacidad de unir ATP y la posibilidad de que éste pueda ser un agente alostérico que regule la degradación de la OTC, es un concepto nuevo y que llama poderosamente la atención, sobre todo al no ser la OTC una enzima alostérica *per se*. Sin embargo, muy recientemente (349) se ha demostrado que una mutación puntual en la OTC, cambiando la arginina de la posición 106 por un residuo de glicina, da lugar a una enzima mutante que presenta cooperatividad entre los sustratos, lo que no existe en la enzima nativa. Además, también se ha puesto de manifiesto (349) que el ion cinc, en concentraciones fisiológicas, resulta un cofactor alostérico de la OTC, al ser un inhibidor competitivo de la L-ornitina. Es decir, esta enzima oligomérica tiene la capacidad de estar regulada alostéricamente y, quizás, convertirse en un punto de control del ciclo de la urea si las condiciones fisiológicas lo requieren.

Por otra parte, existe una enzima estrechamente relacionada con la OTC, que es la Aspartato Transcarbamilasa (ATC), y que cataliza una reacción análoga en la ruta de la biosíntesis de pirimidinas. Las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas presentan una homología muy alta. Tanto es así que, cuando el dominio responsable del enlace del carbamil fosfato de la OTC se fusiona con el dominio correspondiente a la unión de aspartato de la ATC, ambas procedentes de *E. coli*, se obtiene una Aspartato Transcarbamilasa activa (348). Pues bien, la ATC es un clásico ejemplo de una enzima sujeta al control alostérico, siendo activada por ATP e inhibida por CTP (683, 709), o incluso UTP si está en presencia de CTP (684), aunque la unión tiene lugar en la subunidad reguladora de la ATC y no sobre la catalítica. Sin embargo, sí que se ha demostrado que tanto ATP como CTP compiten con el carbamil fosfato por el centro activo y, de hecho, se unen al mismo (313).

Una de las características generales y más importantes de la degradación proteica intracelular es, como ya comentamos anteriormente, la necesidad de energía metabólica. Sin embargo, el papel que desempeñan en la inactivación de la OTC los nucleótidos de purina que

contienen enlaces fosfato de alta energía, difiere en muchos aspectos de los otros sistemas proteolíticos ATP-dependientes descritos hasta la fecha. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones:

- Esta estimulación por ATP sólo funciona en los valores de pH fisiológicos del lisosoma, es decir a pH ácido, mientras que todas las proteasas ATP-dependientes descritas tienen valores de pH óptimos alcalinos.
- El efecto del ATP no se produce sobre el sistema proteolítico, sino que actúa como un agente alostérico de la proteína sustrato aumentando su susceptibilidad proteolítica.
- La estimulación por ATP no requiere iones  $Mg^{2+}$ , al contrario que los sistemas proteolíticos del reticulocito dependientes o independientes de ubiquitina o que las serínproteinasas ATP-dependientes (67).
- Los análogos no hidrolizables del ATP no producen ninguna estimulación, al contrario de lo que ocurre con todas las cisteínproteinasas que son estimuladas o estabilizadas contra la desnaturalización térmica por el ATP. Nuestros resultados indican que la hidrólisis del ATP es necesaria, pero no para la actividad proteolítica, como es el caso de la proteasa La de *E. coli* (411, 412, 635) y todas las serínproteinasas ATP-dependientes (67). En cualquier caso, queda por demostrar si esta rápida inactivación ATP-dependiente de la OTC está sujeta o no a un mecanismo de fosforilación o incluso de incorporación de adenina o guanina, y que sea una de estas modificaciones covalentes de la proteína sustrato la que conduzca a su rápida susceptibilidad al conjunto de cisteínproteinasas lisosomales.
- Ni el vanadato ni otros inhibidores de ATPasas, tienen efecto alguno sobre esta estimulación del ATP, al contrario de lo que ocurre con la proteasa La y otras serínproteinasas ATP-dependientes cuya actividad lleva aparejada la hidrólisis del ATP. En nuestro sistema, el vanadato más bien parece potenciar la inactivación. Esto podría deberse a su efecto inhibitor sobre las ATPasas presentes en las preparaciones de lisosomas, lo que dejaría mayor cantidad de ATP disponible para ser consumido en la reacción de inactivación de la OTC, o bien que, al ser un análogo del fosfato inorgánico, provoque la formación de un complejo enzima-vanadato o induzca una conformación alterada de la enzima que resulten sensibles a la proteólisis.

Por tanto, y como hemos podido constatar a través de todo lo expuesto, existen múltiples formas en las que el ATP puede estimular la proteólisis. Otro ejemplo, algo más cercano a los resultados aquí presentados, sería el caso de las Catepsinas lisosomales L y D, para las que se ha descrito una estimulación ATP-dependiente de sus actividades proteolíticas (317, 501). Sin embargo, se ha encontrado que el efecto del ATP sobre la Catepsina L era el de interactuar con el sustrato - la Aldolasa - en lugar de con la proteínasa (407).

La localización de proteínas mitocondriales en las fracciones hepáticas correspondientes a lisosomas y vacuolas autofágicas, tanto por métodos bioquímicos como inmunocitológicos, demuestra la participación de estos orgánulos en la degradación de las proteínas mitocondriales. Nuestros resultados confirman estas observaciones, al demostrar que este mecanismo está regulado por diversos agentes y en concentraciones fisiológicas de los mismos. Así, el papel de los nucleótidos de purina puede ser importante para producir una rápida inactivación *in vivo* de la OTC y evitar la presencia de una proteína activa, bien en el interior del lisosoma, bien fuera de la mitocondria, donde podría resultar perjudicial para la célula al competir, por ejemplo, y dada su alta actividad específica, por el carbamil fosfato con la Aspartato Transcarbamilasa. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que, recientemente, se ha podido demostrar que el pOTC desnaturalizado es capaz de ensamblarse dando lugar a un trímero enzimáticamente activo (448).

La cantidad de proteína por volumen celular permanece esencialmente constante casi bajo cualquier circunstancia, a pesar del extenso proceso de recambio de las proteínas intracelulares y de la coexistencia de proteínas cuya vida media es parecida o superior al tiempo de generación celular, mientras que otras no llegan al 1 % del mismo. Por tanto, las velocidades de degradación parecen estar controladas de forma diferencial para cada proteína en particular y ser función del estado fisiológico de la célula (504). Por analogía con la hipótesis de la secuencia señal - que deriva de los estudios sobre la secreción de proteínas y la biogénesis de orgánulos y según la cual secuencias de aminoácidos de la región amino-terminal son las que determinan el destino final de una proteína - diversos trabajos han considerado que la información que determina la vida media de una proteína podría estar en su estructura. En relación con una de estas hipótesis, según la cual la vida media *in vivo* de una proteína sería función de su residuo aminoterminal, cabe resaltar que la OTC de hígado de rata presenta un residuo de serina en su extremo N-terminal y que éste aminoácido es uno de los que determinan o se asocian con las proteínas de vida media larga, como es el caso de esta enzima según hemos demostrado en este trabajo. Sobre la hipótesis de las secuencias PEST - según la cual todas las proteínas eucariotas de vida media corta y secuencia conocida, contienen regiones ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina -, es preciso destacar que existen proteínas eucariotas estables y de  $t_{1/2}$  larga que presentan también regiones PEST y que este tipo de mecanismo no parece cumplirse para las proteínas bacterianas. Por tanto, deben de existir otros factores

reguladores que determinen la velocidad de recambio de las proteínas y que no sean variables independientes entre sí. Dentro de estos otros elementos se pueden encontrar la localización intracelular, la asociación con otras macromoléculas o, según los resultados que se presentan en este trabajo, por la modulación o modificación que de las características conformacionales de una proteína realice el medio ambiente celular. El modelo que se deriva de este control biológico, según el cual las proteínas modifican constantemente su conformación interaccionando con sustratos, cofactores de otros efectores alostéricos que inducen conformaciones " elásticas " que estabilizan, o " plásticas " que las convierten en sustratos para ser degradadas, regularía los niveles de cada proteína y su velocidad de degradación de acuerdo con la hipótesis de la plasticidad molecular (217, 223, 224, 228).

#### **6.5.- DETERMINANTES MOLECULARES DE LA VELOCIDAD DE RECAMBIO DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.**

El término motivo proteico se ha utilizado para describir diversas características de las proteínas. Por un lado, se habla de motivos de secuencia, que se deducen a partir de secuencias homólogas, para las cuales puede o no haber información estructural. La identificación de estos motivos de secuencia se realiza alineando dos o más secuencias homólogas, y construyendo una secuencia consenso para aquellas posiciones con residuos de aminoácidos idénticos o que han sufrido sustituciones o cambios conservativos.

También existen los motivos de secuencia derivados o relacionados con una estructura en concreto. Es decir, pequeñas secuencias patrón que predicen una determinada estructura secundaria independientemente del contexto. Finalmente, también se encuentran motivos estructurales, que se identifican mediante una comparación detallada de las estructuras proteicas obtenidas por medio de sofisticados programas de análisis gráfico computerizado.

Todos estos motivos pueden ser característicos de superfamilias de proteínas que derivan de un ancestro común y que, con el paso del tiempo, han ido perdiendo su semejanza excepto en aquellas regiones que están implicadas en las funciones más importantes. No obstante, dichos motivos también pueden reflejar un fenómeno de convergencia evolutiva. Es decir, se presentan en proteínas que no tienen nada que ver entre sí, pero constituyen la única solución que la naturaleza ha podido encontrar para resolver un problema concreto de catálisis, de unión de sustrato, etc. La distinción entre divergencia y convergencia no es fácil en muchos casos, como por ejemplo, el bucle de unión de fosfato (P-loop), que se presenta en proteínas tan distantes como la Adenilato Kinasa y la Miosina y, sin embargo, no se encuentra en todas las proteínas que unen ATP. De hecho, no existe un motivo universal que identifique un lugar de enlace para ATP. De las siete familias en que se ha subdividido el motivo P-loop (565), sólo se conserva siempre el residuo de

lisina de la secuencia originalmente descrita (GXXXXGK[TS]). Dicho residuo parece desempeñar un importante papel conformacional, interaccionando con los grupos fosfato  $\beta$  y  $\gamma$  del nucleótido trifosfato, y se ha postulado que su papel puede ser el de estabilizar el estado de transición de la reacción de transferencia del grupo fosforilo (529). La presencia en la estructura primaria de la OTC, de lo que podríamos denominar como un resto de un bucle de unión de fosfato y muy próximo al sitio de enlace del carbamil fosfato, junto con los datos del efecto del ATP sobre su degradación lisosómica y del carbamil fosfato sobre dicho efecto, parecen confirmar, y mediante dos aproximaciones totalmente distintas, que efectivamente la OTC tiene un sitio de enlace para nucleótidos de adenina y guanina. Para el resto de los motivos proteicos detectados en la OTC, no se puede dar por el momento, y con los datos bioquímicos de que se dispone hoy en día, ninguna asignación del posible papel que podrían desempeñar. Tan sólo resaltar que dos de los potenciales lugares de fosforilación por la Proteína Kinasa II afectan, uno al lugar de enlace del carbamil fosfato y otro a la posible secuencia PEST detectada.

La integridad estructural y de funcionamiento metabólico de la célula, se mantiene pese a la constante síntesis y degradación de sus proteínas constituyentes. Cómo se mantiene esa organización celular durante dicho proceso de constante remodelado, establece un problema de autoensamblaje de enormes proporciones, en el que la proteólisis intracelular desempeña, indudablemente, un papel clave al resultar un importante mecanismo de regulación. Sin embargo, este proceso de degradación de proteínas está a su vez altamente regulado, aunque no se conocen bien los factores responsables, muy probablemente porque, al contrario que en el caso del mecanismo de la síntesis proteica, existen múltiples rutas de degradación para las proteínas intracelulares. Estas presentan un amplio rango de valores de vida media, lo que conduce lógicamente a intentar encontrar correlaciones entre las características de las proteínas y su velocidad de recambio. Existen numerosas hipótesis en este sentido, que podrían agruparse en tres grandes categorías:

- Parámetros globales.
  
- Propiedades de secuencias o composición de aminoácidos.
  
- Localización.

En relación con el primer punto, los estudios más exhaustivos realizados (545, 551), y que se apoyan fundamentalmente en la microinyección de proteínas en cultivos celulares, indican que no existe la suficiente evidencia experimental para poder establecer inequívocamente una correlación entre la vida media de una proteína y su tamaño, carga neta, contenido en aminoácidos hidrofóbicos, acilación del extremo N-terminal, proporción de las conformaciones en hélice  $\alpha$  y

hoja plegada  $\beta$ , estabilidad térmica, flexibilidad o pérdida transitoria de la estructura tridimensional y susceptibilidad proteolítica. No obstante, los datos disponibles de otros estudios anteriores (55, 65, 113, 133-135, 199, 526, 589), no permiten descartar que algunas de las hipótesis mencionadas afecten la estabilidad intracelular de las proteínas y, claramente, se necesitaría profundizar en estos aspectos mediante nuevos estudios.

Sobre el segundo grupo, los estudios sobre la biogénesis mitocondrial y la secreción de proteínas, ya han demostrado claramente que pequeñas porciones de una cadena polipeptídica, contienen la suficiente información para dirigir a una proteína hacia su correcta localización celular. Así, se han identificado las características esenciales de las presecuencias responsables del transporte específico de precursores proteicos desde el citosol a la mitocondria (253, 547, 662) o al peroxisoma (209). Por otra parte, a partir de datos experimentales obtenidos combinando las técnicas de microinyección e ingeniería genética, se ha puesto de manifiesto la existencia de determinadas secuencias de aminoácidos que parecen dirigir la degradación de las proteínas. Así han surgido diversas hipótesis como la de las regiones PEST, la de las secuencias KFERQ, la regla del aminoácido N-terminal, la de la oxidación de residuos de metioninas, histidinas y cisteínas e incluso la modificación de los residuos de ácido aspártico. Todas estas correlaciones entre composición o secuencia de aminoácidos y velocidades de degradación, al ser relativamente recientes, todavía no se han visto suficientemente contradichas por otros estudios más dirigidos a su comprobación. Por tanto, habrá que esperar para ver si dichas formulaciones sobreviven en el tiempo o, por el contrario, son objetadas por nuevas evidencias experimentales.

Finalmente, el concepto de que la localización de una proteína afecta a su estabilidad intracelular es relativamente antiguo. No obstante, tal y como ya se comentó en la Introducción, se han realizado estudios que apoyan esta hipótesis (526), indicando que puede resultar tan importante para la degradación de una proteína dónde se sitúa intracelularmente, como cualquiera de sus estructuras, desde la primaria a la cuaternaria. Si efectivamente esto es así, entonces los intentos de establecer correlaciones entre estructura y estabilidad proteicas frente a la degradación, se complican. Por tanto, se debe de procurar evaluar la importancia relativa que los determinantes estructurales presentan *per se* frente a la localización. Esto es exactamente lo que se ha perseguido en el último apartado de este trabajo, puesto que en el camino para llegar a comprender los mecanismos de degradación de las proteínas mitocondriales, una de las cuestiones clave, entre otras, es la de la selectividad del proceso.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas mitocondriales disponibles en las bases de datos, en relación con las principales hipótesis que intentan relacionar determinantes moleculares y vidas medias, pone de manifiesto varias circunstancias, como se discute a continuación. En primer lugar, hay que resaltar que se dispone de pocos datos referentes a valores de vida media de proteínas mitocondriales concretas. En efecto, son mayoría las proteínas

mitocondriales de las que se dispone de su secuencia de aminoácidos, pero se desconoce su velocidad de degradación, lo que dificulta en gran parte la interpretación de los resultados obtenidos.

Sobre la hipótesis que establece que la vida media de una proteína es función del residuo de su aminoácido N-terminal, parece claro que se puede aplicar al sistema proteolítico de los reticulocitos dependiente de ubiquitina, aunque no es la única característica estructural del sustrato que se necesita para su degradación por dicha ruta. Este sistema proteolítico es de localización citosólica y no parece tener efecto, al menos *in vitro* sobre proteínas mitocondriales nativas (567). Por tanto, el hecho de que se presenten algunas contradicciones al aplicar la regla del aminoácido N-terminal a las proteínas mitocondriales no resulta sorprendente. Además, la situación se complica al tener en cuenta que existen diversas evidencias experimentales (35, 85, 96) que indican que las características del sustrato que son importantes para su reconocimiento y degradación se extienden más allá del extremo N-terminal. Como ejemplo de lo anterior, tenemos que la RNasa A (que presenta una lisina en su extremo N-terminal) no es un buen sustrato del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina hasta que se oxidan sus residuos de metionina (96). También se ha demostrado que moléculas de Dihidrofolato Reductasa con distintos aminoácidos en su extremo N-terminal, presentan la misma estabilidad, independientemente de la presencia o no de residuos de aminoácidos estabilizadores (35); experimentos posteriores (85) han confirmado que es necesaria la presencia de un residuo de lisina en las proximidades del extremo amino para que se vuelva a cumplir la regla. Así pues, aclarar el papel que esta hipótesis pueda jugar en la degradación de las proteínas mitocondriales, necesitaría de una mejor definición sobre cuáles han de ser las características del sustrato, poder disponer de datos sobre la estructura tridimensional de cada proteína mitocondrial y, en todo caso, quedaría limitada a la eliminación de enzimas mitocondriales que hubieran invadido el citoplasma celular.

En el caso de la hipótesis de las secuencias PEST, ocurre que éstas son difíciles de definir de acuerdo con una determinada disposición de aminoácidos y, en realidad, no existe una secuencia típica o consenso que pueda agrupar o definir estas regiones que, además, pueden presentarse en cualquier posición dentro de la cadena polipeptídica. Aunque aquí no se ha seguido el método original para su detección, sí que se puede observar que las posibles secuencias PEST encontradas en las proteínas mitocondriales responden a las características generales descritas para las mismas, e incluso muchas de ellas contienen sitios potenciales de fosforilación. Sin embargo, al no haber podido seguir el procedimiento originalmente descrito, no se dispone del valor PEST que dicho método asigna a cada secuencia. Se han detectado posibles secuencias PEST para proteínas mitocondriales que presentan muy distintas vidas medias, desde la de vida media más larga, la Fumarasa con 233 horas (333) hasta la  $\delta$ -Aminolevulinato Sintetasa que presenta una  $t_{1/2}$  - 1 hora (526). Los resultados del análisis realizado sobre la estructura primaria de esta enzima de vida

media corta, revelan lo difícil que resulta conciliar los datos que se obtienen con las distintas teorías y las medidas de velocidad de degradación. Por una parte, los aminoácidos N-terminales en los distintos organismos son desestabilizadores y, también en todos los casos, se detectan posibles secuencias PEST. Ahora bien, éstas no se parecen en nada entre sí. Ello podría explicarse por la conocida y reiterada ausencia de un motivo consenso para las secuencias PEST, que podrían haber sufrido un proceso de evolución degenerativa, al igual que ocurre con los péptidos de secuencias señales, que tan sólo presentan distribuciones de residuos que sugieren la existencia de rasgos conformacionales comunes (463, 547). Además, estas posibles secuencias PEST de las diferentes  $\delta$ -Aminolevulinato Sintetasas estudiadas, se presentan en lugares distintos dentro de la cadena polipeptídica, y una de ellas incluye el sitio de corte en el que se produce el procesado proteolítico del precursor. Por otro lado, nos encontramos con la presencia de secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ. A su vez, esto implicaría su degradación, bajo condiciones de proteólisis acelerada, en los lisosomas que, aunque tradicionalmente han estado implicados en el proceso de recambio de las proteínas de vida media larga (62), también se tienen evidencias experimentales en favor de que pueden participar en parte del recambio de las proteínas de vida media corta (3, 590). En el caso de la Fumarasa, quizás la secuencia PEST detectada tenga algún papel en la degradación de la enzima citosólica, pues ésta tiene una vida media sensiblemente más corta -  $t_{1/2} = 115$  horas (333) - que la mitocondrial -  $t_{1/2} = 233$  horas (333) -. Así, aun cuando no se pueda considerar a la Fumarasa citosólica como una proteína de recambio rápido, la secuencia PEST podría actuar como una señal de degradación condicionada por alguna circunstancia - como un cambio conformacional o la fosforilación - que expusiera la región PEST hacia la superficie de la proteína. Este tipo de razonamiento se puede aplicar también al resto de secuencias PEST que aparecen en las proteínas mitocondriales de vida media larga. De hecho, esta hipótesis del posible papel de las regiones PEST como señales, condicionales y condicionantes, de degradación se ha sugerido en otros casos (524). Estos son precisamente aquellos en los que se ha observado que la presencia de una región PEST no implica necesariamente la rápida degradación de una proteína, sino que es necesario el cambio de alguna otra circunstancia para que se produzca su acción. Como ejemplos de ello, es decir, de proteínas con secuencias PEST latentes, son: el Fitocromo, que puede existir en dos estados espectrales -  $P_{670}$  ( $t_{1/2} > 100$  horas), y  $P_{730}$  ( $t_{1/2} \sim 1$  hora) - o la Fructosa-1,6-Bifosfatasa de levadura, que es esencial para el crecimiento sobre etanol, pero que es rápidamente degradada al añadir glucosa al medio de cultivo. La inactivación reversible de esta enzima parece transcurrir a través de un proceso de fosforilación, dependiente de cAMP, y que tiene lugar precisamente en su secuencia PEST. De hecho, en más del 50 % de las regiones PEST detectadas en las proteínas mitocondriales aparecen sitios potenciales de fosforilación. De entre ellos, la mayoría corresponden a secuencias que encajan con el motivo consenso de la Caseína Kinasa II la cual, según una hipótesis del propio Rechsteiner, debe de desempeñar un papel importante en la degradación de las proteínas con secuencias PEST.

Una observación detallada de la Tabla 26, pone de manifiesto que en muchos de los casos de enzimas formadas por múltiples y distintas subunidades, en alguna de ellas siempre se detecta una secuencia PEST, lo que *a priori* parecería un contrasentido. Sin embargo, puede que el papel de estas secuencias PEST no sea el de señalar a una determinada cadena polipeptídica para que sufra una rápida degradación, sino que podrían desempeñar otras funciones relacionadas con las asociaciones o interacciones entre subunidades. Por ejemplo, las regiones PEST podrían representar sitios susceptibles de modificación (¿de nuevo fosforilación?) que alteren las asociaciones proteína-proteína. A este respecto, hay que destacar que muchas de las proteínas descritas originalmente por contener regiones PEST, se encuentran formando complejos (524). Así, la presencia de elementos PEST en las interfases entre subunidades podría controlar su asociación y/o disociación, y su rápida degradación sería un ejemplo más del acelerado recambio a que están sujetas las subunidades sin ensamblar (523).

La abundante presencia en muchas de las proteínas mitocondriales de secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ, no debería de ser una sorpresa puesto que es abrumadora la evidencia experimental que ha demostrado la presencia de mitocondrias, restos de las mismas o enzimas mitocondriales en el interior de lisosomas y bajo condiciones de recambio proteico acelerado (197, 222, 328, 329, 437). Sin embargo, no hay que olvidar que esta hipótesis surgió de estudios sobre proteínas citosólicas, aunque también existen muchas proteínas intracelulares con secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ (132). Por tanto, es muy posible que no todas las proteínas que presentan estas secuencias sean degradadas preferencialmente bajo condiciones de proteólisis acelerada. Por ejemplo, se ha sugerido la posibilidad de que lo hagan sólo aquellas proteínas en las que el pentapéptido no se encuentre situado en la estructura tridimensional de la molécula dentro de un entorno inaccesible (132).

El número de péptidos que responden a las secuencias consenso: Q (+, -, [ ], +/[ ]) y (+, -, [ ], +/[ ]) Q, es de 48 y no de 40 como se ha descrito en la bibliografía (132), y cuando se tienen en cuenta los aminoácidos permitidos en cada posición (+ = K,R; - = D,E; [ ] = F,V,L,I), el número de combinaciones posibles es de 2304. Así pues, no es de extrañar que, en el análisis de este tipo de péptidos sobre las secuencias de las proteínas mitocondriales, no se dé ningún caso de repetición del mismo pentapéptido en dos proteínas distintas. Por otra parte, se suele cumplir, con alguna excepción, el hecho de que si en una proteína aparece una secuencia relacionada con KFERQ, lo haga en todos los organismos estudiados (como ejemplos tenemos la Glutamato Deshidrogenasa o la Aspartato Transcarbamilasa), y si no aparece secuencia KFERQ, no lo hace en ninguno de los organismos (OTC, Citocromo c, Citocromo B). También se observa que hay enzimas formadas por múltiples subunidades, y en las que no se presenta ningún péptido relacionado con KFERQ, y no lo hace en ninguna de las subunidades ni en los distintos organismos estudiados (Citocromo c Oxidasa, NADH:Ubiquinona Oxidoreductasa, Ubiquinol-Citocromo c

Reductasa). Todo ello parece indicar que la distribución de estas secuencias KFERQ no es, en modo alguno, aleatoria.

## **7.- CONCLUSIONES**

1.- La aplicación de la técnica de los complejos proteína A-oro coloidal en células de hígado de rata ha permitido realizar una determinación inmunocitoquímica de la localización intracelular de OTC, GDH y CPS I, así como calcular las concentraciones relativas entre dichas proteínas. Los resultados obtenidos permiten confirmar, mediante una aproximación totalmente distinta, los datos bioquímicos de localización y concentración de estas proteínas.

2.- La distribución de las mitocondrias en un hepatocito de rata, de acuerdo con el número de partículas de oro por micra cuadrada para cada una de las tres enzimas estudiadas, se ajusta estadísticamente a una distribución normal. Por tanto, la determinación inmunocitoquímica de estas proteínas ha puesto de manifiesto la existencia de una homogeneidad en la población intracelular de mitocondrias. Todo lo cual indica que las diferencias en vidas medias observadas para las diferentes proteínas mitocondriales deben tener su origen, bien en mecanismos de degradación distintos de la autofagia, bien en la heterogeneidad intercelular dentro del tejido hepático, o en ambas circunstancias.

3.- La vida media de la OTC, determinada por el método del doble isótopo, ha resultado ser de 8,7 días utilizando las  $K_D$  que se obtienen mediante el marcaje con [guanidino- $^{14}\text{C}$ ] arginina, y de 3,9 días utilizando las  $K_D$  que proporciona el marcaje con [ $^{14}\text{C}$ ] carbonato. Así pues, su velocidad de recambio, que es la más lenta que se ha descrito para una enzima mitocondrial, es muy similar a la de la CPS I y está dentro del rango de la que presenta en su conjunto la mitocondria. Todo ello sugiere que la autofagia lisosomal podría ser el mecanismo de degradación implicado en el recambio de la OTC.

4.- Los lisosomas son la única fracción subcelular capaz de inactivar la OTC, inactivación que es estimulada por ATP y otros nucleótidos de purina que contengan enlaces ricos en energía, especialmente por el  $\epsilon$ -ATP. Esta estimulación de la inactivación lisosómica de la OTC tiene lugar en el intervalo de concentraciones fisiológicas del ATP, no necesita la presencia de iones magnesio y sobre ella no tienen efecto alguno ni los inhibidores de ATPasas ligadas a membranas ni los de las solubles.

5.- El carbamil fosfato protege totalmente a la OTC de su inactivación y proteólisis por lisosomas, incluso en presencia de ATP, que no hace sino aumentar la afinidad de la enzima por dicho sustrato.

6.- El efecto del ATP y de los demás nucleótidos de bases púricas se produce sobre la OTC, no sobre el sistema proteolítico lisosomal, y lleva asociada la hidrólisis de aquel. Esto descubre un nuevo aspecto de la dependencia energética de la degradación de proteínas, puesto que presenta

marcadas diferencias con los sistemas proteolíticos ATP-dependientes descritos hasta este momento.

7.- La inactivación de la OTC por lisosomas origina, inicialmente, dos fragmentos peptídicos de pesos moleculares 24.000 y 15.000 respectivamente, y va seguida de una extensa proteólisis. El proceso de inactivación inicial parece estar mediado por cisteínproteinasas de los lisosomas hepáticos que, posiblemente, reconocen un sitio de corte específico en la secuencia de aminoácidos de la OTC, que quedaría expuesto o inaccesible en función de los cambios conformacionales inducidos por el enlace de los distintos ligandos. Todo ello concuerda con los planteamientos de la hipótesis de la plasticidad molecular.

8.- El análisis de la secuencia de aminoácidos de la OTC, revela la existencia de potenciales sitios de fosforilación y de una posible secuencia PEST que afectarían a las inmediaciones del lugar de enlace del carbamil fosfato. Sin embargo, no se han detectado secuencias relacionadas con el pentapéptido KFERQ, pese a que tanto su velocidad de degradación *in vivo*, como su proteólisis *in vitro*, apuntan a que sea el sistema lisosomal el principal implicado en la degradación intracelular de la OTC.

9.- El análisis de 214 secuencias proteicas correspondientes a 114 polipéptidos mitocondriales de mamíferos superiores, ha permitido describir la presencia de posibles secuencias PEST y pentapéptidos relacionados con la secuencia KFERQ dentro del conjunto de proteínas estudiadas. En relación con el pentapéptido KFERQ, por primera vez se describe la presencia de la misma secuencia en dos proteínas, aunque no mitocondriales, descritas en las bases de datos: el antígeno JY8 humano del complejo de histocompatibilidad principal de clase I, y la Proteína Kinasa 1 de *Schizosaccharomyces pombe*. Además, entre los 52 motivos diferentes relacionados con la secuencia KFERQ y detectados en las proteínas mitocondriales, ninguno repite la misma secuencia ni tampoco aparece ningún motivo genérico con una frecuencia significativamente más alta que los demás. Sobre las posibles secuencias PEST detectadas, muchas de ellas contienen sitios potenciales de fosforilación y se presentan tanto en proteínas de vida media larga, como OTC, CPS I y Fumarasa, como en las de vida media corta, por ejemplo la  $\delta$ -Aminolevulinato Sintetasa. Análogamente ocurre con los aminoácidos N-terminales, encontrándose residuos estabilizadores y desestabilizadores tanto en proteínas de velocidad de recambio rápido como lento. Así pues, este análisis de la estructura primaria de las proteínas mitocondriales en relación con las principales hipótesis que intentan relacionar velocidades de recambio con determinantes estructurales de las proteínas, ha puesto de manifiesto algunas de las contradicciones de dichas teorías, al menos en lo respecta a su aplicación sobre el conjunto de proteínas que integran la mitocondria.

## **8.- BIBLIOGRAFIA**

- 1.- ABDELAL, A.T.H., KENNEDY, E.H. & NAINAN, O. (1977) *J. Bacteriol.* **129**, 1387-1396.
- 2.- ACASTER, M.A., SCOTT-WHITE, S. & WEITZMAN, P.D.J. (1989) *J. Exp. Botany* **40**, 1121-1125.
- 3.- AHLBERG, J., BERKENSTAN, A., HENELL, F. & GLAUMANN, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5847-5852.
- 4.- AHLBERG, J. & GLAUMANN, H. (1985) *Exp. Mol. Pathol.* **42**, 78-88.
- 5.- AHLBERG, J., HENELL, F. & GLAUMANN, H. (1982) *Lab. Invest.* **47**, 523-532.
- 6.- AKAMATSU, M. & GROSSMAN, L.I. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 3645.
- 7.- ALBERTI, K.G.M.M. & BARTLEY, W. (1965) *Biochem. J.* **95**, 641-656.
- 8.- ALLEN, C.M. & JONES, M.E. (1964) *Biochem.* **3**, 1238-1247.
- 9.- ALONSO, E. & RUBIO, V. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 342-350.
- 10.- AMENTA, J.S., SARGUS, M.J. & BACCINO, F.M. (1977) *Biochem. J.* **168**, 223-227.
- 11.- AMURO, N., PALUH, J.L. & ZALKIN, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14844-14849.
- 12.- AMURO, N., OOKI, K., ITO, A., GOTO, Y. & OKAZAKI, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 2356.
- 13.- ANDERSON, L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2407-2411.
- 14.- ANDERSON, S., De BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., EPERON, I.C., SANGER, F. & YOUNG, I.G. (1982) *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717.
- 15.- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., De BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J.H., STADEN, R. & YOUNG, I.G. (1981) *Nature* **290**, 457-465.
- 16.- ANDERSON, S., DAVIS, D.L., DAHLBAECK, H., JORNVALL, H. & RUSSELL, D.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8222-8229.
- 17.- ANIENTO, F. (1989) en " Degradación Intracelular de Proteínas en Células de Mamífero ". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.

- 18.- AOKI, Y. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2026-2032.
- 19.- AOKI, Y., SUNAGA, H. & SUZUKI, K.T. (1988) *Biochem. J.* **250**, 735-742.
- 20.- AOKI, Y. & SUZUKI, K.T. (1989) *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **63**, 411-422.
- 21.- APERIA, A., BROBERGER, O., LARSSON, A. & SNELLMAN, K. (1979) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 329-342.
- 22.- AQUA, M.S., LOMAX, M.I., SCHON, E.A. & GROSSMAN, L.I. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 8376.
- 23.- ARAKAWA, H., TAKIGUCHI, M., AMAYA, Y., NAGATA, S., HAYASHI, H. & MORI, M. (1987) *EMBO J.* **6**, 1361-1366.
- 24.- ARGAN, C., LUSTY, C.J. & SHORE, G.C. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6667-6670.
- 25.- ARIAS, I.M., DOYLE, D. & SCHIMKE, R.T. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3303-3315.
- 26.- ARORA, K.K., FANCIULLI, M. & PEDERSEN, P.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6481-6488.
- 27.- ARRIGO, A.P., TANAKA, K., GOLDBERG, A.L. & WELCH, W.J. (1988) *Nature* **331**, 192-194.
- 28.- ASARI, T., MORI, M., MIURA, S. & TATIBANA, M. (1982) *Gann* **73**, 728-734.
- 29.- ASCHENBRENNER, V., CRUYN, R., ALBIN, R. & RABINOWITZ, M. (1970) *Biochem. J.* **119**, 157-160.
- 30.- AURICH, M., KIRSCHKE, H. & WIEDERANDERS, B., (eds.) (1968) (Proc. VI Int. Symp. on Intracellular Protein Catabolism). *Biomed. Biochim. Acta* **45**, 1636-1663.
- 31.- AYANE, M., NIELSON, P.J. & KOEHLER, G. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6723.
- 32.- AYTE, J., GIL-GOMEZ, G., HARO, D., MARRERO, P.F. & HEGARDT, F.G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3874-3878.
- 33.- BACH, A.W.J., LAN, N.C., JOHNSON, D.L., ABELL, C.W., BEMBENEK, M.E., KWAN, S.W., SEEBURG, P.H. & SHIH, J.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4934-4938.
- 34.- BACHMAIR, A., FINLEY, D. & VARSHAVSKY, A. (1986) *Science* **234**, 179-186.

- 35.- BACHMAIR, A. & VARSHAVSKY, A. (1989) *Cell* **56**, 1019-1032.
- 36.- BACKER, J.M., BOURRET, L. & DICE, J.F. (1983) *Biochemistry* **80**, 2166-2170.
- 37.- BACKER, J.M. & DICE, J.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5830-5834.
- 38.- BAIROCH, A. (1990) " *Prositate: A Dictionary of Protein Sites and Patterns* ", versión 5. Universidad de Ginebra.
- 39.- BALLARD, F.J. (1977) *Essays Biochem.* **13**, 1-37.
- 40.- BALOGH, A.G., RIDLEY, R.G., PATEL, H.V. & FREEMAN, K.B. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 156-161.
- 41.- BANNO, Y., MORRIS, H.P. & KATUNUMA, M. (1978) *J. Biochem.* **83**, 1545-1554.
- 42.- BARRA, D., BOSSA, F. & SCHIRCH, V. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8509-8519.
- 43.- BARRETT, A.J. (1986) en " *Proteinase Inhibitors* " (Barrett, A.J. & Salvensen, A., eds.), Vol. 1, págs. 3-18. Elsevier Science Publishers BV, New York.
- 44.- BASU, A. & AVADHANI, N.G. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1087**, 98-100.
- 45.- BAUR, H., STALON, V., FALMAGNE, P., LUETHI, E. & HAAS, D. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 111-117.
- 46.- BAWDEN, M.J., BORTHWICK, I.A., HEALY, H.M., MORRIS, C.P., MAY, B.K. & ELLIOTT, W.H. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 8563.
- 47.- BEATTIE, D.S., BASFORD, R.E. & KORITZ, S.B. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 4584-4586.
- 48.- BEAUFAY, H. (1969) en " *Lysosomes in Biology and Pathology* ". (Dingle, J.T. & Fell, H.B., eds.), Vol. 2, págs. 516-546, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 49.- BEAUFAY, H. (1972) en " *Lysosomes. A Laboratory Handbook* ". (Dingle, J.T., ed.), págs. 1-45. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 50.- BECK, Y., OREN, R., AMIT, B., LEVANON, A., GORECKI, M. & HARTMAN, J.R. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 9076.

- 51.- BEER, D.G., HJELLE, J.J., PETERSEN, D.R. & MALKINSON, A.M. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 1276-1283.
- 52.- BENCINI, D.A., HOUGHTON, J.E., HOOVER, T.A., FOLTERMANN, K.F., WILD, J.R. & O'DONOVAN, G.A. (1985) *Nucleic Acids Res.* **11**, 8509-8518.
- 53.- BENDAYAN, M., ROTH, J., PERRELET, A. & ORCI, L. (1980) *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 149-160.
- 54.- BERGER, J. & DICE, J. (1986) *Am. J. Physiol.* **251**, C748-C753.
- 55.- BEYNON, R. J., & BOND, J.S. (1986) *Am. J. Physiol: Cell Physiol.* **251**, C-141-152.
- 56.- BEYNON, R.J. & BOND, J.S. (eds.) (1989) en " *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* ". 277 págs. IRL Press, Oxford.
- 57.- BIBB, M.J., VAN ETIEN, R.A., WRIGHT, C.T., WALBERG, M.W. & CLAYTON, D.A. (1981) *Cell* **26**, 167-180.
- 58.- BISHOP, S.H. & GRISOLIA, S. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 344-348.
- 59.- BISHOP, T.R., HODES, Z.I., FRELIN, L.P. & BOYER, S.H. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 1775.
- 60.- BITAR, K.G., PEREZ-ARANDA, A. & BRADSHAW, R.A. (1980) *FEBS Lett.* **116**, 196-198.
- 61.- BLOXHAM, D.P., PARMELEE, D.C., KUMAR, S., WALSH, K.A. & TITAWI, K. (1982) *Biochemistry* **21**, 2028-2036.
- 62.- BOHLEY, P. (1987) en " *Hydrolytic Enzymes* " (Neuberger, A. & Brocklehurst, K., eds.), págs. 307-332. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 63.- BOHLEY, P., KOPITZ, J. & ADAM, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 307-310.
- 64.- BOHLEY, P. & RIEMANN, S. (1977) *Acta. Biol. Med. Ger.* **36**, 1823-1827.
- 65.- BOHLEY, P., WOLLERT, H.G., RIEMANN, D. & RIEMANN, S. (1981) *Acta Biol. Med. Ger.* **40**, 1655-1658.
- 66.- BÖHNI, P., GASSER, S., LEAVER, C. & SCHATZ, G. (1980) en " *The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome* ". (Kroon, A.M. & Saccone, C., eds), págs.. 423-433. Elsevier North-Holland, Amsterdam.

- 67.- BOND, J.S. & BUTLER, P.E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 333-364.
- 68.- BONNER, W.M. & LASKEY, R.A. (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.
- 69.- BOUILLARD, F., WEISSENBACH, J. & RICQUIER, D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1487-1490.
- 70.- BRAUN, T., BOBER, E., SINGH, S., AGARWAL, D.P. & GOEDDE, H.W. (1987) *FEBS Lett.* **215**, 233-236.
- 71.- BREEN, G.A.M., HOLMANS, P.L. & GARNETT, K.E. (1988) *Biochemistry* **27**, 3955-3961.
- 72.- BRIAND, P., CATHELINÉAU, L., KAMOUN, P., GIGOT, D. & PENNINCKZ, M. (1981) *FEBS Lett.* **130**, 65-68.
- 73.- BRIAND, P., FRANCOIS, B., RABIER, D. & CATHELINÉAU, L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **704**, 100-106.
- 74.- BRIAND, P., MIURA, S., MORI, M., CATHELINÉAU, L., KAMOUN, P. & TATIBANA, M. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* **760**, 389-397.
- 75.- BROWN, G.G. & SIMPSON, M.V. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3246-3250.
- 76.- BROWNER, M.F., TARONI, F., SZTUL, E. & ROSENBERG, L.E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12680-12685.
- 77.- BURNETT, G.H. & COHEN, P.P. (1957) *J. Biol. Chem.* **229**, 337-344.
- 78.- BUXTON, F.P., GWYNNE, D.I., GARVEN, S., SIBLEY, S. & DAVIES, R.W. (1987) *Gene* **60**, 255-266.
- 79.- CALI, J.J. & RUSSELL, D.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7774-7778.
- 80.- CARAVACA, J. & GRISOLIA, S. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 684-693.
- 81.- CAVARD, C., GRIMBER, G., DUBOIS, N., CHASSE, J.F., BENNOUM, M., MINET-THURIAUX, M., KAMOUN, P. & BRIAND, P. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 2099-2110.
- 82.- CERVERA, J. & LEVINE, R.L. (1988) *FASEB J.* **2**, 2591-2595.

- 83.- CHAMBERS, I., FRAMPTON, J., GOLDFARB, P., AFFARA, N., McBAIN, W. & HARRISON, P.R. (1986) *EMBO J.* **5**, 1221-1227.
- 84.- CHARETTE, M.F., HENDERSON, G.W. & MARKOVITZ, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4728-4732.
- 85.- CHAU, V., TOBIAS, J.W., BACHMAIR, A., MARRIOT, D., ECKER, D.J., GOUDA, D.K. & VARSHAVSKY, A. (1989) *Science* **243**, 1576-1583.
- 86.- CHEN, Z.-W., MUTT, V., BARROS-SOEDERLING, J. & JORNVALL, H. (1987) *FEBS Lett.* **226**, 43-46.
- 87.- CHIANG, H. L. & DICE, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **263**, 6797-6805.
- 88.- CHIANG, H.L., TERLECKY, S.R., PLANT, C.P. & DICE, J.F. (1989) *Science* **246**, 382-385.
- 89.- CHIN, D.T., CARLSON, N., KUEHL, L. & RECHSTEINER, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3883-3890.
- 90.- CHIN, D.T., GOFF, S.A., WEBSTER, T., SMITH, T. & GOLDBERG, A.L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11718-11728.
- 91.- CHU, T.W., GRANT, P.M. & STRAUSS, A.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12806-12811.
- 92.- CHU, T.W., GRANT, P.M. & STRAUSS, A.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15759-15764.
- 93.- CHU, T.W., EFTIME, R., SZTUL, E. & STRAUSS, A.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9552-9558.
- 94.- CIECHANOVER, A., FINLEY, D. & VARSHAVSKY, A. (1984) *Cell* **37**, 57-66.
- 95.- CIECHANOVER, A. & SCHWARTZ, A.L. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 483-488.
- 96.- CIECHANOVER, A. & SCHWARTZ, A.L. (1989) en " *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisóla, S., eds.), págs. 217-234. Springer International.
- 97.- CLARKE, S. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1118-1124.
- 98.- COHEN, N.S., CHEUNG, C.W., KYAN, F.S., JONES, E.E. & RAJMAN, L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6898-6907.

- 99.- COHEN, P.P. (1981) en " Current Topics in Cellular Regulation " (Horecker, B.L. & Stadtman, E.R., eds), Vol. 18, págs. 1-19. Academic Press.
- 100.- COHEN, P. P. & GRISOLIA, S. (1984) *Fed. Proc.* **7**, 150.
- 101.- COLLOT, M., WATTIAUX De CONINCK, S. & WATTIAUX, R. R. (1976) en " Biological Separations ", (Rickwood, D., ed.), págs. 89-96. Information Retrieval Ltd., London.
- 102.- COLUMBO, G. & MARCUS, F. (1974) *Biochemistry*. **13**, 3085-3091.
- 103.- CONBOY, J.G., FENTON, W.A. & ROSENBERG, L.E. (1982) *J. Biol. Chem.* **258**, 6667-6670.
- 104.- CONBOY, J.G., KALOUSEK, F. & ROSENBERG, L.E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5724-5727.
- 105.- CONBOY, J.G. & ROSENBERG, L.E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3073-3077.
- 106.- CRABEEL, M., HUYGEN, R., VERSCHUEREN, K., MESSENGUY, F., TINEL, K., CUNIN, R. & GLANSDORFF, N. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3139-3148.
- 107.- CRAIG, N.L. & ROBERTS, J.W. (1980) *Nature* **283**, 26-30.
- 108.- DAHLMANN, B., KOPP, F., KUEHN, L., NIEDEL, B., PFEIFER, G., HEGERL, R. & BAUMEISTER, W. (1989) *FEBS Lett.* **251**, 125-131.
- 109.- DAHLMANN, B., KUEHN, L. & REINHAUER, H. (1983) *FEBS Lett.* **160**, 243-247.
- 110.- DAVIES, K.J.A. & GOLDBERG, A.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8227-8234.
- 111.- DEAN, B. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **227**, 154-163.
- 112.- DEAN, R.T. (1975) *Nature* **257**, 414-416.
- 113.- DEAN, R.T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 604-609.
- 114.- DEAN, R.T. (1979) *Biochem. J.* **180**, 339-345.
- 115.- DEAN, R.T. (1980) en " Degradative Processes in Heart and Skeletal Muscle ", (Wildenthal, K., ed.), Vol. 1, págs. 3-30. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- 116.- DEAN, R.T. & BARRETT, A.J. (1976) *Essays Biochem.* **12**, 1-40.

- 117.- De BERNARD, B., GETZ, G.S. & RABINOWITZ, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **193**, 58-63.
- 118.- De DUVE, C. (1983) *Eur. J. Biochem.* **137**, 391-397.
- 119.- De DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. (1955) *Biochem. J.* **60**, 604-617.
- 120.- De MARS, R., Le VAN, S.L., TREND, B.L. & RUSSEL, L.B. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1693-1697.
- 121.- De MARTINIS, M.L., McINTYRE, P. & HOOGENRAAD, N.J. (1981) *Biochem. Int.* **3**, 371-378.
- 122.- De MARTINO, G.N. & GOLDBERG, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3712-3715.
- 123.- De MARTINO, G.N. (1983) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **15**, 17-29.
- 124.- De MARTINO, G.N. & GOLDBERG, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3712-3715.
- 125.- DeMARTINO, G.N., McGUIRE, M.J, RECKELHOFF, J.F., McCULLOUGH, M.L. & CROALL, D.E. (1989) en " *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolia, S., eds.), págs. 181-196. Springer International.
- 126.- De MEIRLEIR, L., MACKAY, N., WAH, A.M.L.H. & ROBINSON, B.H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1991-1995.
- 127.- DESAUTELS, M. & GOLDBERG, A.L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11673-11679.
- 128.- DESHAIES, R.J., KOCK, B.D., WERNER-WASHBURNE, M., CRAIG, E.A. & SCHEKMAN, R. (1988) *Nature* **332**, 800-805.
- 129.- DETER, R.L. & De DUVE, C. (1967) *J. Cell. Biol.* **33**, 437-449.
- 130.- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P. & SMITHIES, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- 131.- DICE, J.F. (1987) *FASEB J.* **1**, 349-357.
- 132.- DICE, J.F. & CHIANG, H.L. (1989) en " *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolia, S., eds.), págs. 13-34. Springer International.
- 133.- DICE, J.F., DEHLINGER, P.J. & SCHIMKE, R.T. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 4220-4228.

- 134.- DICE, J.F. & GOLDBERG, A.L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3893-3897.
- 135.- DICE, J.F., HESS, E.J. & GOLDBERG, A.L. (1979) *Biochem. J.* **178**, 305-312.
- 136.- DOBSON, D.E., GROVES, D.L. & SPIEGELMAN, B.M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1804-1809.
- 137.- DOONAN, S., MARTINI, F., ANGELACCIO, S., PASCARELLA, S., BARRA, D. & BOSSA, F. (1986) *J. Mol. Evol.* **23**, 328-335.
- 138.- DRISCOLL, J. & GOLDBERG, A.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 787-791.
- 139.- DRISCOLL, J. & GOLDBERG, A.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4789-4792.
- 140.- DROSTE, M., SCHON, E. & KADENBACH, B. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4375.
- 141.- DRUYAN, R., De BERNARD, B. & RABINOWITZ, M. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 5874-5878.
- 142.- DUBIEL, W., DRUNG, I., MÜLLER, M. & RAPOPORT, S.M. (1989) *FEBS Lett.* **250**, 289-292.
- 143.- DUBOIS, N., CAVARD, C., CHASSE, J.F., KAMOUN, P. & BRIAND, P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **950**, 321-328.
- 144.- DUCEMAN, B. & WANG, A.M. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 10391.
- 145.- DUPUIS, A., SKEHEL, J.M. & WALKER, J.E. (1991) *Biochemistry* **30**, 2954-2960.
- 146.- DUQUE-MAGALHAES, M.C. (1979) *FEBS Lett.* **105**, 317-320.
- 147.- DUQUE-MAGALHAES, M.C. (1989) en " *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolia, S., eds.), Vol. 2, págs. 475-490. Springer International.
- 148.- DUQUE-MAGALHAES, M.C. & MENESES FERREIRA, R. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 106-112.
- 149.- DUQUE-MAGALHAES, M.C. & REGNIER, P. (1982) *Biochimie* **64**, 907-913.
- 150.- DYER, M.R., GAY, N.J., POWELL, S.J. & WALKER, J.E. (1989) *Biochemistry* **28**, 3670-3680.
- 151.- EISENSTEIN, E., OSBORNE, J.C.Jr., CHAIKEN, I.M. & HENSLEY, P. (1983) *J. Biol. Chem.* **259**, 5139-5145.

- 152.- ENGWALL, E.(1980) *Meth. Enzymol.* **70**, 419-439.
- 153.- ETLINGER, J.D. & GOLDBERG, A.L. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**, 54-58.
- 154.- ETLINGER, J.D., GU, M., LI, X., WEITMAN, D. & RIEDER, R.F. (1989) en " *Current Trends in The Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolia, S., eds.), págs. 197-216. Springer International.
- 155.- ETLINGER, J.D., McMULLEN, H., RIEDER, R.F., IBRAHIM, A., JANEZCKO, R.A. & MAMORSTEIN, S. (1985) en " *Intracellular Protein catabolism* ", (Khairallah, E.A., Bond, J.S. & Bird, J.W.C., eds.), págs. 47-60. Alan R. Liss Inc., New York.
- 156.- EYTAN, E., GANOTH, D., ARMON, T. & HERSHKO, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7751-7755.
- 157.- FABRIZI, G.M., RIZZUTO, R., NAKASE, H., MITA, S., KADENBACH, B. & SCHON, E.A. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6409.
- 158.- FABRIZI, G.M., RIZZUTO, R., NAKASE, H., MITA, S., LOMAX, M.I., GROSSMAN, L.I. & SCHON, E.A. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 7107.
- 159.- FAGAN, J.M. & WAXMAN, L. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 17868-17872.
- 160.- FAGAN, J.M., WAXMAN, L. & GOLDBERG, A.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5705-5713.
- 161.- FALKENBURG, P.E., HAAS, C., KLOETZEL, P.M., NIEDEL, B., KOPP, E., KUEHN, L. & DAHLMANN, B. (1988) *Nature* **331**, 190-192.
- 162.- FARRELL, L.B. & NAGLEY, P. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1257-1264.
- 163.- FARRES, J., GUAN, K.L. & WEINER, H. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 67-74.
- 164.- FAULK, W.P. & TAYLOR, G.M. (1971) *Immunochemistry.* **8**, 1081-1083.
- 165.- FEARNLEY, I.M., RUNSWICK, M.J. & WALKER, J.E. (1989) *EMBO J.* **8**, 665-672.
- 166.- FERBER, S. & CIECHANOVER, A. (1987) *Nature* **326**, 808-811.
- 167.- FERDINAND, W., BARTLEY, W. & BROOMHEAD, V.M. (1973) *Biochem. J.* **134**, 431-436.

- 168.- FERREIRA, G.C., PRATT, R.D. & PEDERSEN, P.L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15628-15633.
- 169.- FIRGAIRA, F.A., HENDRICK, J.P., KALOUSEK, F., KRAUS, J.P. & ROSENBERG, L.E. (1984) *Science* **226**, 1319-1322.
- 170.- FISCHER, E. (1894) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **27**, 2985-2987.
- 171.- FLETCHER, M.J. & SANADI, D. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 356-360.
- 172.- FLORKIN, M. (1975) en " *Comprehensive Biochemistry* ", (Florkin, M. & Stotz, E.H., eds.), Vol. 33B, págs. 33-52. Elsevier, Amsterdam.
- 173.- FRENS, G. (1973) *Nature Phys. Sci.* **241**, 20-22.
- 174.- FRIED, V.A., SMITH, H.T., HILDEBRANDT, E. & WEINER, K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3685-3689.
- 175.- FUJIWARA, T., TANAKA, K., ORINO, E., YOSHIMURA, T., KUMATORI, A., TAMURA, T., CHUNG, C.H., NAKAI, T., YAMAGUCHI, K., SHIN, S., KAKIZUKA, A., NAKANISHI, S. & ICHIHARA, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16604-16613.
- 176.- FUKAO, T., KAMIJO, K., OSUMI, T., FUJIKI, Y., YAMAGUCHI, S., ORII, T. & HASHIMOTO, T. (1989) *J. Biochem.* **106**, 197-204.
- 177.- FUKAO, T., YAMAGUCHI, S., KANO, M., ORII, T., FUJIKI, Y., OSUMI, T. & HASHIMOTO, T. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 2086-2092.
- 178.- GAASBEEK JANZEN, J.W., LAMERS, W.H., MOORMAN, A.F.M., De GRAAF, A., LOS, J.A. & CHARLES, R. (1984) *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 557-564.
- 179.- GAASBEEK JANZEN, J.W., MOORMAN, A.F.M., LAMERS, W.H. & CHARLES, R. (1985) *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 1205-1211.
- 180.- GADALETA, G., PEPE, G., De CANDIA, G., QUAGLIANIello, C., SBISA, E. & SACCONI, C. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 6233.
- 181.- GADALETA, G., PEPE, G., De CANDIA, G., QUAGLIARIello, C., SBISA, E. & SACCONI, C. (1989) *J. Mol. Evol.* **28**, 497-516.
- 182.- GAMBLE, J.G. & LEHNINGER, A.L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 610-618.

- 183.- GANOTH, D., LESHINSKY, E., EYTAN, E. & HERSHKO, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **263**, 12412-12419.
- 184.- GARBOCZI, D.N., FOX, A.H., GERRING, S.L. & PEDERSEN, P.L. (1988) *Biochemistry* **27**, 553-560.
- 185.- GAVEL, Y. & Von HEIJNE, G. (1990) *Protein Eng.* **3**, 433-442.
- 186.- GAY, N.J. & WALKER, J.E. (1985) *EMBO J.* **4**, 3519-3524.
- 187.- GEAR, A.R.L., ALBERT, A. & BEDNAREK, J.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 6495-6504.
- 188.- GEOGHEGAN, W.O. & ACKERMAN, G.A. (1977) *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 1187-1200.
- 189.- GERSHWIN, M.E., MACKAY, I.R., STURGESS, A. & COPPEL, R.L. (1987) *J. Immunol.* **138**, 3525-3531.
- 190.- GHODA, L., VAN DAALLEN WETTERS, T., MACRAE, M., ASCHERMAN, D. & COFFINO, P. (1989) *Science* **243**, 1493-1495.
- 191.- GIGOT, D., GLANSDORFF, N., LEGRAIN, C., PIERARD, A., STALON, V., KONIGSBERG, W., CAPLIER, I., STROSBERG, A.D. & HERVE, G. (1977) *FEBS Lett.* **81**, 28-32.
- 192.- GILLESPIE, L.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 7939-7942.
- 193.- GILLESPIE, L.L., ARGAN, C., TANEJA, A.P., HODGES, R.S., FREEMAN, K.B. & SHORE, G.C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 16045-16048.
- 194.- GLASGOW, A.M. (1985) en "Reye's Syndrome IV", (Pollack, J.D., ed.), págs. 142-152. The National Reye's Syndrome Foundation, Ohio.
- 195.- GLASS, R.G. & DOYLE, D. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5234-5242.
- 196.- GLAUMANN, H. & BALLARD, F.J. (eds.) (1986) "Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown". Academic Press, New York.
- 197.- GLAUMANN, H., ERICSSON, J.L.E. & MARZELLA, L. (1981) *Int. Rev. Cytol.* **73**, 149-182.
- 198.- GOLDBERG, A.L. & DICE, J.F. (1974) *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 835-869.
- 199.- GOLDBERG, A.L. & St. JOHN, A.C. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 747-803.

- 200.- GOLDBERG, A.L., VOELLMY, R., CHUNG, C.H., MENON, A.S. & DESAUTELS, M. (1985) en " Intracellular Protein Catabolism ", ( Khairallah, E.A., Bond, J.S. & Bird, J.W.C., eds.), págs. 33-45. Alan R. Liss, New York.
- 201.- GOODNO, C.C.(1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2620-2624.
- 202.- GONZALEZ-BOSCH, C., MIRALLES, V.J., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 1318-1323.
- 203.- GONZALEZ-BOSCH, C., MIRALLES, V.J., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 21-26.
- 204.- GOTO, Y., AMURO, N. & OKAZAKI, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6388.
- 205.- GOTTESMAN, S. (1989) *Annu. Rev. Genet.* **23**, 163-198.
- 206.- GOTTESMAN, S., CLARK, W.P. & MAURIZI, M.R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7886-7893.
- 207.- GOTTESMAN, S., SQUIRES, C., PICHERSKY, E., CARRINGTON, M., HOBBS, M., MATTICK, J.S., DALRYMPLE, B., KURAMITSU, H., SHIROZA, T., FOSTER, T., CLARK, W.P., ROSS, W., SQUIRES, C.L. & MAURIZI, M.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3513-3517.
- 208.- GOUDA, D.K., BACHMAIR, A., WÜNNING, I., TOBIAS, J.W., LANE, W.S. & VARSHAVSKY, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16700-16712.
- 209.- GOULD, S.J., KELLER, G. & SUBRAMANI, S. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 897-905.
- 210.- GRAF, L., LINGELBACH, K.R. & HOOGENRAAD, N.J. (1988) *Protein Engineering* **2**, 297-300.
- 211.- GRANT, P.M., TELLAM, J., MAY, V.L. & STRAUSS, A.W. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 6053-6066.
- 212.- GREEN, M.C. (1966) en " Biology of the Laboratory Mouse ", (Green, E.L. ed), 2ª edición 116 págs. McGraw-Hill, New-York.
- 213.- GREENBAUN, L.M. & FRUTON, J.S. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 173-180.
- 214.- GRIFFIN, T.A., LAU, K.S. & CHUANG, D.T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14008-14014.
- 215.- GRINDE, B. (1985) *Experientia* **41**, 1089-1095.

- 216.- GRINDE, B. & SEGLEN, P.O. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **632**, 73-86.
- 217.- GRISOLIA, S. (1964) *Physiol. Rev.* **44**, 657-712.
- 218.- GRISOLIA, S. & COHEN, P.P. (1948) *J. Biol. Chem.* **174**, 389-390.
- 219.- GRISOLIA, S. & COHEN, P.P. (1948) *J. Biol. Chem.* **176**, 929-933.
- 220.- GRISOLIA, S. & COHEN, P.P. (1952) *J. Biol. Chem.* **198**, 561-571.
- 221.- GRISOLIA, S. & HARMON, P. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 482-483.
- 222.- GRISOLIA, S., HERNANDEZ-YAGO, J. & KNECHT, E. (1985) *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 387-396.
- 223.- GRISOLIA, S. & HOOD, W. (1972) en " *Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells*, (Kun, E. & Grisolia, S., eds.), págs. 137-203 Wiley Interscience, New York.
- 224.- GRISOLIA, S., KNECHT, E., HERNANDEZ-YAGO, J. & WALLACE, R. (1980) en " *Protein Degradation in Health and Disease* ". CIBA Foundation Symposium 75 (New Series), (Evered, D. & Welan, J., eds.), págs. 167-188. Excerpta Medica, Amsterdam.
- 225.- GRISOLIA, S., KORITZ, S.B. & COHEN, P.P. (1951) *J. Biol. Chem.* **191**, 181-187.
- 226.- GRISOLIA, S. & MARSHALL, R.O. (1955) en " *A. Symposium on Amino Acid Metabolism* ", (McElroy, W.D., & Glass, B. eds.), págs. 258-276. Johns Hopkins, Baltimore.
- 227.- GRISOLIA, S. & RUBIO, V. (1986) en " *Bioquímica y Biología Molecular* ", (Ochoa, S., Leloir, L.F., Oró, J. & Sols, A., eds.), pág. 174. Salvat Ed., Barcelona.
- 228.- GRISOLIA, S., TIMONEDA, J., HERNANDEZ-YAGO, J., SOLER, J., De ARRIAGA, M.D. & WALLACE, R. (1981) *Acta Biol. Med. Ger.* **49**, 1407-1418.
- 229.- GRISOLIA, S. & WHEATLEY, D. N. (1984) *Life Chemistry Reports* **2**, 257-297.
- 230.- GRONOSTAJSKI, R.M., PARDEE, A.B. & GOLDBERG, A.L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3344-3349.
- 231.- GROPPER, R., BRANDT, A., ELIAS, S., BEARER, C.F., MAYER, A., SCHWARTZ, A.L. & CIECHANOVER, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3602-3610.

- 232.- GROSS, N.J., GETZ, G.S. & RABINOWITZ, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 1552-1556.
- 233.- GUMUCIO, J.J. & MILLER, D.L. (1982) en " *The Liver: Biology and Pathobiology* ", (Arias, I., Popper, H., Schachter, D. & Shafritz, D.A., eds.), págs. 647-661. Raven Press, New York.
- 234.- GUNZLER, W.A., STEFFENS, G.J., GROSSMANN, A., KIM, S.M.A., OTTING, F., WENDEL, A. & FLOHE, L. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 195-212.
- 235.- HAAN, E.A., DANKS, D.M., HOOGENRAAD, N.J. & ROGERS, J. (1979) *Aust. Pediatr. J.* **15**, 142-146.
- 236.- HAAS, A.L., MURPHY, K.E. & BRIGHT, P.M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 4694-4703.
- 237.- HAAS, A.L., REBACK, P.M., PRATT, G. & RECHSTEINER, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21664-21669.
- 238.- HAAS, R.C., HEINRICH, P.C. & SASSE, D. (1979) *FEBS Lett.* **103**, 168-171.
- 239.- HAAS, R.C., KORENFELD, C., ZHANG, Z., PERRYMAN, B., ROMAN, D. & STRAUSS, A.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2890-2897.
- 240.- HAAS, R.C. & STRAUSS, A.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6921-6927.
- 241.- HAMANO, Y., KODAMA, H., YANAGISAWA, M., HARAGUCHI, Y., MORI, M. & YOKOTA, S. (1988) *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 29-35.
- 242.- HARE, J.F. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 1206-1215.
- 243.- HARE, J.F. & HODGES, R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3575-3588.
- 244.- HARE, J.F. & HODGES, R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12950-12953.
- 245.- HASS, C., PESSOLD-HURT, B., MULTHAMP, G., BEYRENTHER, K. & KLOETZEL, P.M. (1989) *EMBO J.* **8**, 2373-2379.
- 246.- HATA, A., SETOYAMA, C., SHIMADA, K., TAKEDA, E., KURODA, Y., AKABOSHI, I. & MATSUDA, I. (1989) *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 123-127.
- 247.- HATA, A., TSUZUKI, T., SHIMADA, K., TAKIGUCHI, M., MORI, M. & MATSUDA, I. (1988) *J. Biol. Chem.* **103**, 302-308.

- 248.- HÄUSINGER, D. (1983) *Eur. J. Biochem.* **133**, 269-275.
- 249.- HAWLITSCHKEK, G., SCHREIDER, H., SCHMIDT, B., TROPSCHUNG, N., HARTL, F.-U. & NEUPERT, W. (1988) *Cell* **53**, 795-806.
- 250.- HAYASHI, M., HIROI, Y. & NATORI, Y. (1973) *Nature (London) New Biol.* **242**, 163-166.
- 251.- HEINEMEYER, W., KLEINSCHMIDT, J.A., SAIDOWSKY, J., ESCHER, C. & WOLF, D.H. (1991) *EMBO J.* **10**, 555-562.
- 252.- HEINRICH, P.C., RAYDT, G., PUSCHENDORF, B. & JUSIK, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* **62**, 37-43.
- 253.- HENDRICK, J.P., HODGES, P.E. & ROSENBERG, L.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4056-4060.
- 254.- HENNING, R., PLATTNER, H. & STOFFEL, W. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **330**, 61-75.
- 255.- HENNING, W.D., UPTON, C., McFADDEN, G., MAJUMDAR, R. & BRIDGER, W.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1432-1436.
- 256.- HERBST, R.S., FRIEDMAN, N., DARNELL, J.E. & BABISS, L.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1553-1557.
- 257.- HERSHKO, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15237-15240.
- 258.- HERSHKO, A. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 265-268.
- 259.- HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 335-364.
- 260.- HERSHKO, A., EYTAN, E. & CIECHANOVER, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13964-13970.
- 261.- HO, Y., HOWARD, A.J. & CRAPO, J.D. (1988) *Nucleic. Acids. Res.* **16**, 5207.
- 262.- HODGES, P.E. & ROSENBERG, L.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4142-4146.
- 263.- HOLZER, H., BETZ, H. & EBNER, E. (1975) *Curr. Top. Cell. Regul.* **9**, 103-156.
- 264.- HOLZER, H. & HEINRICH, P.C. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 63-91.

- 265.- HOOGENRAAD, N.J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **188**, 137-144.
- 266.- HOOGENRAAD, N.J., De MARTINIS, M.L. & DANKS, D.M. (1983) *J. Inher. Metab. Dis.* **6**, 149-152.
- 267.- HOOGENRAAD, N.J., SUTHERLAND, J.M. & HOWLETT, G.J. (1980) *Analytical Biochem.* **101**, 97-102.
- 268.- HOPGOOD, M.F., CLARK, M.G. & BALLARD, F.J. (1977) *Biochem. J.* **164**, 399-407.
- 269.- HORWICH, A.L., FENTON, W.A., WILLIAMS, K.R., KALOUSEK, F., KRAUS, J.P., DOOLITTLE, R.F., KONIGSBERG, W. & ROSENBERG, L.E. (1984) *Science* **224**, 1068-1074.
- 270.- HORWICH, A.L., KALOUSEK, F., FENTON, W.A., POLLOCK, R.A. & ROSENBERG, L.E. (1986) *Cell* **44**, 451-459.
- 271.- HORWICH, A.L., KALOUSEK, F., FENTON, W.A., FURTAK, K., POLLOCK, R.A. & ROSENBERG, L.E. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 669-677.
- 272.- HOSOKAWA, Y., SUZUKI, H., TODA, H., NISHIKIMI, M. & OZAWA, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13483-13488.
- 273.- HOUGH, R., PRATT, G. & RECHSTEINER, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2400-2408.
- 274.- HOUGH, R., PRATT, G. & RECHSTEINER, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8303-8313.
- 275.- HSIA, Y.E. (1974) *Gastroenterology* **67**, 347-374.
- 276.- HSU, L.C., BENDEL, R.E. & YOSHIDA, A. (1988) *Genomics* **2**, 57-65.
- 277.- HUISMAN, W., BOUMA, J.M.W. & GRUBER, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 93-97.
- 278.- HUISMAN, W., BOUMA, J.M.W. & GRUBER, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 98-109.
- 279.- HUISMAN, W., BOUMA, J.M.W. & GRUBER, M. (1974) *Nature* **240**, 428-429.
- 280.- HUISMAN, W., LANTING, L., BOUMA, J.M.W. & GRUBER, M. (1974) *FEBS Lett.* **45**, 129-131.
- 281.- HUISMAN, W., LANTING, L., DODDEMA, H.J., BOUMA, J.M.W. & GRUBER, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **370**, 297-307.

- 282.- HWANG, B.J., WOO, K.N., GOLDBERG, A.L. & CHUNG, C.H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8727-8734.
- 283.- INANA, G., TOTSUKA, S., REDMOND, M., DOUGHERTY, T., NAGLE, J., SHIONO, T., OHURA, T., KOMINAMI, E. & KATUNUMA, N. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1203-1207.
- 284.- ISAYA, G., FENTON, W.A., HENDRICK, J.P., FURTACK, K., KALOUSEK, F. & ROSENBERG, L.E. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5150-5158.
- 285.- ISMAIL, F. & GEVERS, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 399-408.
- 286.- ITO, A., KUWAHARA, T., INADOME, S. & SAGARA, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 970-976.
- 287.- ITOH, Y., SOLDATI, L., STALON, V., FALMAGNE, P., TERAWAKI, Y., LEISINGER, T. & HAAS, D. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 2725-2734.
- 288.- JANSEN, R., KALOUSEK, F., FENTON, W.A., ROSENBERG, L.E. & LEDLEY, F.D. (1989) *Genomics* **4**, 198-205.
- 289.- JAVED, A.A., OGATA, K. & SANADI, D.R. (1991) *Gene* **97**, 307-310.
- 290.- JENTSCH, S., McGRATH, J.P. & VARSHAVSKY, A. (1987) *Nature* **338**, 394-401.
- 291.- JENTSCH, S., McGRATH, J.P. & VARSHAVSKY, A. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **329**, 131-134.
- 292.- JOHANSSON, J., Von BAHR-LINDSTROEM, H., JECK, R., WOENCKHAUS, C. & JOERNVALL, H. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172**, 527-533.
- 293.- JOHNSON, L.V., WALSH, M.L. & CHEN, L.B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 990-994.
- 294.- JOH, T., TAKESHIMA, H., TSUZUKI, T., SHIMADA, K., TANASE, S. & MORINO, Y. (1987) *Biochemistry* **26**, 2515-2520.
- 295.- JONES, M.E., SPECTOR, L. & LIPMANN, F. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 819-820.
- 296.- JONES, S.N., GROMPE, M., MUNIR, M.I., VERES, G., CRAIGEN, W.J. & CASKEY, C.T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14684-14690.
- 297.- JULLIARD, J.H. & SMITH, E.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3427-3438.

- 298.- JUNGERMAN, K. & KATZ, N. (1982) en " Metabolic Compartmentation ", (Sies, H., ed.), págs. 410-435. Academic Press, New York.
- 299.- JUNGERMANN, K. & SASSE, D. (1978) Trends Biochem. Sci. 3, 198-202.
- 300.- KADENBACH, B., STROH, A., BECKER, A., ECKERSORN, C. & LOTTSPEICH, F. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1015, 368-372.
- 301.- KALOUSEK, F., FRANCOIS, B. & ROSENBERG, L.E. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3939-3944.
- 302.- KALOUSEK, F., HENDRICK, J.P. & ROSENBERG, L.E. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7536-7540.
- 303.- KALOUSEK, F., ORSULAK, M.D. & ROSENBERG, L.E. (1984) J. Biol. Chem. 259, 5392-5395.
- 304.- KAWAMOTO, T., MITSUUCHI, Y., TODA, K., MIYAHARA, K., YOKOYAMA, Y., NAKAO, K., HOSODA, K., YAMAMOTO, Y., IMURA, H. & SHIZUTA, Y. (1990) FEBS Lett. 269, 345-349.
- 305.- KAY, J., BOND, J.S. & KATUNUMA, N. (eds.) (1990) ICOP Newsletters January 1-6.
- 306.- KAY, J., BOND, J.S. & KATUNUMA, N. (eds.) (1990) ICOP Newsletters August 1-6.
- 307.- KAY, J., BOND, J.S. & KATUNUMA, N. (eds.) (1991) ICOP Newsletters January 1-8.
- 308.- KAY, J., BOND, J.S. & KATUNUMA, N. (eds.) (1991) ICOP Newsletters August 1-8.
- 309.- KEEGSTRA, K. (1989) Cell 56, 247-253.
- 310.- KELLY, D.P., KIM, J.J., BILLADELLO, J.J., HAINLINE, B.E., CHU, T.W. & STRAUSS, A.W. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4068-4072.
- 311.- KEMPE, T.D., SWYRYD, E.A., BRUIST, M. & STARK, G.R. (1976) Cell 9, 541-550.
- 312.- KHAIRALLAH, E.A., BOND, J.S. & BIRD, J.W.C. (eds.) (1985) " Intracellular Protein Catabolism ". Alan R. Liss Inc., New York.
- 313.- KIM, K.H., PAN, Z., HONCATKO, R.B., KE, H.-M. & LIPSCOMB, W.N. (1987) J. Mol. Biol. 196, 853-875.

- 314.- KIMMICH, G.A., RANGLES, J. & BRAND, J.S. (1975) *Anal. Biochem.* **69**, 187-206.
- 315.- KING, K.S. & FRIEDEN, C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 4391-4396.
- 316.- KINSELLA, B.T. & DOONAN, S. (1986) *Biosci. Rep.* **6**, 921-929.
- 317.- KIRSCHKE, H., LANGER, J., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. & BOHLEY, P. (1977) *Eur. J. Biochem.* **74**, 293-301.
- 318.- KISHI, F., TANIZAWA, Y. & NAKAZAWA, A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11785-11789.
- 319.- KITA, K., OYA, H., GENNIS, R.B., ACKRELL, B.A.C. & KASAHARA, M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 101-108.
- 320.- KLECZKOWSKI, K. & COHEN, P.P. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 271-278.
- 321.- KLEENE, K.C., SMITH, J., BOZORGZADEH, A., HARRIS, M., HAHN, L., KARIMPOUR, I. & GERSTEL, J. (1990) *Dev. Biol.* **137**, 395-402.
- 322.- KLEIBER, J., KALOUSEK, F., SWAROOP, M. & ROSENBERG, L.E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7978-7982.
- 323.- KLEMPERER, N.S. & PICKART, C.M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19245-19252.
- 324.- KLOETZEL, P.M., KUEHN, L. & DAHLMANN, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 225-232.
- 325.- KNECHT, E. & GRISOLIA, S. (eds.) (1989) en " Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation ", Vols. I y II. Springer International.
- 326.- KNECHT, E. & HERNANDEZ-YAGO, J. (1978) *Cell Tissue Res.* **193**, 473-489.
- 327.- KNECHT, E., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1984) *Histochemistry* **80**, 359-362.
- 328.- KNECHT, E., HERNANDEZ-YAGO, J., MARTINEZ-RAMON, A. & GRISOLIA, S. (1980) *Exp. Cell Res.* **125**, 191-199.
- 329.- KNECHT, E., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1984) *Exp. Cell Res.* **154**, 224-232.
- 330.- KNECHT, E., MARTINEZ-RAMON, A. & GRISOLIA, S. (1986) *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 913-922.

- 331.- KNECHT, E., ROCHE, E., HERNANDEZ-YAGO, J., VARGAS, J.L. & GRISOLIA, S. (1986) *Biomed. Biochem. Acta* **45**, 1575-1583.
- 332.- KNOWLES, S.E. & BALLARD, F.J. (1976) *Biochem. J.* **156**, 609-617.
- 333.- KOBAYASHI, K., KAMIMURA, T. & TUBOI, S. (1982) *J. Biochem.* **91**, 1511-1518.
- 334.- KOENING, H. (1969) en " *Lysosomes in Biology and Pathology* " (Dingle, J.T. & Fell, H.B., eds.), Vol. 2, págs. 111-162. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 335.- KOGA, Y., FABRIZI, G.M., MITA, S., ARNAUDO, E., LOMAX, M.I., AQUA, M.S., GROSSMAN, L.I. & SCHON, E.A. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 684.
- 336.- KOIKE, K., OHTA, S.; URATA, Y., KAGAWA, Y. & KOIKE, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 41-45.
- 337.- KOIKE, K., KOBAYASHI, M., YAGINUMA, K., TAIRA, M., YOSHIDA, E. & IMAI, M. (1982) *Gene* **20**, 177-185.
- 338.- KOSHLAND, D.E. (1960) en " *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* ", (Meister, A., ed.), Vol. 22, págs. 45-98. John Wiley, New York.
- 339.- KOVACS, A.L., REITH, A. & SEGLEN, P.O. (1982) *Exp. Cell Res.* **137**, 191-201.
- 340.- KOZAK, L.P., BRITTON, J.H., KOZAK, U.C. & WELLS, J.M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12274-12277.
- 341.- KRAEUSSLICH, H.G. & WIMMER, E. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701-754.
- 342.- KRAUS, J.P., CONBOY, J.G. & ROSENBERG, L.E. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 10739-10742.
- 343.- KRAUS, J.P., FIRGAIRA, F., NOVOTNY, J., KALOUSEK, F., WILLIAMS, K.R., WILLIAMSON, C., OHURA, T. & ROSENBERG, L.E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8049-8053.
- 344.- KRAUS, J.P., HODGES, P.E., WILLIAMSON, C.L., HORWICH, A.L., KALOUSEK, F., WILLIAMS, K.R. & ROSENBERG, L.E. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 943-952.
- 345.- KRAUS, J.P., NOVOTNY, J., KALOUSEK, F., SWAROOP, M. & ROSENBERG, L.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8905-8909.

- 346.- KREBS, H.A., HEMS, R. & LUND, P. (1973) *Adv. Enz. Regul.* **11**, 361-377.
- 347.- KULKA, R.G., RABOY, B., SCHUSTER, R., PARAG, H.A., DIAMOND, G., CIECHANOVER, A. & MARCUS, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15726-15731.
- 348.- KUO, L.C., MILLER, A.W., LEE, S. & KOZUMA, C. (1988) *Biochemistry* **27**, 8823-8832.
- 349.- KUO, L. C., ZAMBIDIS, I. & CARON, C. (1989) *Science* **245**, 522-524.
- 350.- KUWAHARA, T., TAKAMOTO, S. & ITO, A. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 253-257.
- 351.- LAEMMLI, W.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- 352.- LAMERS, W.H., GAASBEEK JANZEN, J.W., MOORMAN, A.F.M., CHARLES, R., KNECHT, E., MARTINEZ-RAMON, A., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1988) *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 41-47.
- 353.- LAMHONWAH, A.M., MAHURAN, D. & GRAVEL, R.A. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4396.
- 354.- LANGONE, J.J. (1982) *Adv. Immunol.* **32**, 157-252.
- 355.- LAU, K.S., GRIFFIN, T.A., HU, C.-W.C. & CHUANG, D.T. (1988) *Biochemistry* **27**, 1972-1981.
- 356.- LAUMAS, S., ABDEL-GHANY, M., LEISTER, K., RESNICK, R., KANDRACH, A. & RACKER, E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3021-3025.
- 357.- LEDERER, F., GHRIR, R., GUIARD, B., CORTIAL, S. & ITO, A. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 95-102.
- 358.- LEE, J.H., GARBOCZI, D.N., THOMAS, P.J. & PEDERSEN, P.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4664-4669.
- 359.- LEGRAIN, C. & STALON, V. (1976) *Eur. J. Biochem.* **63**, 289-301.
- 360.- LENNEY, J.F. (1980) *Curr. Top. Cell. Regul.* **17**, 25-57.
- 361.- LEVIN, D.E. & BISHOP, J.M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8272-8276.
- 362.- LEVINE, R.L. (1985) *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 305-316.
- 363.- LIBBY, P. & GOLDBERG, A.L. (1978) *Science* **199**, 534-536.

- 364.- LIGHTOWLERS, R.N. & CAPALDI, R.A. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 5845.
- 365.- LIGHTOWLERS, R.N., EWART, G.D., AGGELER, R.J., ZHANG, Y.-Z., CALAVETTA, L. & CAPALDI, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2677-2681.
- 366.- LIGHTOWLERS, R.N., TAKAMIYA, S., WESSLING, R., LINDORFER, M. & CAPALDI, R.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16858-16861.
- 367.- LIMBACH, K.J. & WU, R. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 617-630.
- 368.- LINDROS, K.O., BENGTSSON, G., SALUSPURO, M. & VÄANÄNEN, H. (1986) en " Regulation of Hepatic Metabolism ", (Thurman, R.G., Kauffman, F.C. & Jungermann, K., eds.), págs. 137-158. Plenum Publishing Corporation, New York.
- 369.- LINGELBACH, K.R., GRAF, L.J., DUNN, A.R. & HOOGENRAAD, N.J. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 19-23.
- 370.- LIPSKY, N.G. & PEDERSEN, P.L. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8652-8657.
- 371.- LOEBER, G., INFANTE, A.A., MAURER-FOGY, I., KRYSSTEK, E. & DWORKIN, M.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3016-3021.
- 372.- LOMAX, M.I., WELCH, M.D., DARRAS, B.T., FRANCKE, U. & GROSSMAN, L.I. (1990) *Gene* **86**, 209-216.
- 373.- LOPEZ-CASILLAS, F., BAI, D.H., LUO, X., KONG, I.S., HERMODSON, M.A. & KIM, K.H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5784-5788.
- 374.- LOVAAS, E. (1974) *FEBS Lett.* **45**, 244-247.
- 375.- LUSTY, C.J., JILKA, R.L. & NIETSH, E.H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10030-10036.
- 376.- LUZIKOV, V.M., MAKHLIS, T.A. & GALKIM, A.V. (1976) *FEBS Lett.* **69**, 108-110.
- 377.- MAILE, R.J., FISCHESSE, G.J. & ANDERSON, M.M. (1977) *J. Chromatogr.* **132**, 366-368.
- 378.- MANJUNATH, C.K., PADMANABAN, G. & CAMA, H.R. (1979) *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2929-2934.

- 379.- MARSHALL, M. (1976) en " The Urea Cycle ", (Grisolfa, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.), págs. 169-179. John Wiley & Sons, New York.
- 380.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1641-1653.
- 381.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1654-1668.
- 382.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1669-1682.
- 383.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4276-4286.
- 384.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7287-7290.
- 385.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7291-7295.
- 386.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7296-7300.
- 387.- MARSHALL, M. & COHEN, P.P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7301-7305.
- 388.- MARTIN, F., HIREL, B. & GADAL, P. (1983) *Z. Pflanzenphysiol.* **111**, 413-422.
- 389.- MARTINI, F., ANGELACCIO, S., BARRA, D., PASCARELLA, S., MARAS, B., DOONAN, S. & BOSSA, F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 46-51.
- 390.- MARZELLA, L. & GLAUMANN, H. (1983) *Int. Rev. Exp. Pathol.* **25**, 239-277.
- 391.- MATSUBARA, H. & SMITH, E.L. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 2732-2753.
- 392.- MATSUBARA, Y., INDO, Y., NAITO, E., OZASA, H., GLASSBERG, R., VOCKLEY, J., IKEDA, Y., KRAUS, J. & TANAKA, K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16321-16331.
- 393.- MATSUBARA, Y., KRAUS, J.P., OZASA, H., GLASSBERG, R., FINOCCHIARO, G., IKEDA, Y., MOLE, J., ROSENBERG, L.E. & TANAKA, K. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 10104-10108.
- 394.- MATTINGLY, J.R.Jr., RODRIGUEZ-BERROCAL, F.J., GORDON, J., IRIARTE, A. & MARTINEZ-CARRION, M. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 859-865.
- 395.- MATTO, A.K., HOFFMAN-FALK, H., MARDER, J.B. & EDELMAN, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1380-1384.

- 396.- MAURIZI, M.R., CLARK, W.P., KATAYAMA, Y., RUDIKOFF, S., PUMPHREY, J., BOWERS, B. & GOTTESMAN, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12536-12545.
- 397.- MAURIZI, M.R., CLARK, W.P., KIM, S.H. & GOTTESMAN, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12546-12552.
- 398.- MAURIZI, M.R. & SWITZER, R.L. (1980) *Curr. Top. Cell. Regul.* **16**, 163-224.
- 399.- MAVROTHALASSITIS, G., TZIMAGIORGIS, G., MITSIALIS, A., ZANNIS, V., PLAITAKIS, A., PAPAMATHEAKIS, J. & MOSCHONAS, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3494-3498.
- 400.- MAYER, R.J. & DOHERTY, F.J. (1986) *FEBS Lett.* **198**, 181-193.
- 401.- McELLAGOT, M.A., MIAO, P. & DICE, J.F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11986-11993.
- 402.- McELROY, W.D. (1947) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **33**, 342-352.
- 403.- McGOWAN, E.B., SHAFIQ, S.A. & STRACHER, A. (1976) *Exp. Neurol.* **50**, 649-657.
- 404.- McGUIRE, M.J. & De MARTINO, G.N. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 911-916.
- 405.- McINTYRE, P., De MARTINIS, M.L. & HOOGENRAAD, N. (1983) *Biochem. Int.* **6**, 365-373.
- 406.- McINTYRE, P., GRAF, L., MERCER, J.F.B., WAKE, S.A., HUDSON, P. & HOOGENRAAD, N. (1985) *DNA* **4**, 147-156.
- 407.- McKAY, M.J., MARSH, M.W., KIRSCHKE, H. & BOND, J.S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **784**, 9-15.
- 408.- McRAY, M.J. & HIPKISS, A.R. (1982) *Eur. J. Biochem.* **125**, 567-573.
- 409.- MEGO, J.L. (1973) en " *Lysosomes in Biology and Pathology* ", (Dingle, J.T., ed.), Vol. 3, págs. 138-168, North-Holland Publ., Amsterdam.
- 410.- MEINECKE, L. & BUSE, G. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**, 687-694.
- 411.- MENON, A.S. & GOLDBERG, A.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14921-14928.
- 412.- MENON, A.S. & GOLDBERG, A.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14929-14934.

- 413.- MILLER, N.T., FEIBUSH, B., CORINA, K., POWERS-LEE, S. & KARGER, B.L. (1985) *Anal. Biochem.* **148**, 510-517.
- 414.- MINAMI-ISHII, N., TAKETANI, S., OSUMI, T. & HASHIMOTO, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* **185**, 73-78.
- 415.- MIRALLES, V.J., GONZALEZ-BOSCH, C., MARCOTE, M.J., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 224-227.
- 416.- MIURA, S., AMAYA, Y. & MORI, M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 1151-1159.
- 417.- MIURA, S., MORI, M., AMAYA, Y. & TATIBANA, M. (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 641-647.
- 418.- MIURA, S., MORI, M., AMAYA, Y., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1981) *Biochem. Int.* **2**, 305-321.
- 419.- MIURA, S., MORI, M., MORITA, T. & TATIBANA, M. (1982) *Biochem. Int.* **4**, 201-208.
- 420.- MIZUTANI, A. (1968) *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 172-180.
- 421.- MOLNE, M., HOUART, C., SZPIRER, J. & SZPIRER, C. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 3447-3457.
- 422.- MONIA, B.P., ECKER, D.J. & CROOKE, S.T. (1990) *Bio/Technology* **8**, 209-215.
- 423.- MORI, M., AOYAGY, K., TATIBANA, M., ISHIKAWA, T. & ISHIL, H. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 900-904.
- 424.- MORI, M., MIURA, S., MORITA, T., TAKIGUCHI, M. & TATIBANA, M. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* **49**, 97-111.
- 425.- MORI, M., MIURA, S., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1980) *J. Biochem. (Tokyo)* **88**, 1829-1836.
- 426.- MORI, M., MIURA, S., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7044-7048.
- 427.- MORI, M., MIURA, S., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4127-4132.
- 428.- MORI, M., MORITA, T. IKEDA, F., AMAYA, Y., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6056-6060.

- 429.- MORI, M., MORITA, T., MIURA, S. & TATIBANA, M. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8263-8266.
- 430.- MORITA, T., MIURA, S., MORI, M. & TATIBANA, M. (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 501-509.
- 431.- MORITA, T., MORI, M., IKEDA, F. & TATIBANA, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10547-10550.
- 432.- MORITA, T., MORI, M., TATIBANA, M. & COHEN, P.P. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 623-629.
- 433.- MOROHASHI, K., YOSHIOKA, H., GOTOH, O., OKADA, Y., YAMAMOTO, K., MIYATA, T., SOGAWA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. & OMURA, T. (1987) *J. Biochem.* **102**, 559-568.
- 434.- MOROHASHI, K., FUJII-KURIYAMA, Y., OKADA, Y., SOGAWA, K., HIROSE, T., INAYAMA, S. & OMURA, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4647-4651.
- 435.- MOROHASHI, K., SOGAWA, K., OMURA, T. & FUJII-KURIYAMA, Y. (1987) *J. Biochem.* **101**, 879-887.
- 436.- MORRIS, S.M., KEPKA, D.M., SWEENEY, W.E. & AVNER, E.D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 175-180.
- 437.- MORTIMORE, G.E. (1982) *Nutr. Res.* **40**, 1-12.
- 438.- MORTIMORE, G.E., NEELY, A.N., COX, J.R. & GUINIVAN, R.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 89-95.
- 439.- MORTIMORE, G.E., PÖSÖ, A.R. & LARDEUX, B.D. (1989) *Diabetes/Metabolism Reviews* **5**, 49-70.
- 440.- MORTIMORE, G.E. & SCHWORER, C.M. (1977) *Nature* **270**, 174-176.
- 441.- MORTIMORE, G.E., WARD, W.F. & SCHWORER, C.M. (1978) en " Protein Turnover and Lysosome Function ", (Segal, H.L. & Doyle, D.J., eds.), págs. 67-87. Academic Press, New York.
- 442.- MORTIMORE, G.E. & WARD, W.F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7659-7665.
- 443.- MUECKLER, M.M. & PITOT, H.C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12993-12997.
- 444.- MÜLLER, L. (1986) *Toxicology* **40**, 285-295.

- 445.- MÜLLER, M., DUBIEL, W., ROTHMANN, J. & RAPOPORT, S. (1980) *Eur. J. Biochem.* **109**, 405-410.
- 446.- MURAKAMI, A., KITAGAWA, Y. & SUGIMOTO, E. (1981) *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1899-1900.
- 447.- MURAKAMI, K. & MORI, M. (1990) *EMBO J.* **9**, 3201-3208.
- 448.- MURAKAMI, K., TOKUNAGA, F., IWANAGA, S. & MORI, M. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 207-214.
- 449.- MURAKAMI, K., VOELLMY, R. & GOLDBERG, A.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 8194-8200.
- 450.- MURAKAMI, T., NISHIYORI, A., TAKIGUCHI, M. & MORI, M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1180-1191.
- 451.- MURAKAMI, T., TAKIGUCHI, M., IMOMOTO, T., YAMAMURA, K. & MORI, M. (1989) *Dev. Genet.* **10**, 393-401.
- 452.- NAGATA, N., AKABOSHI, I., YAMAMOTO, J., MATSUDA, E., OHTSUKA, H. & KATSUKI, T. (1980) *Pediat. Res.* **14**, 1370-1373.
- 453.- NAGATA, N., ENDO, F. & MATSUDA, I. (1983) *Clin. Chim. Acta* **134**, 155-166.
- 454.- NAITO, E., OZASA, H., IKEDA, Y. & TANAKA, K. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1605-1613.
- 455.- NAKAMUSA, M. & JONES, M.E. (1970) *Meth. Enzymol.* **17A**, 286-294.
- 456.- NATORI, Y. (1975) en " *Intracellular Protein Turnover* ", (Schimke, R.T. & Katunuma, N., eds.), págs. 273-278. Academic Press, New York.
- 457.- NAVARRO, A. (1982) en " *Degradación de Proteínas Mitocondriales: Técnicas Preliminares en el Estudio del Recambio de la Ornitina Transcarbamilasa de Hígado de Rata* ". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia.
- 458.- NEEDLEMAN, S.B. & MARGOLIASH, E. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 853-863.
- 459.- NEELY, A.N., COX, J.R., FORTNEY, J.A., SCHWORER, C.M. & MORTIMORE, G.E. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6948-6454.
- 460.- NEELY, A.N., NELSON, P.B. & MORTIMORE, G.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 458-472.

- 461.- NEFF, N.T., De MARTINO, G.N. & GOLDBERG, A.L. (1979) *J. Cell. Physiol.* **101**, 439-458.
- 462.- NELSON, N. & SCHATZ, G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4365-4369.
- 463.- NEURATH, H. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 268-271.
- 464.- NEWAY, J.O. & SWITZER, R.L. (1980) *J. Bacteriol.* **155**, 512-521.
- 465.- NGUYEN, M., ARGAN, C., LUSTY, C.J. & SHORE, G.C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 800-805.
- 466.- NGUYEN, M., ARGAN, C., SHEFFIELD, W.P., BELL, A.W., SHIELDS, D. & SHORE, G.C. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 1193-1198.
- 467.- NGUYEN, M., BELL, A.W. & SHORE, G.C. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1499-1505.
- 468.- NICOLETTI, M., GUERRI, C. & GRISOLIA, S. (1977) *Eur. J. Biochem.* **75**, 583-592.
- 469.- NICOLSON, D.W. & NEUPERT, W. (1988) en " Protein Transfer and Organelle Biogenesis " (Das, R.C. & Robbins, P.W., eds.). Academic Press.
- 470.- NISHI, S., SEINO, S. & BELL, G.I. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 937-943.
- 471.- NISHIKIMI, M., HOSOKAWA, Y., TODA, H., SUZUKI, H. & OZAWA, T. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 914-920.
- 472.- NISHIKIMI, M., HOSOKAWA, Y., TODA, H., SUZUKI, H. & OZAWA, T. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 19-25.
- 473.- NONAKA, Y., MATSUKAWA, N., MOROHASHI, K., OMURA, T., OGIHARA, T., TERAOKA, H. & OKAMOTO, M. (1989) *FEBS Lett.* **255**, 21-26.
- 474.- NONAKA, Y., MURAKAMI, H., YABUSAKI, Y., KURAMITSU, S., KAGAMIYAMA, H., YAMANO, T. & OKAMOTO, M. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 1239-1247.
- 475.- NUSSBAUM, R.L., BOGGS, B.A., BEAUDET, A.L., DOYLE, S., POTTER, J.L. & O'BRIEN, W.E. (1986) *Am. J. Hum. Genet.* **38**, 149-158.
- 476.- NUZUM, C.T. & SNODGRASS, P.J. (1971) *Science* **172** 1042-1043.

- 477.- NUZUM, C.T., & SNODGRASS, P.J. (1976) en " The Urea Cycle ". (Grisolía, S., Báguena, R., & Mayor, F., eds.), págs. 325-349. John Wiley & Sons, New York.
- 478.- NYUNOYA, H., BROGLIE, K.E., WIDGREN, E.E. & LUSTY, C.J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 9346-9356.
- 479.- OBARU, K., NOMIYAMA, H., SHIMADA, K., NAGASHIMA, F. & MORINO, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 16976-16983.
- 480.- ODA, T., FUNAI, T & ICHIYAMA, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7513-7519.
- 481.- OHKUMA, S., MORIYAMA, Y. & TAKANO, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2758-2762.
- 482.- OHKUMA, S. & POOLE, B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3327-3331.
- 483.- OHTA, S., TOMURA, H., MATSUDA, K. & KAGAWA, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11257-11262.
- 484.- OHTA, S., GOTO, K., ARAI, H. & KAGAWA, Y. (1988) *FEBS Lett.* **226**, 171-175.
- 485.- ONO, K., OKANO, S. & ITO, Y. (1972) *Seikagaku* **44**, 479.
- 486.- ONO, H. & TUBOI, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3188-3193.
- 487.- OONK, R.B., KRASNOW, J.S., BEATTIE, W.G. & RICHARDS, J.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21934-21942.
- 488.- OTSUKA, M., MIZUNO, Y., YASHIDA, M., KAGAWA, Y. & OHTA, S. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 10916.
- 489.- OTULAKOWSKI, G. & ROBINSON, B.H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17313-17318.
- 490.- OUCHTERLONY, O. & NILSSON, L.A. (1973) en " Handbook of Experimental Immunology " (Weir, D.M., ed.), 2ª edición, Vol. I, cap. 19. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- 491.- OU, W.-J., ITO, A, OKAZAKI, H. & OMURA, T. (1988) *EMBO J.* **8**, 2605-2612.
- 492.- PARG, H.A., RABOY, B. & KULKA, R.G. (1987) *EMBO J.* **6**, 55-61.

- 493.- PARK, S., LIU, G., TOPPING, T.B., COVER, W.H. & RANDALL, L.L. (1988) *Science*. **239**, 1033-1035.
- 494.- PELHAM. H. (1988) *Nature* **332**, 776-777.
- 495.- PENNINGCKX, M. & GIGOT, D. (1978) *FEBS Lett.* **88**, 94-96.
- 496.- PEREZ-PASTOR, E., WALLACE, R. & GRISOLIA, S. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127** , 275-278.
- 497.- PICADO-LEONARD, J., VOUTILAINEN,R., KAO, L.C., CHUNG, B.C., STRAUSS, J.F.III & MILLER, W.L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3240-3244.
- 498.- PICKETTS, D., MAYANIL, C.S.K. & GUPTA, R.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12001-12008.
- 499.- PIERSON, D.L., COX, S.L. & GILBERT, B.E. (1977) *J. Biol. Chem.* **254**, 6464-6469.
- 500.- PILKINGTON, S.J. & WALKER, J.E. (1989) *Biochemistry* **28**, 3257-3264.
- 501.- PILLAI, S. & ZULL, J.E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 8384-8389.
- 502.- PLOMP, P.J.A.M., GORDON, P.B., MEIJER, A.J., HOYVIK, H. & SEGLEN, P.O. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6699-6704.
- 503.- PONS, G., RAEFSKY-ESTRIN, C., CAROTHERS, D.J., PEPIN, R.A., JAVED, A.A., JESSE, B.W., GANAPATHI, M.K., SAMOLS, D. & PATEL, M.S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1422-1426.
- 504.- PONTREMOLI, S. & MELLONI, E. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 455-481.
- 505.- POOLE, B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6587-6591.
- 506.- POOLE, B., OHKUMA, S. & WARBURTON, M. (1978) en " Protein Turnover and Lysosome Function ", (Segal, H.L. & Doyle, D.J., eds.), págs. 43-58. Academic Press, New York.
- 507.- POOLE, B. & WIBO, M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6621-6626.
- 508.- POPE, M.T. & DALE, B.W. (1968) *Q. Rev. Chem. Soc.* **22**, 527-548.
- 509.- POWELL, S.J., MEDD, S.M., RUNSWICK, M.J. & WALKER, J.E. (1989) *Biochemistry* **28**, 866-873.

- 510.- POWELL, J.F., HSU, Y.P., WEYLER, W., CHEN, S., SALACH, J., ANDRIKOPOULOS, K., MALLETT, J. & BREAKFIELD, X.O. (1989) *Biochem. J.* **259**, 407-413.
- 511.- POWER, M.D., KIEFER, M.C., BARR, P.J. & REEVES, R. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6734.
- 512.- POWERS-LEE, S.G., MASTICO, R.A. & BENDAYAN, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15683-15688.
- 513.- QURESHI, I.A., LETARTE, J. & QUELLET, R. (1979) *Pediatr. Res.* **13**, 807-811.
- 514.- RAGAB, H., BECK, C., DILLARD, C. & TAPPEL, A.L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 501-505.
- 515.- RAIJMAN, L. (1974) *Biochem. J.* **138**, 225-232.
- 516.- RAIJMAN, L. (1976) en " *The Urea Cycle* ", (Grisolía, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.), págs. 243-254. John Wiley & Sons, New York.
- 517.- RAMPONI, G., NASSI, P., LIGURI, G., CAPPUGI, G. & GRISOLIA, S. (1978) *FEBS Lett.* **90**, 228-232.
- 518.- RANDALL, S.K. & SHORE, G.C. (1989) *FEBS Lett.* **250**, 561-564.
- 519.- RANNELS, E.D., KAO, R. & MORGAN, H.E. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 1694-1701.
- 520.- RAPOPORT, S., DUBIEL, W. & MÜLLER, M. (1982) *FEBS Lett.* **147**, 93-96.
- 521.- RAPPAPORT, A.M. (1958) *Anat. Rec.* **130**, 673-686.
- 522.- RAYMOND, Y. & SHORE, G.C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2087-2090.
- 523.- RECHSTEINER, M. (1987) *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 1-30.
- 524.- RECHSTEINER, M. (1989) en " *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolía, S., eds.), págs. 235-253. Springer International.
- 525.- RECHSTEINER, M. (1991) *Cell* **66**, 615-618.
- 526.- RECHSTEINER, M., ROGERS, S. & ROTE, K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 390-394.
- 527.- REICHARD, P. (1957) *Acta. Chem. Scand.* **11**, 523-536.

- 528.- REICHARD, H. & REICHARD, P. (1958) *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 709-717.
- 529.- REINSTEIN, J., SCHLICHTING, I. & WITTINGHOFER, A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7451-7459.
- 530.- Resultados no publicados; referencia de acceso en la base Swissprot: P60\$Rat.
- 531.- REYNOLDS, E.S. (1963) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **17**, 208-212.
- 532.- RICCIUTI, F. C., GELEHRTER, T.D. & ROSENBERG, L.E. (1976) *Am. J. Hum. Genet.* **28**, 332-338.
- 533.- RIEDER, R.F., IBRAHIM, A. & ETLINGER, J.D. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2015-2018.
- 534.- RIVETT, A.J. (1986) *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 291-337.
- 535.- RIVETT, A.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12215-12219.
- 536.- RIVETT, A.J. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 1-8.
- 537.- RIZZUTO, R., NAKASE, H., DARRAS, B., FRANCKE, U., FABRIZI, G.M., MENGEL, T., WALSH, F., KADENBACH, B., DiMAURO, S. & SCHON, E.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10595-10600.
- 538.- RIZZUTO, R., NAKASE, H., ZEVIANI, M., DiMAURO, S. & SCHON, E.A. (1988) *Gene* **69**, 245-256.
- 539.- ROBERTS, J.W. & ROBERTS, C.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 147-151.
- 540.- ROBERTS, J.W., ROBERTS, C.W. & CRAIG, N.L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4714-4718.
- 541.- ROBERTS, J.W., ROBERTS, C.W. & MOUNT, D.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2283-2287.
- 542.- ROCHE, E., ANIENTO, F. & KNECHT, E. (1989) en " *Current Trends in The Study of Intracellular Protein Degradation* ", (Knecht, E. & Grisolia, S., eds.), Vol. II, págs. 285-304. Springer International.
- 543.- ROGERS, P. & NOVELLI, G.D. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 398-407.

- 544.- ROGERS, S.W. & RECHSTEINER, M. (1985) en " Intracellular Protein Catabolism ", (Khairallah, E., Bond, J.S. & Bird, J.W.C., eds.), págs. 405-416. Alan R. Liss Inc., New York.
- 545.- ROGERS, S.W. & RECHSTEINER, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19850-19862.
- 546.- ROGERS, S.W., WELLS, R. & RECHSTEINER, M. (1986) *Science* **234**, 364-368.
- 547.- ROSE, D. & SCHATZ, G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4509-4511.
- 548.- ROMANO, E.L. & ROMANO, M. (1977) *Immunochemistry* **14**, 711-715.
- 549.- ROSENBERG, L.E., KALOUSEK, F. & ORSULAK, M.D. (1983) *Science* **222**, 426-428.
- 550.- ROTE, K.V. & RECHSTEINER, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15430-15436.
- 551.- ROTE, K.V., ROGERS, S., PRATT, G. & RECHSTEINER, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9772-9779.
- 552.- ROTH, J. (1982) en " Techniques in Immunocytochemistry ", (Bullock, G.R. & Petrusz, P. eds.), págs. 107-113. Academic Press. New York.
- 553.- ROTH, J., BENDAYAN, M. & ORCI, L. (1978) *J. Histochem. Cytochem.* **26**, 1074-1081.
- 554.- ROZEN, R., FOX, J., FENTON, W.A., HORWICH, A.L. & ROSENBERG, L.E. (1985) *Nature* **313**, 815-817.
- 555.- RUBIO, V. & GRISOLIA, S. (1977) *FEBS Lett.* **75**, 281-284.
- 556.- RUBIO, V., RIVAS, J., IBORRA, J.L. & GRISOLIA, S. (1977) *Acta Biol. Med. Ger.* **36**, 1661-1666.
- 557.- RUNSWICK, M.J., GENNIS, R.B., FEARNLEY, I.M. & WALKER, J.E. (1989) *Biochemistry* **28**, 9452-9459.
- 558.- RUNSWICK, M.J., MEDD, S.M. & WALKER, J.E. (1990) *Biochem. J.* **266**, 421-426.
- 559.- RUNSWICK, M.J., POWELL, S.J., NYREN, P. & WALKER, J.E. (1987) *EMBO J.* **6**, 1367-1373.
- 560.- RUSSELL, J., WENG, L., KEIM, P.S. & HEINRIKSON, R.L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8102-8108.

- 561.- RYALL, J., NGUYEN, M., BENDAYAN, M. & SHORE, G.C. (1985) *Eur. J. Biochem.* **152**, 287-292.
- 562.- RYALL, J.C., QUANTZ, M.A. & SHORE, G.C. (1986) *Eur. J. Biochem.* **156**, 453-458.
- 563.- SACCHETTINI, J.C., FRAZIER, M.W., CHIARA, D.C., BANASZAK, L.J. & GRANT, G.A. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 435-440.
- 564.- SAGARA, Y., SAWAE, H., KIMURA, A., SAGARA-NAKANO, Y., MOROHASHI, K., MIYOSHI, K. & HORIUCHI, T. (1990) *J. Biochem.* **107**, 77-83.
- 565.- SARASTE, M., SIBBALD, P.R. & WITTINGHOFER, A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- 566.- SATAV, J.G., KATYASE, S.S., FATTERPAKER, P. & SCREENIVASAN, A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **451**, 92-98.
- 567.- SAUS, J., TIMONEDA, J., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1982) *FEBS Lett.* **143**, 225-227.
- 568.- SAWANT, P.L., SHIBKO, S., KUMTA, U.S. & TAPPEL, A.L. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 82-92.
- 569.- SCHAGGER, H., Von JAGOW, G., BORCHART, U. & MACHLEIDT, W. (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 307-311.
- 570.- SCHERER, S.E., VERES, G. & CASKEY, C.T. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 1593-1601.
- 571.- SCHIMKE, R.T. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 459-468.
- 572.- SCHIMKE, R.T. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1921-1924.
- 573.- SCHIMKE, R.T. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 1012-1018.
- 574.- SCHIMKE, R.T. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 3808-3817.
- 575.- SCHIMKE, R.T. & DOYLE, D. (1970) *Annu. Rev. Biochem.* **39**, 929-976.
- 576.- SCHIRCH, D.M. & WILSON, J.E. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 1-12.
- 577.- SCHLEYER, M., SCHMIDT, B. & NEUPERT, W. (1982) *Eur. J. Biochem.* **125**, 109-116.

- 578.- SCHNEIDER, D.L. (1981) *J. Biol. Chem.* **258**, 3858-3864.
- 579.- SCHOENHAUT, D.S. & CURTIS, P.J. (1986) *Gene* **48**, 55-63.
- 580.- SCHWAB, D.A. & WILSON, J.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2563-2567.
- 581.- SCHWARTZ, A.L., CIECHANOVER, A., BRANDT, R.A. & GENZE, H.J. (1988) *EMBO J.* **7**, 2961-2966.
- 582.- SCHWEIGER, H.G., RAPOPORT, S. & SCHÖLZER, E. (1956) *Nature* **178**, 141-142.
- 583.- SCHWORER, C.M., COX, J.R. & MORTIMORE, G.E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 163-170.
- 584.- SCHWORER, C.M., SHIFFER, K.A. & MORTIMORE, G.E. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7652-7658.
- 585.- SECRIST III, J.A., BARRIO, J.R. & LEONARD, N.J. (1972) *Science* **175**, 646-647.
- 586.- SECRIST III, J.A., BARRIO, J.R., LEONARD, N.J. & WEBER, G. (1972) *Biochemistry* **11**, 3499-3506.
- 587.- SEELAN, R.S., SCHEUNER, D., LOMAX, M.I. & GROSSMAN, L.I. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6410.
- 588.- SEFTON, B.M. & BUSS, J.E. (1987) *J. Cell. Biol.* **104**, 1449-1453.
- 589.- SEGAL, H.L., ROTHSTEIN, D.M. & WINKLER, J.R. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 79-84.
- 590.- SEGLEN, P.O. (1983) *Meth. Enzymol.* **96**, 737-764.
- 591.- SHAMBAUGH, G.E., III, BALINSKI, J.B. & COHEN, P.P. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 5295-5038.
- 592.- SHELBOURNE, J.D., ARSTILA, A.U. & TRUMP, B.F. (1973) *Am. J. Pathol.* **72**, 521-540.
- 593.- SHELBOURNE, J.D., ARSTILA, A.U. & TRUMP, B.F. (1973) *Am. J. Pathol.* **73**, 641-670.
- 594.- SHIH, V.E. (1976) en " *The Urea Cycle* ", (Grisolía, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds), págs. 367-414. John Wiley & Sons, New York.

- 595.- SHIH, V.E. (1978) en " The Metabolic Basis of Inherited Diseases ", (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. & Fredrikson, D.S., eds.), págs. 362-386. McGraw-Hill, New York.
- 596.- SHIMADA, T., NODA, T., TASHIRO, M., MURAKAMI, T., TAKIGUCHI, M., MORI, M., YAMAMURA, K.I. & SAHEKI, T. (1991) *FEBS Lett.* **279**, 198-200.
- 597.- SHORT, E.M., CONN, H.O., SNODGRASS, P.J., CAMPBELL, A.G.M. & ROSENBERG, L.E. (1973) *N. Engl. J. Med.* **288**, 7-12.
- 598.- SIEGELMAN, M., BOND, M.W., GALLATIN, W.M., St JOHN, T., SMITH, H.T., FRIED, V.A. & WEISSMAN, I.L. (1986) *Science* **231**, 823-829.
- 599.- SIMMER, J.P., KELLY, R.E., RINKER, A.G., SCULLY, J.L. & EVANS, D.R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10395-10402.
- 600.- SIMPSON, M.V. (1953) *J. Biol. Chem.* **201**, 143-154.
- 601.- SINGH, B., PATEL, H.V., RIDLEY, R.G., FREEMAN, K.B. & GUPTA, R.S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 391-396.
- 602.- SKERJANC, I.S., SHEFFIELD, W.P., SILVIUS, J.R. & SHORE, G.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17233-17236.
- 603.- SKRZYPEK, M., BORSUK, P. & MALESZKA, R. (1990) *Yeast* **6**, 141-148.
- 604.- SNELLMAN, K., APERIA, A. & BROBERGER, O. (1979) *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 337-342.
- 605.- SNODGRASS, P.J. (1968) *Biochemistry* **7**, 3047-3051.
- 606.- SOLER, J., TIMONEDA, J., De ARRIAGA, D. & GRISOLIA, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 100-106.
- 607.- SPEISER, S. & ETLINGER, J.D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3577-3580.
- 608.- SRERE, P.A. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 89-124.
- 609.- STADTMAN, E.R. (1986) *Trends Biochem. Sci.* **11**, 11-12.
- 610.- STADTMAN, E.R. (1990) *Biochemistry* **29**, 6323-6331.
- 611.- STADTMAN, E.R. & OLIVER, C.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 2005-2008.

- 612.- STAHN, R., MAIER, K.P. & HANNIG, K. (1970) *J. Cell. Biol.* **46**, 576-591.
- 613.- STAUFENBIEL, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 13615-13622.
- 614.- STEWART, J.W. & MARGOLIASH, E. (1965) *Can. J. Biochem.* **43**, 1187-1206.
- 615.- STRACHER, A., MCGOWAN, E.B. & SHAFIQ, S.A. (1978) *Science* **200**, 50-51.
- 616.- STREHLER, B.L. & TOTTER, J.R. (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 28-41.
- 617.- STROUS, G., VAN KERKHOF, P., DEKKER, J. & SCHWARTZ, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18197-18204.
- 618.- STRYER, L. (1981) en " *Biochemistry* ", 2º edición, pág. 414. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- 619.- SUBRAMANIAN, M., KATYARE, S.S., FATTERPAKER, P. & SREENIVASAN, A. (1975) *Ind. J. Biochem. Biophys.* **12**, 307-310.
- 620.- SUKENAGA, Y., ISHIDA, K., TAKEDA, T. & TAKAGI, K. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 7178.
- 621.- SUSKE, G., ENDERS, C., SCHLERF, A. & KADENBACH, B. (1988) *DNA* **7**, 163-171.
- 622.- SUZUKI, H., HOSOKAWA, Y., NISHIKIMI, M. & OZAWA, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1368-1374.
- 623.- SUZUKI, T., SATO, M., YOSHIDA, T. & TUBOI, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2581-2586.
- 624.- SUZUKI, H., YOSHITAKA, H., TODA, H., NISHIKIMI, M. & OZAWA, T. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 987-994.
- 625.- SWAMY, K.H.S. & GOLDBERG, A.L. (1981) *Nature* **292**, 652-654.
- 626.- SWICK, R.W. & IP, M.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 6836-6841.
- 627.- SZTUL, E.S., HENDRICK, J.P., KRAUS, J.P., WALL, D., KALOUSEK, F. & ROSENBERG, L.E. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 2631-2639.
- 628.- TAAMAN, J.W., SCHRAGE, C., PONNE, N., BOLHUIS, P.A., De VRIES, H. & AGSTERIBBE, E. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 1766.

- 629.- TAKESHIMA, H., JOH, T., TSUZUKI, T., SHIMADA, K. & MATSUKADO, Y. (1988) *J. Mol. Biol.* **200**, 1-11.
- 630.- TAKIGUCHI, M., MIURA, S., MORI, M., TATIBANA, M., NAGATA, S. & KAZIRO, Y. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7412-7416.
- 631.- TAKIGUCHI, M., MURAKAMI, T., MIURA, S. & MORI, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6136-6140.
- 632.- TAM, L.Q. & PATIL, S.S. (1972) *Plant Physiol.* **49**, 808-812.
- 633.- TANAKA, K. & ICHIHARA, A. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 1309-1315.
- 634.- TANAKA, K., IKEGAKI, N. & ICHIHARA, A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 296-304.
- 635.- TANAKA, K., TAMURA, T., KUMATORI, A., KWAK, T.H., CHUNG, C.H. & ICHIHARA, A. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1253-1261.
- 636.- TANAKA, K., WAXMAN, L. & GOLDBERG, A.L. (1983) *J. Cell Biol.* **96**, 1580-1585.
- 637.- TERZI, E., BOYOT, P., VAN DORSSELAER, A., LUU, B. & TRIFILIEFF, E. (1990) *FEBS Lett.* **260**, 122-126.
- 638.- THEKKUMKARA, T.J., HO, L., WEXLER, I.D., PON, G., LIU, T. & PATEL, M.S. (1988) *FEBS Lett.* **240**, 45-48.
- 639.- THEORELL, H. (1967) *Harvey Lectures Series* **61**, 17.
- 640.- THINES-SEMPOUX, D. (1973) en " *Lysosomes in Biology and Pathology* ", (Dingle, J.F., ed.), Vol. **3**, págs. 278-299. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 641.- TOMASSELLI, A.G., FRANK, R. & SCHILTZ, E. (1986) *FEBS Lett.* **202**, 303-308.
- 642.- TORRES-CABASSA, A.S. & GOTTESMAN, S. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 981-199.
- 643.- TSUDA, M., SHIKATA, Y. & KATUNUMA, T. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* **85**, 699-704.
- 644.- TSUJI, S. (1983) *J. Biochem (Tokyo)* **94**, 1307-1315.
- 645.- TSUJI, S. & FUKUSHIMA, T. (1981) *Biochem. Genet.* **19**, 881-893.

- 646.- TSUJI, S., NAKAGAWA, K. & FUKUSHIMA, T. (1983) *Biochem. Genet.* **21**, 857-869.
- 647.- TSURUMI, C., YOSHIHARA, Y., OSAKA, F., YAMADA, F., TANI, I., HIGUTI, T., SHIMIZU, M., OEDA, K., OHKAWA, H., TODA, H., KAKUNO, T., SAKIYAMA, F., KUMATORI, A., TANAKA, K. & ICHIHARA, A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 136-142.
- 648.- USUI, S., YU, L. & YU, C.A. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 575-579.
- 649.- USUI, E., NOSHIRO, M. & OKUDA, K. (1990) *FEBS Lett.* **262**, 135-138.
- 650.- VAN VLIET, F., CUNIN, R., JACOBS, A., PIETTE, J., GIGOT, D., LAUWEREYS, M., PIERARD, A. & GLANSDORFF, N. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 6277-6289.
- 651.- VARGAS, J.L. (1987) en " *Mecanismos de Degradación Intracelular de Proteínas en Células de Mamífero* ". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia.
- 652.- VARGAS, J.L., KNECHT, E. & GRISOLIA, S. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 99-109.
- 653.- VARGAS, J.L., KNECHT, E., HERNANDEZ-YAGO, J. & GRISOLIA, S. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* **1034**, 268-274.
- 654.- VARGAS, J.L., O'CONNOR, E., ROCHE, E., KNECHT, E. & GRISOLIA, S. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 535-541.
- 655.- VARGAS, J.L., ROCHE, E., KNECHT, E. & GRISOLIA, S. (1987) *FEBS Lett.* **224**, 182-186.
- 656.- VERES, G., CRAIGEN, W.J. & CASKEY, C.T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7588-7591.
- 657.- VERES, G., GIBBS, R.A., SCHERER, S.E. & CASKEY, C.D. (1987) *Science* **237**, 415-417.
- 658.- VERNER, K. & SCHATZ, G. (1988) *Science* **241**, 1307-1313.
- 659.- VIERSTRA, R.D., LANGAN, S.M. & HAAS, A.L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12015-12021.
- 660.- VIÑAS, O., POWELL, S.J., RUNSWICK, M.J., IACOBAZZI, V. & WALKER, J.E. (1990) *Biochem. J.* **265**, 321-326.
- 661.- VIRBASIUS, J.V. & SCARPULLA, R.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6791-6796.
- 662.- Von HEIJNE, G., STEPPUHN, J. & HERRMANN, R.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545.

- 663.- WAAL, E.J., VREELING-SINDERALOVA, H., SCHELLENS, J.P., HOUTKOOPER, J.M. & JAMES, J. (1986) *Cell Tissue Res.* **243**, 641-648.
- 664.- WAKABAYASHI, S., MATSUBARA, H., KIM, C.H. & KING, T.E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9335-9344.
- 665.- WAKABAYASHI, S., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y., KURAMITSU, S., MATSUBARA, H., WANG, T., ZHANG, Z. & KING, T.E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 337-343.
- 666.- WALKER, J.E., GAY, N.J., POWELL, S.J., KOSTINA, M. & DYER, M.R. (1987) *Biochemistry* **26**, 8613-8619.
- 667.- WALKER, J.E., POWELL, S.J., VIÑAS, O. & RUNSWICK, M.J. (1989) *Biochemistry* **28**, 4702-4708.
- 668.- WALKER, J.E., RUNSWICK, M.J. & POULTER, L. (1987) *J. Mol. Biol.* **197**, 89-100.
- 669.- WALSER, M. (1983) en " *The Metabolic Basis of Inherited Disease* ", (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S., eds.), 5ª edición, págs. 402-438.
- 670.- WARD, W.F., COX, J.R. & MORTIMORE, G.E. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6955-6961.
- 671.- WARGNIES, B., MERCENIER, A., SIMON, J.P. & STALON, V. (1980) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **88**, B116-B117.
- 672.- WATANABE, N., VANDE WOUDE, G.F., IKAWA, Y. & SAGATA, N. (1989) *Nature* **342**, 505-511.
- 673.- WATERLOW, J.C., GARLICK, P.J., & MILLWARD, D.J. (1978) en " *Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body* ". 804 págs. North-Holland, Amsterdam.
- 674.- WATTIAUX, R. (1966) *Thèse d'Aggregation de L'Enseignement Superieur.* 149 págs. Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgica.
- 675.- WATTIAUX, R., WATTIAUX De CONINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M.F. & DUBIS, F. (1978) *J. Cell Biol.* **78**, 349-368.
- 676.- WAXMAN, L., FAGAN, J.M., TANAKA, K. & GOLDBERG, A.L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11994-12000.

- 677.- WENDEL, U., WIELAND, J., BREMEK, M.J. & BACHMANN, C. (1989) *Eur. J. Pediatr.* **148**, 349-352.
- 678.- WERKHEISER, W.C. & BARTLEY, W. (1956) *Biochem. J.* **66**, 79-91.
- 679.- WHEATLEY, D.N. (1984) *J. Theoret. Biol.* **107**, 127-149.
- 680.- WHEATLEY, D.N., GRISOLIA, S. & HERNANDEZ-YAGO, J. (1982) *J. Theoret. Biol.* **98**, 283-300.
- 681.- WHEELDON, L.W., DIANOUX, A., BOFF, M. & VIGNAIS, P.V. (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 189-199.
- 682.- WIBO, M. & POOLE, B. (1974) *J. Cell. Biol.* **63**, 430-440.
- 683.- WILD, J.R., JOHNSON, J.L. & LOUGHREY, S.J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 446-448.
- 684.- WILD, J.R., LOUGHRI, S.J. & CORDER, T.S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 46-50.
- 685.- WILLIAMSON, J.R. (1969) en " The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria ", (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E., Slater, E. & Slater, E.C., eds.), Adriatica Editrice, Bari.
- 686.- WIMMER, M. & PETTE, D. (1979) *Histochemistry* **64**, 23-33.
- 687.- WOELTJE, K.F., ESSER, V., WEISS, B.C., SEN, A., COX, W.F., McPHAUL, M.J., SLAUGHTER, C.A., FOSTER, D.W. & McGARRY, J.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10720-10725.
- 688.- WOLFE, D.M. & GATFIELD, P.D. (1975) *Pediatr. Res.* **9**, 531-535.
- 689.- WOO, K.M., CHUNG, W.J., HA, D.B., GOLDBERG, A.L. & CHUNG, C.H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2088-2091.
- 690.- WOOD, H.G. (1977) *Fed. Proc.* **36**, 2197-2205.
- 691.- WOODSIDE, K.H. & MORTIMORE, G.E. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6474-6481.
- 692.- WOODSIDE, K.H., WARD, W.F. & MORTIMORE, G.E. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 5458-5463.
- 693.- WRAIGHT, C., LINGELBACH, K. & HOOGENRAAD, N. (1985) *Eur. J. Biochem.* **153**, 239-242.
- 694.- XIE, G. & WILSON, J.E. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **267**, 803-810.

- 695.- XIONG, X. & ANDERSON, P.M. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 198-207.
- 696.- YAMADA, M., AMURO, N., GOTO, Y. & OKAZAKI, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7687-7692.
- 697.- YAMADA, M., SHAHJAHAN, M., TANABE, T., KISHI, F. & NAKAZAWA, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19192-19199.
- 698.- YAMAGUCHI, M., HATEFI, Y., TRACH, K. & HOCH, J.A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2761-2767.
- 699.- YAMAMOTO, M., KURE, S., ENGEL, J.D. & HIRAGA, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15973-15979.
- 700.- YAMAUCHI, K., HAYASHI, N. & KIKUCHI, G. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1746-1751.
- 701.- YAMAZAKI, K. & La RUSSO, N.F. (1989) *Hepatology* **10**, 877-886.
- 702.- YANAMURA, W., ZHANG, Y.-Z., TAKAMIYA, S. & CAPALDI, R.A. (1988) *Biochemistry* **27**, 4909-4914.
- 703.- YOSHIMURA, S., TAKEKOSHI, S., WATANABE, K. & FUJII-KURIYAMA, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 1024-1028.
- 704.- ZAK, R., MARTIN, A.F. & BLOUGH, R. (1979) *Physiol. Rev.* **59**, 407-447.
- 705.- ZEVIANI, M., NAKAGAWA, M., HERBERT, J., LOMAX, M.I., GROSSMAN, L.I., SHERBANY, A.A., MIRANDA, A.F., Di MAURO, S. & SCHON, E.A. (1987) *Gene* **55**, 205-217.
- 706.- ZEVIANI, M., SAKODA, S., SHERBANG, A., NAKASE, H., RIZZUTO, R., SAMITT, C.E., Di MAURO, S. & SCHON, E.A. (1988) *Gene* **65**, 1-11.
- 707.- ZHANG, B., KUNTZ, M.J., GOODWIN, G.W., HARRIS, R.A. & CRABB, D.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15220-15224.
- 708.- ZHANG, B., CRABB, D.W. & HARRIS, R.A. (1988) *Gene* **69**, 159-164.
- 709.- ZHANG, Y., LADJIMI, M.M. & KANTROWITZ, E.R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1320-1324.
- 710.- ZHENG, L., ANDREW, P.C., HERMODSON, M.A., DIXON, J.E. & ZALKIN, H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2814-2821.

711.- ZIMMERMANN, R. & NEUPERT, W. (1980) *Eur. J. Biochem.* **109**, 217-229.

712.- ZSIGMONDY, R. (1905) en "Zur Erkenntnisse der Kolloide". Jena.

713.- ZUBATOV, A.S., MIKBALOVA, A.E. & LUZIKOV, V.N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 188-194.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D. ALFONSO NAVARRO MARZAL  
la calificación de APTO "Cum Laude"

Valencia, a 21 de Febrero de 1994

El Secretario,



El Presidente

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.