

## SÍNTESIS, MODIFICACIÓN Y CONTROL DE LA CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS: PAPEL ESENCIAL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL COMPLEJO DE GOLGI

Clara Spinel, Biol. Ph.D<sup>1</sup>, Thomas David Karl H Geydan, Est. Biol.<sup>2</sup>, Ismail Yildiz, M.D., M.Sc.

<sup>1</sup>Profesora Titular, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

La célula sintetiza numerosas moléculas que ella misma necesita o vierte al medio extracelular. Por ejemplo, los elementos de la matriz extracelular son sintetizados y secretados bajo la forma de precursores solubles y las proteínas del plasma sanguíneo también son elaboradas y secretadas por células. De otra parte, las células pueden sintetizar también las proteínas y lípidos que necesitan para mantener o reformar sus estructuras o para su metabolismo.

En este capítulo se describen principalmente la síntesis y los mecanismos de control de las proteínas por la célula, en particular el papel fundamental que estos procesos cumplen el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi.

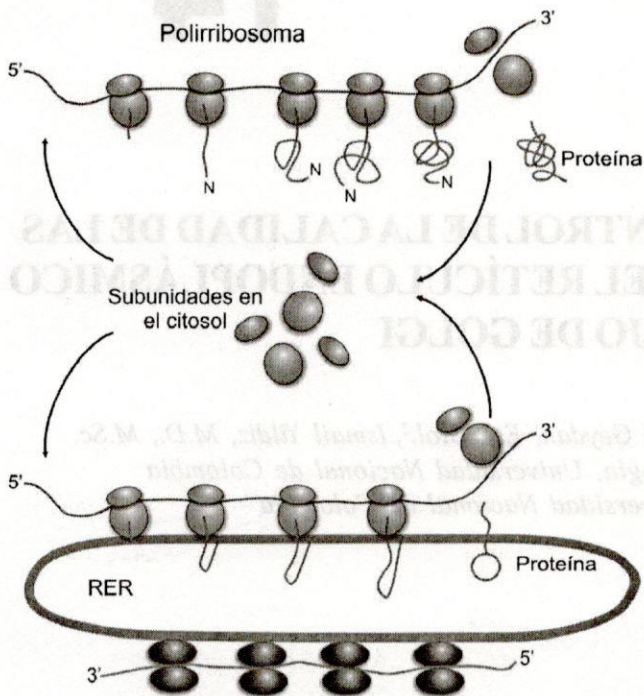
### Lugares de la síntesis y modificación de las proteínas

La síntesis de todas las proteínas en la célula tiene lugar en el citosol realizada por los **polirribosomas** (polisomas o ribosomas libres) o en los ribosomas del retículo endoplásmico del denominado **Retículo Endoplásmico Rugoso (RER)**, que se diferencia del **Retículo Endoplásmico Liso (REL)** por la presencia de ribosomas en el lado citosólico de la membrana. Generalmente, el RER se presenta como un conjunto de cisternas delgadas unas sobre las otras, de 40 a 70 nm de espesor que gene-

ralmente se localiza de manera perinuclear. Por su parte el REL es una estructura tubular desordenada y un conjunto de vesículas redondeadas, ovoides y alargadas. En las células que secretan grandes cantidades de proteínas se observa un RER muy abundante, mientras que aquellas que secretan preferencialmente lípidos contienen un REL muy profuso.

La célula eucariótica tiene dos regiones determinadas por la presencia de la membrana plasmática y de organelos con membrana. Por un lado, como en todas las células, la membrana plasmática delimita el medio intracelular (región citoplásmica o citosólica) del medio extracelular (región exoplásmica). Por otro lado, únicamente en las células eucarióticas, las membranas de los organelos delimitan las regiones interiores de los organelos consideradas como equivalentes, pero no iguales, a la región exoplásmica. La presencia del RER y de los polirribosomas como lugares diferentes de la síntesis proteica permite a la célula seleccionar las proteínas que irán a las regiones exoplásmicas y a las membranas de aquellas que son destinadas a la región citosólica. La célula puede controlar así los procesos de síntesis, de maduración y los destinos finales adecuados de las proteínas. Sin embargo, los ribosomas que intervienen en la síntesis de proteínas, tanto en el RER como en los polirribosomas, son idénticos. Sus dos subunidades se encuentran disociadas en el citosol cuando no están sintetizando proteínas y se unen en el

citósol para formar el ribosoma de los polirribosomas o del RER (Figura 1).



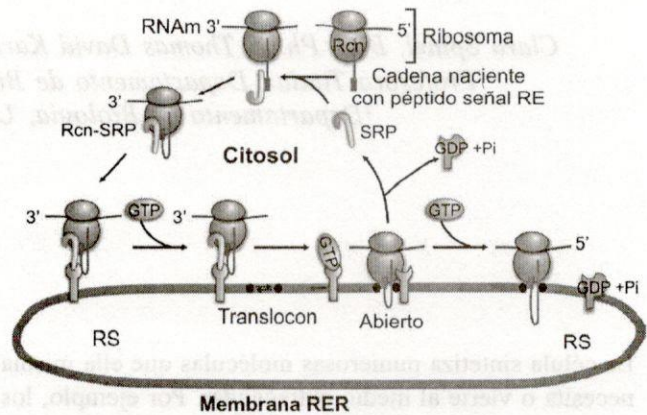
**Figura 1. Ciclo de las subunidades ribosomales.**  
Las subunidades ribosomales se encuentran disociadas en el citósol. Cuando participan en la síntesis proteica se unen para formar los ribosomas (1) de los polirribosomas o del Reticulo Endoplasmico Rugoso (RER). Al finalizar la síntesis de la cadena polipeptídica, el ribosoma se disocia de nuevo y sus subunidades son liberadas al citósol (2).

Las mitocondrias y los cloroplastos representan el tercer lugar de síntesis de proteínas. El ADN de las mitocondrias humanas codifica para trece proteínas y su síntesis se realiza en la matriz mitocondrial por sus ribosomas a partir de los aminoácidos transportados desde el citósol. En los cloroplastos también se realiza síntesis de proteínas en su membrana tilacoidea y en su matriz.

**Péptido señal RE**

El mecanismo que utiliza la célula para direccionar la síntesis de unas proteínas en el citósol y otras proteínas en el RER se encuentra en los genes mismos que codifican a las proteínas. La síntesis de todas las proteínas empieza en el citósol, sin embargo, las proteínas que deben seguir su síntesis en el RER tienen una señal molecular en forma de una secuencia peptídica sintetizada al inicio del extremo amino terminal. Cuando existe esta secuencia peptídica de señal del reticulo endoplasmico, llamado **péptido señal RE** (conocida antes como Secuencia de Señal), se interrumpe la síntesis proteica en el citósol gracias al reconocimiento de esta señal por la SRP (partícula de reconocimiento de señal RE), y no prosigue sino hasta encon-

trar el RER donde se organiza el translocón en la membrana y de esta manera la cadena peptídica nascente atraviesa del citósol a la luz del RER (Figura 2). Si la cadena peptídica nascente no tiene el péptido señal RE, se continúa la síntesis proteica en el citósol y los ribosomas siguen ensamblándose sobre el RNAm, formando así un polirribosoma, entonces, la síntesis de la proteína se realiza totalmente en el citósol (Figura 1 Polirribosoma). Las proteínas sintetizadas en estos polirribosomas tienen señales en sus extremos amino terminal o pequeñas secuencias de aminoácidos intercaladas en la cadena peptídica que determinan e intervienen en su transporte al sitio exacto de su destino final, ya sea la mitocondria, el cloroplasto o el núcleo.



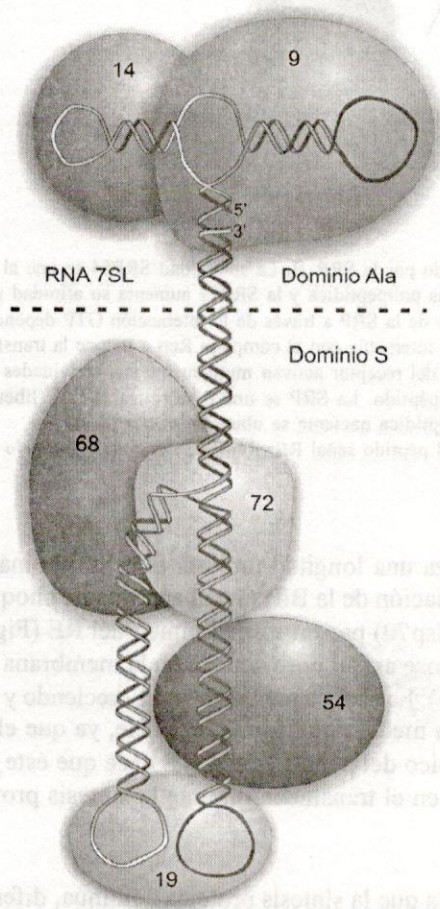
**Figura 2. Ciclo de la partícula de reconocimiento de señal (SRP).**

Exposición del péptido señal RE en la cadena peptídica nascente. La SRP se une al péptido señal RE e interrumpe la síntesis proteica en el citósol. Luego ocurre la translocación del ribosoma sobre la membrana del RER. Un receptor específico de la membrana del RER reconoce la SRP asociado al complejo de síntesis proteica. Se organiza el translocón (aparato translocador) en la membrana del RER y permite el paso de la cadena peptídica nascente y la SRP se une a un GTP. La SRP se libera al citósol por la hidrólisis del GTP y su receptor queda unido al translocón. La síntesis de la proteína continúa y el receptor de la SRP se libera por unión a un GTP que se hidroliza posteriormente.  
Rcn: ribosoma con la cadena peptídica nascente; SRP: partícula de reconocimiento del péptido señal RE; Rcn-SRP: complejo formado por el Rcn y la SRP; RS: receptor de la SRP; GTP: guanosín trifosfato; GDP: guanosín difosfato; Pi: fosfato inorgánico.

Los péptidos señal RE varían en longitud entre 13 a 36 aminoácidos; aún así, todos poseen ciertas características en común: poseen 10 a 15 aminoácidos hidrofóbicos en su centro, uno o más residuos cargados positivamente usualmente cerca al extremo amino terminal, precediendo la secuencia hidrofóbica, finalmente, presentan una secuencia corta en el carboxilo terminal (cerca al sitio de corte por la peptidasa de señal) que es relativamente polar y que típicamente contiene residuos de aminoácidos con cadenas laterales cortas (especialmente alanina) en las posiciones más cercanas a los sitios de corte.

### Partícula de Reconocimiento de Señal

Como se mencionó, el péptido señal RE es reconocido por la **partícula de reconocimiento de señal** (SRP) que se encuentra en el citosol. La SRP de los mamíferos es una ribonucleoproteína conformada por un RNA (RNA 7SL) y por seis subunidades proteicas denominadas SRP seguidas por el número que corresponde al peso molecular en kDa (SRP54, SRP72, SRP68, SRP19, SRP14, y SRP 9) (Figura 3). La SRP54 consiste de un haz de cuatro hélices N-terminal, un dominio con actividad GTPasa y un dominio C-terminal  $\alpha$ -helicoidal rico en metionina. La SRP puede ser dividida en dos dominios funcionales, el dominio Alu que se une al péptido de señal RE y el dominio S que se une al complejo ribosoma-cadena naciente (Rcn) por el sitio aminoacil del ribosoma (Figura 2).



**Figura 3. Esquema de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) de mamíferos.**

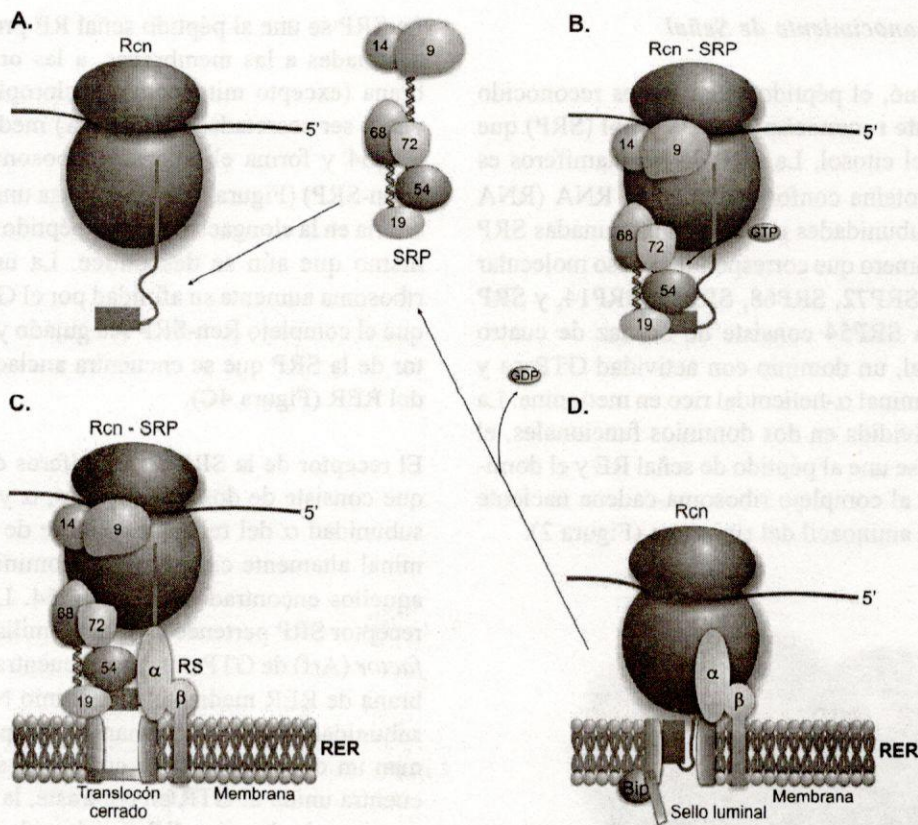
La SRP está constituida por un ARN (ARN-7SL) y sobre él se encuentran las seis proteínas SRP designadas por el número que corresponde al peso molecular en kDa. Presenta dos dominios: Alu y S, el dominio Alu es el que reconoce el péptido señal RE y el extremo S es el que interfiere en el sitio aminoacil impidiendo la síntesis proteica.

9, 14, 68, 72, 54 y 19: peso molecular en kDa de las proteínas SRP; ARN-7SL: ácido ribonucleico de 7 unidades de Svedberg de la SRP.

La SRP se une al péptido señal RE presente en proteínas destinadas a las membranas, a las organelas con membrana (excepto mitocondria y cloroplasto) o en las que van a ser secretadas (Figura 4A) mediante la subunidad SRP54 y forma el complejo ribosoma-cadena naciente (Rcn-SRP) (Figura 4B). Esto causa una interrupción transitoria en la elongación del polipéptido mediante un mecanismo que aún se desconoce. La unión de SRP54 al ribosoma aumenta su afinidad por el GTP, lo cual permite que el complejo Rcn-SRP sea guiado y asociado al receptor de la SRP que se encuentra anclado en la membrana del RER (Figura 4C).

El receptor de la SRP en mamíferos es un heterodímero que consiste de dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 4C). La subunidad  $\alpha$  del receptor consiste de un dominio N-terminal altamente cargado y un dominio GTP similares a aquellos encontrados en la SRP54. La subunidad  $\beta$  del receptor SRP pertenece a la subfamilia *ADP-ribosylation factor* (Arf) de GTPasas y se encuentra anclada a la membrana de RER mediante su dominio N-terminal. Las dos subunidades que conforman al receptor de la SRP forman un complejo estable cuando la subunidad  $\beta$  se encuentra unida al GTP, en contraste, la hidrólisis del GTP es capaz de disociar dichas subunidades.

Como ya se había mencionado, la afinidad de SRP54 por el GTP incrementa cuando la SRP se une al péptido señal RE de un péptido naciente y forma un complejo estable Rcn-SRP. De forma similar, la subunidad  $\alpha$  del receptor SRP posee una baja afinidad por el GTP que aumenta dramáticamente cuando el complejo Rcn-SRP se une al receptor de la SRP. Tras esta unión, las subunidades SRP54 y  $\alpha$  del receptor estimulan recíprocamente sus actividades GTPasas y la hidrólisis del GTP lleva a la disociación de la SRP de su receptor, retornando a su estado inicial libre y puede volver a realizar este proceso con otro péptido señal (Figura 4D). El complejo Rcn libre de la SRP interactúa con la subunidad  $\beta$  del receptor (que se encuentra unida al GTP) y estimula su actividad GTPasa induciendo la transferencia del péptido señal al translocón (Figura 4D). Se ha demostrado que la interacción de la subunidad  $\beta$  del receptor con el GTP y con el Rcn es esencial para la liberación del péptido señal RE de la SRP y para su transferencia al translocón, ya que en presencia de GDP, el péptido señal RE puede unirse mediante puentes cruzados con la SRP54, en contraste, en presencia de GMP una porción significativa del péptido señal se une mediante puentes cruzados al translocón. Tras la disociación de la SRP de su receptor, la elongación del polipéptido se continúa y el péptido creciente es translocado (o integrado) cotraduccionalmente a través de la membrana del RER.



**Figura 4. Unión de la SRP al péptido de señal RE y apertura del translocón.**

**A.** El péptido de señal RE en el ribosoma con la cadena peptídica nascente es reconocido por la SRP. **B.** La subunidad SRP54 se une al péptido de señal RE y el dominio Alu promueve un arresto transitorio en la elongación de la cadena polipeptídica y la SRP54 aumenta su afinidad por el GTP. **C.** El complejo Rcn-SRP difunde hacia la membrana del RER y se ancla con el receptor de la SRP a través de la interacción GTP dependiente entre SRP54 y la subunidad  $\alpha$  del receptor. **D.** La subunidad del receptor SRP  $\beta$  unida al GTP interactúa con el complejo Rcn e induce la transferencia del péptido señal hacia el translocón que abre el sello luminal. La subunidades SRP54 y  $\alpha$  del receptor activan mutuamente sus actividades GTPasas y la SRP se disocia del receptor, lo cual permite que se continúe la elongación del polipéptido. La SRP se une e hidroliza el GTP liberándose del complejo Rcn, en este momento el sello luminal del translocón se abre y la cadena peptídica nascente se ubica en el translocón.

Rcn: Ribosoma con la cadena peptídica nascente; SRP: partícula de reconocimiento del péptido señal RE; Rcn-SRP: complejo formado por el Rcn y la SRP; RS: receptor de la SRP; GTP: guanosín trifosfato; GDP: guanosín difosfato

### El translocón

El translocón es un complejo proteico dinámico y multifuncional que forma un poro acuoso que atraviesa la membrana del RER y facilita el paso de proteínas a través de dicha membrana. En mamíferos, el translocón se encuentra formado por el complejo heterotrimérico Sec61 $\alpha$  (Sec61 $\alpha\beta\gamma$  forma el poro acuoso) y TRAM (*translocating chain-associated membrane protein*) con otras proteínas asociadas. Las paredes del poro del translocón son formadas principalmente por 2-4 copias de Sec61 $\alpha$  que se oligomerizan para formar anillos con poros que fluctúan en su apertura entre unos 1,5 nm en su estado inactivo a unos 4 a 6 nm durante la translocación proteica. Estos anillos a su vez se alinean coaxialmente con el túnel de salida de la cadena nascente en el ribosoma. La cadena peptídica liberada de la SRP entra en contacto con la membrana del RER (Figura 4C). Esta interacción activa a los elementos del translocón y una vez que la cadena nas-

te alcanza una longitud umbral, el sello luminal se abre por mediación de la BiP, una chaperona de choque térmico 70 (Hsp70) presente en el lumen del RE (Figura 4D), formándose así, el poro acuoso en la membrana del RER (Figura 5). La cadena peptídica sigue creciendo y atraviesa el poro a medida que forma un bucle, ya que el carácter hidrofóbico del péptido señal RE hace que éste se quede anclado en el translocón durante la síntesis proteica (Figura 5).

A medida que la síntesis proteica continúa, diferentes regiones de la cadena nascente deben ser dirigidas hacia el citosol, el lumen o la bicapa. En el caso de las proteínas que serán translocadas al lumen del RER o de aquellas que tendrán un dominio transmembranal y otro luminal, una estrecha unión iónica formada entre el translocón y el Rcn evita el paso de la cadena nascente hacia el citosol, de esta forma direcciona la cadena hacia el lumen del RER (Figura 5). Una vez finalizada la síntesis proteica (Figura

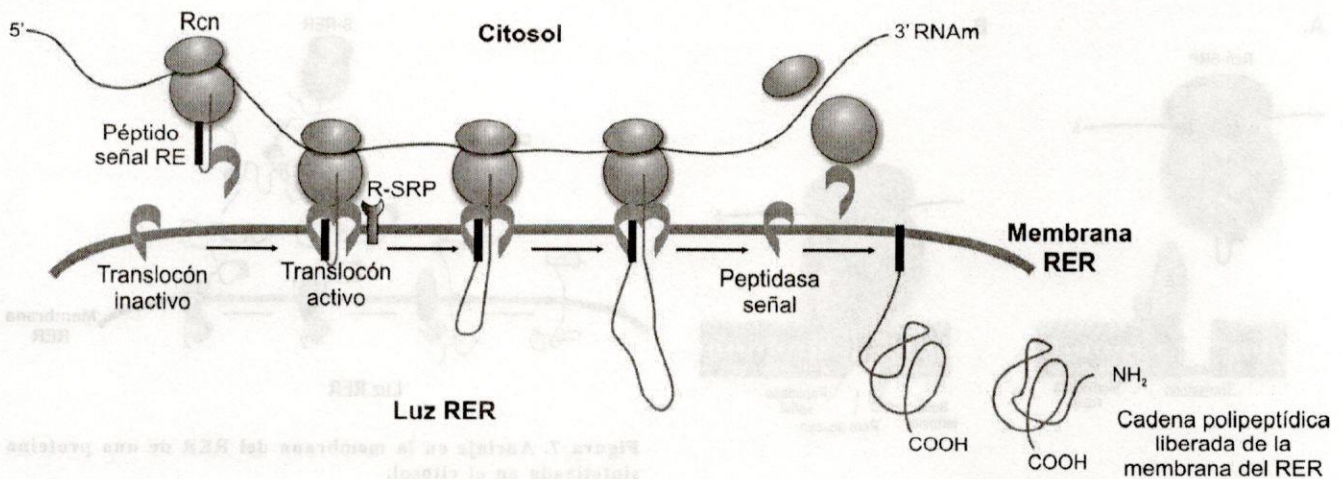


Figura 5. Esquema de penetración de la cadena naciente a través de la membrana del RER por el translocón y culminación de la síntesis en el RER.

Inicialmente se forma el translocón, luego ocurre el paso de la cadena peptídica naciente a través del translocón unido al receptor de la SRP  $\alpha$  y  $\beta$  (R-SRP). Posteriormente el péptido de señal RE se ubica en el poro acuoso del translocón y ocurre la apertura del sello luminal. Continuación de la síntesis peptídica en el RER. Finalmente se produce la proteólisis del péptido señal RE y liberación de la proteína en la luz del RER.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero; RER: retículo endoplásmico rugoso; Mem. RER: membrana del RER; NH<sub>2</sub>: extremo amino terminal de la proteína; COOH: extremo carboxil terminal de la proteína.

5) o en algunos casos en etapas anteriores (Figura 6 C), el péptido señal RE es separado de la cadena peptídica recién sintetizada por acción de la **peptidasa de señal**, la cual se encuentra presente en el RER. De esta forma, la proteólisis del péptido señal RE puede dejar la proteína sintetizada en dos posiciones diferentes. En la primera posición, en la que la translocación proteica es total, es decir que el último aminoácido de la proteína entra a la luz del RER, se libera completamente la proteína en dicho compartimiento. Estas proteínas pueden tener dos destinos: hacia el exterior de la célula como producto de secreción o hacia el interior de otros organelos con membrana (Figura 5). En la segunda posición, en la que la translocación no es completa (Figura 6), ciertos dominios proteicos no atraviesan totalmente la membrana del RER y quedan insertados o anclados en ella (Figuras 6C, D, E). Estas proteínas con dominios de membrana van a conformar las proteínas de las diferentes membranas de la célula, excepto las de mitocondrias y cloroplastos.

Cuando se sintetizan las proteínas de membrana, para impedir una translocación completa, dichas proteínas, además del péptido señal RE (que es eliminado por acción de la peptidasa señal), poseen otro péptido señal (Figuras 6C, D) que no es eliminado, en lugar de esto, tales secuencias se mueven lateralmente hasta la bicapa para formar un dominio de secuencia transmembranal (TMS) denominado señal de anclaje (anteriormente denominado pare de transferencia peptídico) (Figura 6C).

En el caso de una proteína politópica, es decir con varias regiones transmembranosas, se presume que el poro del translocón es alternativamente sellado en sus extremos

citosólico y luminal por medio del sello iónico Rcn-translocón y de la BiP, respectivamente. De esta forma, en la síntesis y translocación de proteínas, el poro nunca se encuentra en un continuo acuoso entre el citosol y el lumen del RER, ya que durante la translocación de dominios luminales, el poro es sellado en la cara citosólica por la unión iónica estrecha Rcn-translocón; alternativamente, durante la síntesis de dominios citosólicos, el extremo luminal del poro es sellado por acción de BiP.

### Señales de direccionamiento

Como se ha mencionado, todas las proteínas empiezan su síntesis en el citosol (salvo algunas proteínas dentro de la mitocondria y de los plastidios). Su destino ulterior depende de la secuencia de sus aminoácidos que puede contener las **señales de direccionamiento** (*sorting signals*), las cuales permiten orientar la localización de la proteína fuera del citosol. La mayoría de las proteínas sintetizadas por los polirribosomas no tienen una señal de direccionamiento y en consecuencia permanecen en el citosol. Muchas otras, sin embargo, tienen señales de direccionamiento específicas que orientan su transporte hacia el núcleo, o al RE, o a las mitocondrias, o a los plastidios, o a los peroxisomas.

Además del péptido señal RE, que determina el paso a través de la membrana del RER, existe otro mecanismo por el cual proteínas sintetizadas en los polirribosomas atraviesan la membrana del RER, sin embargo parece ser poco frecuente. Existen proteínas citosólicas que reconocen proteínas específicas sintetizadas en el citosol que tienen una secuencia llamada señal de direccionamiento

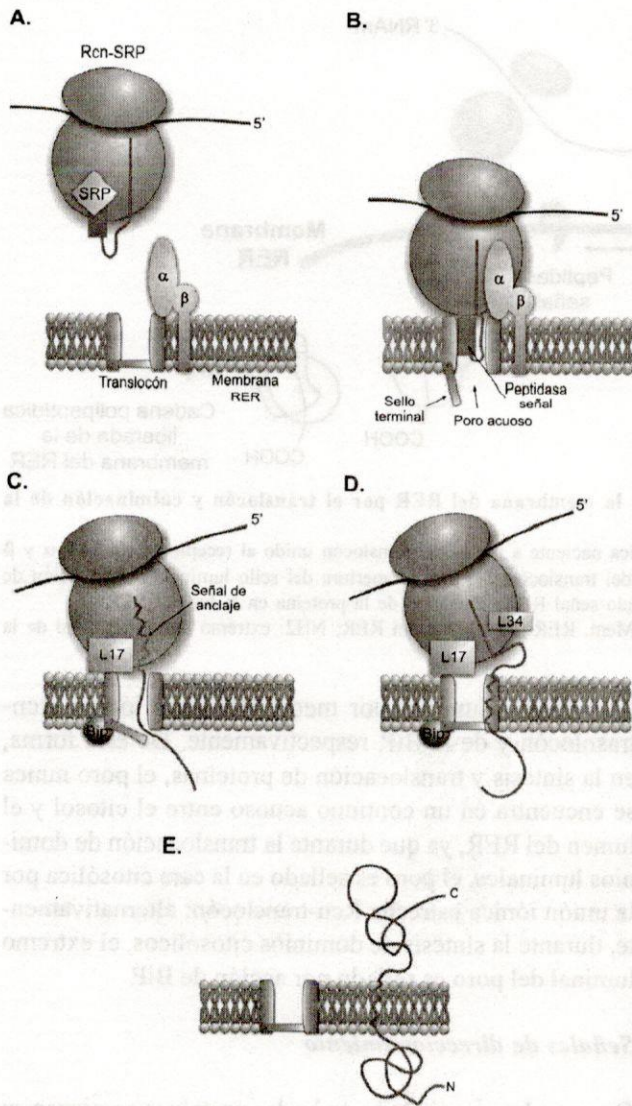


Figura 6. Esquema de inserción de las proteínas en la membrana del RER.

A. El complejo Rcn-SRP difunde al RER donde es reconocido por el receptor de la SRP  $\alpha$  y  $\beta$ . B. El receptor se une con la SRP, y el Rcn se une fuertemente al translocón y el sello luminal se libera. El translocón cambia su modo de translocación a integración, es posible que en este paso la peptidasa señal separe el péptido de señal RE. C. Liberación de la unión iónica Rcn-translocón y síntesis del dominio de secuencia transmembranal (señal de anclaje). D. Anclaje del péptido de transferencia en el translocón, cierre del sello luminal por la proteína chaperona BiP y síntesis del dominio citosólico. E. La proteína madura se inserta en la membrana y el ribosoma se libera.

Rcn: Ribosoma con la cadena peptídica nascente; SRP: partícula de reconocimiento del péptido señal RE; Rcn-SRP: complejo formado por el Rcn y la SRP;  $\alpha\beta$ : receptor de la SRP; N: extremo amino terminal de la proteína; C: extremo carboxil terminal de la proteína.

para el RER y las transportan al RER (Figura 7 S.RER). Dos familias diferentes de proteínas reconocen las señales peptídicas diferentes al péptido señal RE: las proteínas chaperonas y las proteínas Hsp70 del citosol. Aparentemente las proteínas chaperonas y las Hsp70 intervienen

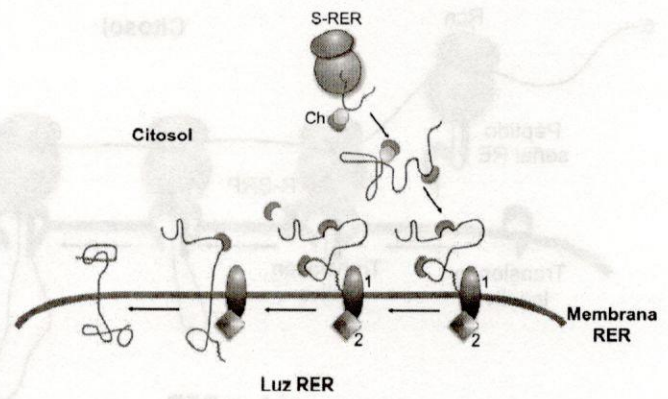


Figura 7. Anclaje en la membrana del RER de una proteína sintetizada en el citosol.

S.RER: señal de direccionamiento para el RER; Ch: proteína chaperona; RER: Reticulo Endoplásmico Rugoso; 1 y 2: proteínas que permiten el paso y la inserción de la proteína en la membrana del RER.

en el desplegamiento de las proteínas sintetizadas por los polirribosomas, y las acompañan hasta su destino final incluyendo la translocación a través de la membrana blanco, como en las membranas de las mitocondrias y de los cloroplastos. El mismo mecanismo puede intervenir para la inserción (o anclaje) en la membrana del RER de proteínas sintetizadas en el citosol con señal de direccionamiento para el RER. En la membrana del RER existen dos proteínas que intervienen en la translocación de las proteínas con señal de direccionamiento RER sintetizadas por los polirribosomas y transportadas por las Hsp70 (Figura 7 S.RER). Estas dos proteínas de la membrana del RER actuarían como el aparato translocador (Figura 7 - 1 y 2). Existen también translocaciones a través de la membrana del RER de proteínas sin señales en sus extremos amino terminal, pero su mecanismo no se conoce. Este direccionamiento sugiere la existencia de otras señales, diferentes al péptido señal RE, que determinan el destino final de una proteína, no solamente para el RER sino para otros organelos como las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas y el núcleo.

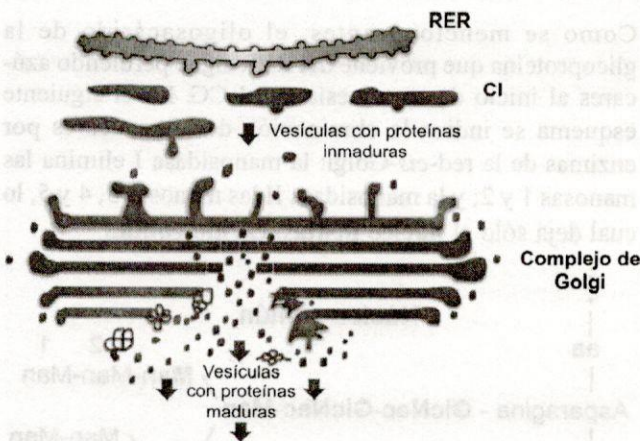
Efectivamente, se han identificado **señales de parche o internas**, que están constituidas por pequeñas secuencias de 3 a 4 aminoácidos dispersas en la cadena peptídica que se orientan en una misma región de la proteína cuando se repliega. La señal de parche de algunas proteínas destinadas al núcleo interactúa con el complejo del poro nuclear para poder atravesarlo. Se piensa que estas señales determinan su reconocimiento por las proteínas chaperonas o de choque térmico que las transportan a través del citosol para que lleguen a la organela blanco.

Las proteínas destinadas a las mitocondrias presentan una señal en el extremo amino de la proteína y se caracteriza

por tener 15 aminoácidos básicos (principalmente arginina y lisina) intercalados entre los primeros 30 aminoácidos, denominado **péptido señal Mit** (antes se llamaba secuencia líder). Algunas proteínas tienen señales parche de aminoácidos no cargados. Se han identificado receptores en las dos membranas de la mitocondria que interactúan con las señales, y aparatos translocadores de proteínas por donde atraviesan las proteínas a la mitocondria. En las proteínas destinadas a los cloroplastos se presenta también un **péptido señal Clo**, similar al de la mitocondria. Las proteínas de la tercera membrana del cloroplasto, la tilacoidea, tienen un **péptido señal Til** localizado inmediatamente después del péptido señal Clo. En la matriz de estas dos organelas se encuentra la peptidasa de señal que elimina los péptidos señales cuando la proteína ingresa a ellas.

Por último, se han encontrado péptidos de señales de "estancia" o "permanencia" en un compartimiento preciso de la célula, como la que se encuentra en las proteínas que se quedan en la luz del RER, denominada **señal de retención del RER**. Las señales de retención del RER son motivos en la secuencia peptídica que son reconocidos en la luz de la organela y hacen que la proteína se queden en esta organela. Entre estos motivos se encuentran el di-lisina en el extremo carboxil terminal y el di-arginina en el extremo amino terminal.

Las proteínas sintetizadas en el RER viajan dentro de vesículas hasta el complejo de Golgi (CG). En otros casos se forman túbulos tapizados que se liberan del RER con las proteínas en su interior y se fusionan con la membrana del complejo de Golgi (Figura 8).



**Figura 8. Esquema del complejo de Golgi.**  
Red-cis-Golgi. Cisternas medial. Cisternas trans. Red-trans-Golgi.  
RER: retículo endoplásmico rugoso; CI: compartimiento intermedio.

## Maduración de las proteínas

Una vez sintetizadas en el citosol o en el RER muchas proteínas sufren modificaciones covalentes en su estructura, de manera que este proceso de maduración postraducional es esencial para lograr una actividad funcional completa.

### Maduración en el RER

Muchas de las proteínas sintetizadas en el RER sufren la maduración en el mismo RER o en el CG, sin embargo en otras ocasiones las modificaciones se inician en el RER y se culminan en el CG o en las vesículas de secreción o incluso en el exterior de la célula.

Uno de los fenómenos más conocidos de modificación postraducional es la formación de puentes de disulfuro. Esto ocurre gracias a que la proteína disulfuro isomerasa cataliza la oxidación del grupo sulfidril libre de las cisteínas para formar uniones disulfido o **puentes disulfuro**, que permiten a la cadena polipeptídica replegarse y adquirir su estructura terciaria (Ver capítulo sobre traducción).

Muchas de las proteínas sintetizadas en el RER son **glicosiladas** en este organelo dando origen a las glicoproteínas. El proceso de glicosilación proteica mejor conocido es el de la transferencia en bloque de un oligosacárido compuesto por 2 *N*-acetilglucosaminas (GlcNac), 9 manosas (Man) y 3 glucosas (Glc) al grupo amino de la asparagina en la proteína naciente que comienza su translocación a la luz del RER (modificación cotraduccional). Esta unión se denomina ***N*-osídica** o **unión a la asparagina**. En la transferencia de este oligosacárido  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  a la asparagina interviene una molécula lipídica anclada en la membrana del RER llamada dolicol, sobre el cual la cadena oligosacáridica está fijada por medio de un pirofosfato (Figura 9). La enzima oligosacaril transferasa, cerca de la membrana, traspasa en bloque la cadena oligosacárida desde el dolicol fosfato a la cadena peptídica naciente. A todas las glicoproteínas *N*-osídicas se les une inicialmente este oligosacárido, aunque sufran otras modificaciones durante su maduración final: se eliminan cuatro azúcares en el RER y otros cinco en el CG, para dejar un **núcleo pentasacárido común**, el cual se muestra en el siguiente esquema:

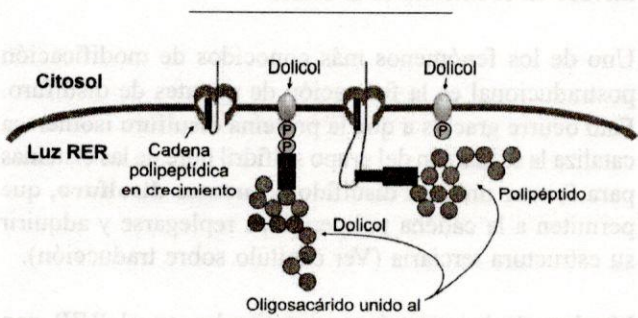
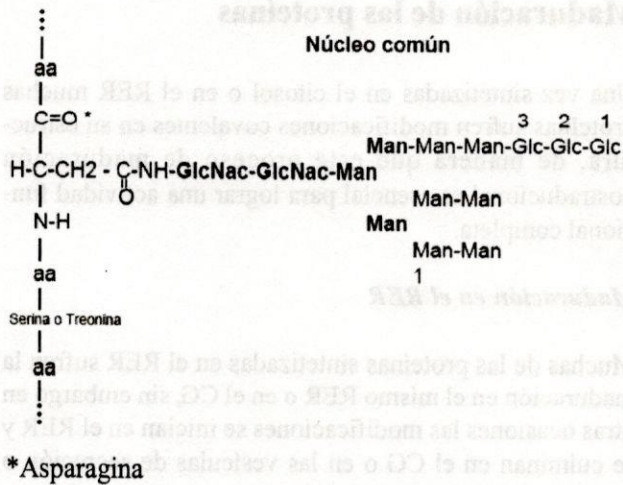
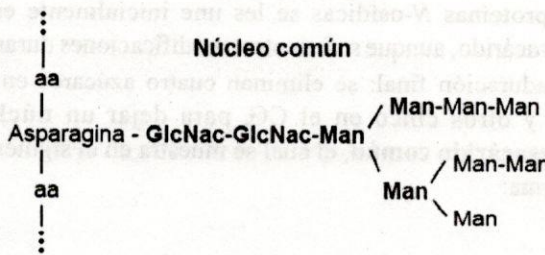


Figura 9. Iniciación de la glicosilación N-ósídica de las proteínas en el RER.

El dolicol fosfato traspa en bloque la cadena oligosácarida a la cadena peptídica naciente en la luz del RER mediado por la enzima oligosacril transferasa.

Mem: membrana del RER; Asn: asparagina; P: fosfato; □: N-acetilglucosamina; ○: Manosa; △: Glucosa.

Se conoce que la eliminación de residuos de azúcares en el RER ocurre de la siguiente manera: la glucosidasa I elimina la glucosa 1, la glucosidasa II elimina las glucosas 2 y 3, mientras que la manosidasa elimina la manosa 1. Esta modificación postraducciónal da como resultado el siguiente glicopéptido, el cual viaja del RER al CG en vesículas:



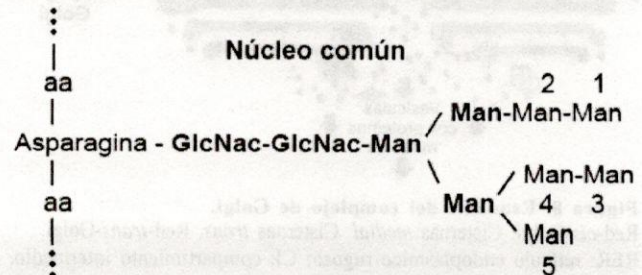
## Maduración en el complejo de Golgi

El complejo de Golgi se localiza generalmente cerca del núcleo y en las células animales rodea el centrosoma. Generalmente se organiza como un conjunto de cisternas empiladas, delgadas, con dilataciones en los bordes que están rodeadas de muchas vesículas (Figura 8). Entre el RER y el CG se encuentran unas cisternas dilatadas en forma de túbulos denominado compartimiento intermedio (CI) que es continuación del RER pero no presenta ribosomas. El CG se agrupa en tres regiones denominadas *cis*, *medial* y *trans* (Figura 8). La región *cis* está constituida por redes tubulares orientadas hacia el RER, por eso se le llama red-*cis*-Golgi. La red-*cis*-Golgi se continúa con la región *medial* constituida por cisternas delgadas en el centro y dilatadas en la periferia. La región *trans* se subdivide en dos: la primera constituida por cisternas discontinuas en el centro de la organela, se dilatan hacia la periferia y hacia al centro formando una red tubular; la segunda, constituida por redes tubulares asociadas en forma de esfera, denominada red-*trans*-Golgi. La red-*trans*-Golgi varía en su estructura en diferentes tipos celulares, y su tamaño depende de la cantidad de tráfico de proteínas a través de ella.

El CG tiene doble polaridad: una morfológica y otra funcional. Las proteínas recién sintetizadas en el RER viajan en vesículas y entran al CG por la red-*cis*-Golgi, pasan el empilamiento de las cisternas *medial* y *trans* y luego la red-*trans*-Golgi para dirigirse hacia su destino. El destino final de estas proteínas se determina durante este viaje donde las proteínas sufren la maduración. Las vesículas con una dirección ya determinada dejan el CG a nivel de la red-*trans*-Golgi.

## Glicosilación

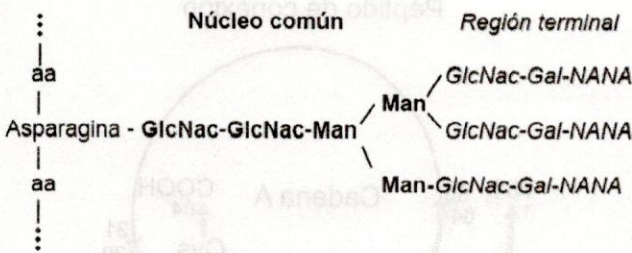
Como se mencionó antes, el oligosacárido de la glicoproteína que proviene del RER sigue perdiendo azúcares al inicio de su travesía en el CG. En el siguiente esquema se indica la eliminación de los azúcares por enzimas de la red-*cis*-Golgi: la manosidasa I elimina las manosas 1 y 2; y la manosidasa II las manosas 3, 4 y 5, lo cual deja sólo el **núcleo pentasacárido común**.





En algunas glicoproteínas sólo se eliminan dos residuos de manosa, lo cual da origen a una glicoproteína cuya ramificación glucosídica se llama **oligosacárido de tipo rico en manosa**.

Las cadenas oligosacarídicas cuyas cinco manosas se eliminan quedan sólo con el núcleo pentasacárido común. Sobre las dos manosas libres se añaden primero la *N*-acetilglucosamina (GlcNac) en la cisterna *medial*, enseguida la galactosa (Gal) y por último el ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico o NANA) en las cisternas *trans*. Así se forman las glicoproteínas más abundantes y cuya ramificación glucosídica se llama **oligosacárido de tipo complejo**.



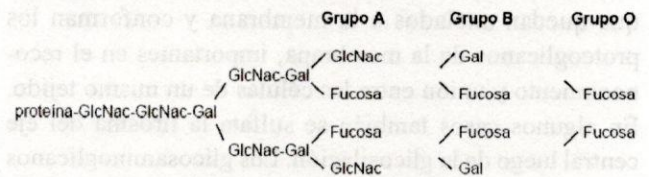
**Oligosacárido de tipo complejo**

En el anterior esquema se muestra el oligosacárido complejo de las glicoproteínas más común, el triantenario o de tres ramas, pero pueden ser también dos o cuatro ramificaciones. Además, se pueden encontrar ramificaciones en las galactosas. La fucosa puede adicionarse sobre el GlcNac del núcleo común. Frecuentemente la región terminal puede ser truncada y contener solo GlcNac y Gal, o solamente GlcNac.

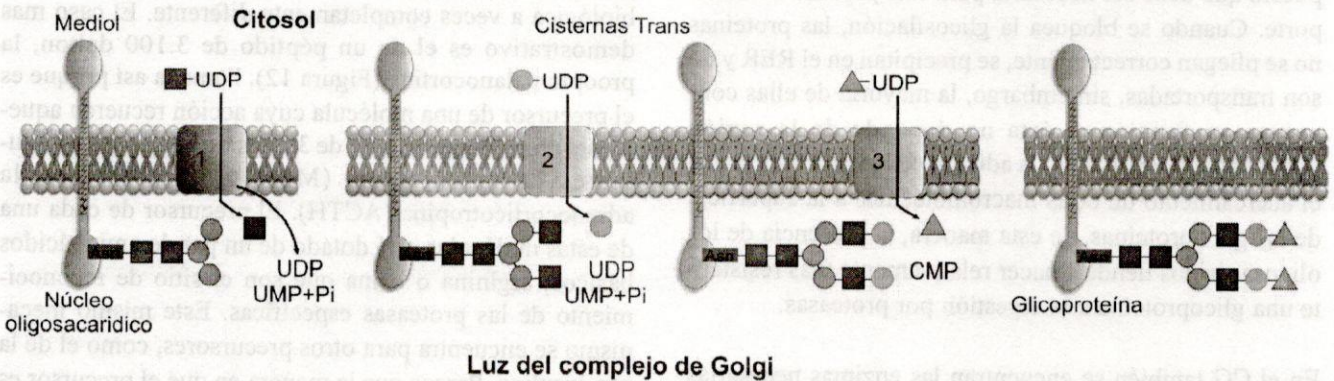
La formación de la región terminal sobre el núcleo pentasacárido es realizada por tres enzimas

glicosiltransferasas que se encuentran en la membrana de las diferentes regiones del CG. Estas enzimas actúan en forma secuencial, para que el orden de adición sea de uno en uno. Los azúcares son activados en el citosol por la unión de un nucleótido (Figura 10) y atraviesan la membrana del CG gracias a las glicosiltransferasas que se encuentran en la membrana de las regiones del CG. Las mismas enzimas añaden el azúcar al núcleo común de oligosacáridos en la luz del organelo.

Los motivos oligosacáridos de las glicoproteínas tienen muchas funciones: pueden intervenir en los fenómenos de reconocimiento entre las células o el direccionamiento hacia un tipo celular específico. Por ejemplo, los hepatocitos de mamíferos poseen un receptor para la galactosa, que captan las glicoproteínas con oligosacárido complejo cuando pierden su ácido siálico (NANA) terminal por acción de una neuroaminidasa en el plasma. Así los hepatocitos sacan estas proteínas desactivadas de la circulación en pocos minutos. Otro ejemplo, es el sistema ABO de los grupos sanguíneos que están determinados por los azúcares externos de la región terminal como se muestra en el siguiente esquema:



El grupo A está determinado por dos residuos de GlcNac terminales, mientras que en el grupo B éstos son reemplazados por la Gal; por su parte el grupo O no contiene azúcares en estas posiciones y la ramificación termina en las dos fucosas comunes de los tres grupos sanguíneos. El grupo AB se caracteriza por terminar con un GlcNac y una Gal en estas posiciones.



**Figura 10. Síntesis en el CG de la región terminal de oligosacáridos complejos sobre una glicoproteína de membrana.** La región terminal se forma por la adición secuencial de *N*-acetilglucosamina (■) por la *N*-acetilglucosamin-transferasa (1) en las cisternas *medial*, la galactosa (○) por la galactosiltransferasa (2) y el *N*-acetilneuramínico o ácido siálico (▲) por la *N*-acetilneuramin-transferasa (3) en las cisternas *trans*. La glicoproteína formada sale de la red-*trans*-Golgi anclada en la membrana de una vesícula. Asn: asparagina; UDP: uridín difosfato; UMP: uridín monofosfato; Pi: fosfato inorgánico; CMP: Citidín monofosfato.

En el CG, además de la glicosilación *N*-osídica también se realiza la *O*-osídica, la cual ocurre sobre la serina, la treonina o la hidroxilisina, sin embargo este fenómeno es mucho menos frecuente (un 10% de las glicoproteínas sintetizadas por las células son glicosiladas en el CG por medio de una unión *O*-osídica) y su mecanismo es muy poco conocido. Generalmente comienza con *N*-acetilglucosamina, seguido de unos 10 o más azúcares.

Los proteoglicanos, componentes abundantes de la matriz extracelular y del *mucus*, están constituidos por un eje central proteico y por muchas cadenas largas de azúcares que se unen al eje proteico. La glicosilación de los proteoglicanos se hace inicialmente sobre las serinas donde se forma un tetrasacárido constituido por la xilosa seguida de dos galactosas y un ácido glucurónico. Sobre el ácido glucurónico se adicionan disacáridos repetidos en un gran número conformando la región de glicosaminoglicanos de los proteoglicanos. Estos disacáridos son *N*-acetilglucosamina unido a otro azúcar, que pueden ser el ácido glucurónico, el heparán sulfato, el queratán sulfato o la galactosa. Existen proteoglicanos que quedan anclados a la membrana y conforman los proteoglicanos de la membrana, importantes en el reconocimiento y unión entre las células de un mismo tejido. En algunos casos también se sulfata la tirosina del eje central luego de la glicosilación. Los glicosaminoglicanos son ensamblados en el CG e inmediatamente después son sulfatados en el mismo organelo.

La glicosilación *N*-osídica se presenta en todas las células eucarióticas incluyendo las levaduras y está ausente en las procarióticas. Este tipo de glicosilación se encuentra en la gran mayoría de las glicoproteínas (90%) transportadas a través del RER y del CG, por lo cual se ha propuesto que debe ser necesaria para este proceso de transporte. Cuando se bloquea la glicosilación, las proteínas no se pliegan correctamente, se precipitan en el RER y no son transportadas, sin embargo, la mayoría de ellas conservan su función si ésta no depende de la región glicosilada. De otro lado, la adición de los azúcares limita el acercamiento de otras macromoléculas a la superficie de las glicoproteínas, de esta manera, la presencia de los oligosacáridos tiende a hacer relativamente más resistente una glicoproteína a la digestión por proteasas.

En el CG también se encuentran las enzimas necesarias para la glicosilación de los lípidos y la elongación de las cadenas oligosacáridicas de los glicolípidos, pero su mecanismo aún no se conoce.

### Corte proteolítico (proteolisis)

Por lo general las proteínas sintetizadas en el RER que van a ser secretadas sufren un corte enzimático en la cadena peptídica. Esta es otra modificación que permite la maduración de proteínas. Las reacciones de proteolisis se realizan en el tránsito de las proteínas por el CG y se continúan hasta la exocitosis del producto de secreción. Un ejemplo típico es la conversión de la pro-insulina en insulina (Ver figura 11 y capítulo sobre traducción), que se realiza por medio de la separación del péptido de conexión de la pro-insulina. La precisión de esta proteólisis implica la acción de peptidasas específicas.

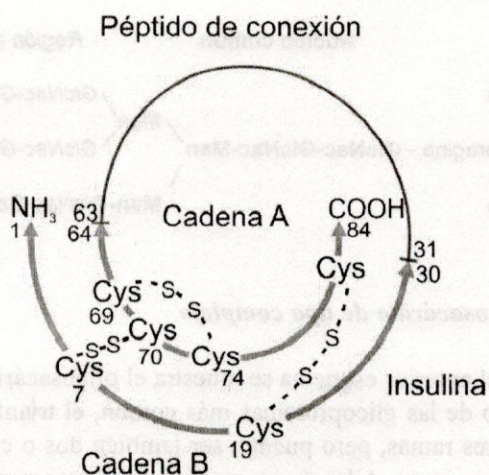
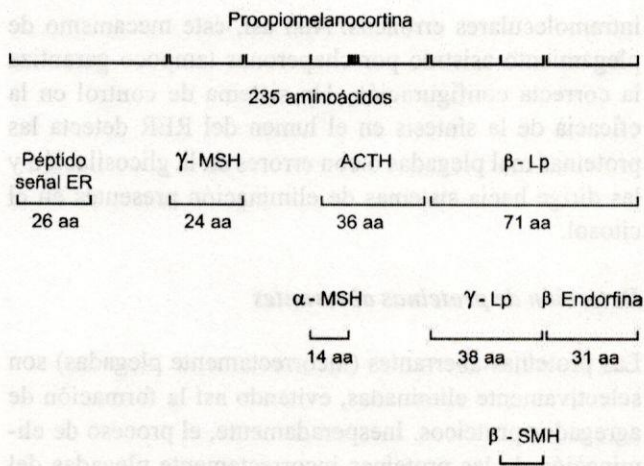


Figura 11. Esquema de la separación proteolítica de la pro-insulina en insulina.

La pro-insulina está compuesta por un polipéptido de 84 aas, para volverse insulina es separada en el aa 30 y 63, dejando las cadenas A y B unidas por dos puentes disulfuros.

A partir de una cadena peptídica, **poliproteína**, la proteólisis puede generar distintas proteínas de actividad biológica a veces completamente diferente. El caso mas demostrativo es el de un péptido de 3.100 dalton, la proopiomelanocortina (Figura 12), llamada así porque es el precursor de una molécula cuya acción recuerda aquella del opio ( $\beta$ -endorfina), de 3 tipos de hormonas estimulantes de melanocitos (MSH  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y de la adrenocorticotropina (ACTH). El precursor de cada una de estas moléculas está dotado de un par de aminoácidos básicos, arginina o lisina que son el sitio de reconocimiento de las proteasas específicas. Este mismo mecanismo se encuentra para otros precursores, como el de la pro-insulina. Parece que la manera en que el precursor es cortado puede modificarse ya sea de acuerdo al tipo celular o ya sea según las circunstancias fisiológicas dentro de un mismo tipo celular.



**Figura 12. Separación proteolítica de la proopiomelanocortina.** En la cadena polipeptídica del precursor, las argininas y las lisinas que sirven de referencia para la separación por acción de las proteasas están indicadas por las líneas verticales. MSH: hormona estimulante de melanocitos; ACTH: adrenocorticotropina; Lp: lipotropina.

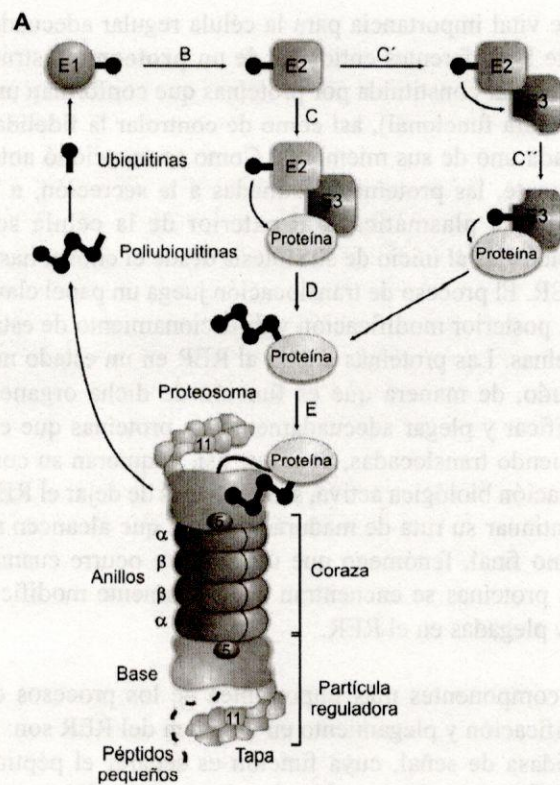
Es importante mencionar también la proteólisis extracelular que se presenta en un gran número de productos de secreción como las enzimas digestivas: quimiotripsinógeno y tripsinógeno. La secreción de estas moléculas como precursores no activos es un mecanismo de protección de la célula, para luego ser activadas en el tubo digestivo. Este mismo mecanismo se encuentra en numerosas proteínas del plasma como por ejemplo las responsables de la coagulación.

Además de las anteriores modificaciones que maduran las proteínas y los lípidos, el CG adiciona también metales, grupos sulfatos y fosfatos, y lípidos a las proteínas. El zinc, los grupos sulfatos o fosfatos, o los proteoglicanos facilitan la concentración de moléculas en las vesículas de secreción. Por ejemplo, la adrenalina se puede concentrar 100.000 veces más en las vesículas de secreción que la del citosol por la adición de grupos sulfatos.

### Maduración en el citosol

Las proteínas sintetizadas en los polirribosomas sufren también algunas modificaciones, no se han encontrado glicosiladas o aciladas, pero tiene que replegarse adecuadamente o unirse varias cadenas peptídicas para formar la proteína madura y funcional. Las proteínas chaperonas de choque térmico 70 y 60 reciben a las moléculas sintetizadas por los polirribosomas, intervienen en el replegamiento adecuado de las cadenas peptídicas y en sus uniones.

Por su parte, las proteínas que no logran la configuración adecuada para su funcionamiento o proteínas de vida media corta en el citosol son marcadas con ubiquitinas y son degradadas rápidamente por el proteosoma en el citosol. Este sistema se denomina **ubiquitina-proteosoma**, el cual se describió inicialmente para la degradación de proteínas citosólicas de vida corta como las que intervienen en el control del paso de metafase a anafase. Este sistema consiste en la adición de varias pequeñas moléculas, llamadas ubiquitinas, a la proteína que va a ser degradada, esto lo realizan las enzimas de ubiquitinación E1 (enzima activadora), E2 (enzima conjugadora de ubiquitinas) y E3 (ubiquitina ligasa), luego la proteína con mínimo cuatro ubiquitinas pasa al proteosoma donde se realiza la proteólisis (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de la ubiquitinación de una proteína aberrante y su proteólisis por el proteosoma.** A. La ubiquitina se une a la **enzima-activadora (E1)** de ubiquitinas. B. La E1 transfiere la ubiquitina a una **enzima-conjugadora de ubiquitinas (E2)**. C. La ubiquitina es transferida de la E2 a la **ubiquitina-ligasa (E3)** que a su vez liga la ubiquitina a la proteína aberrante para ser degradada por el proteosoma. C'. Traspaso de la ubiquitina de la E2 a la E3 directamente. C''. Traspaso de la ubiquitina de la E3 a la proteína aberrante. D. Poliubiquitinación de la proteína que fue marcada con una ubiquitina por la E3. E. Entrada al proteosoma de la proteína aberrante. Liberación de la cadena de poliubiquitinas y reciclaje de las ubiquitinas. Salida de pequeños péptidos producto de la proteólisis de la proteína aberrante realizada por el proteosoma. α y β: subunidades de la coraza del proteosoma eucariótico de 26S; 11: proteína Rpn11 de la partícula de regulación con actividad metaloisopectidasa que libera la cadena poliubiquitina de de la proteína aberrante. 5: proteína de la base Rpt5 que se une a la cadena de poliubiquitinas impidiendo su entrada al proteosoma.

## Eficacia de la síntesis de proteínas asociadas al RER

La síntesis de proteínas requiere de un control que asegure una síntesis y configuración final que les permita a estas moléculas ejercer una función adecuada en su destino final. A continuación se describen los procesos que realiza la célula cuando una proteína no queda correctamente plegada o presenta errores en la glicosilación de las proteínas sintetizadas en el RER. En el citosol ocurre este mismo control y se hace directamente sin necesidad de atravesar una membrana celular.

### *Plegamiento y maduración proteica en el RE*

Es de vital importancia para la célula regular adecuadamente las diferentes entidades de un **proteoma** (estructura celular constituida por proteínas que conforman una estructura funcional), así como de controlar la fidelidad de cada uno de sus miembros. Como se mencionó anteriormente, las proteínas destinadas a la secreción, a la membrana plasmática o al exterior de la célula son translocadas al inicio de su síntesis desde el citosol hasta el RER. El proceso de translocación juega un papel clave en la posterior modificación y direccionamiento de estas proteínas. Las proteínas entran al RER en un estado no plegado, de manera que es función de dicha organela modificar y plegar adecuadamente las proteínas que están siendo translocadas, para que así, adquieran su conformación biológica activa, sean capaces de dejar el RER y continuar su ruta de maduración para que alcancen su destino final, fenómeno que únicamente ocurre cuando estas proteínas se encuentran adecuadamente modificadas y plegadas en el RER.

Los componentes más importantes de los procesos de modificación y plegamiento en el lumen del RER son: la peptidasa de señal, cuya función es separar el péptido señal de la proteína translocada; el complejo oligosacaril transferasa, que lleva a cabo la N-glicosilación; y la proteína disulfuro isomerasa, que participa en la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, a veces estos procesos presentan errores que llevan a una incorrecta estructura final produciendo proteínas inactivas aberrantes, que si no son adecuadamente tratadas forman agregados proteicos. Para disminuir estos errores, un complejo sistema de chaperonas que se encuentran especialmente activas en el lumen del RER, asisten al proceso de plegamiento a través de un mecanismo ATP-dependiente. Las proteínas que son liberadas del translocón son inmediatamente asistidas por chaperonas, previniendo así, que superficies hidrofóbicas generen contactos inter o

intramoleculares erróneos. Aún así, este mecanismo de plegamiento asistido por chaperonas tampoco garantiza la correcta configuración. Un sistema de control en la eficacia de la síntesis en el lumen del RER detecta las proteínas mal plegadas o con errores en la glicosilación y las dirige hacia sistemas de eliminación presentes en el citosol.

### *Detección de proteínas aberrantes*

Las proteínas aberrantes (incorrectamente plegadas) son selectivamente eliminadas, evitando así la formación de agregados proteicos. Inesperadamente, el proceso de eliminación de las proteínas incorrectamente plegadas del RER es dependiente del sistema citosólico ubiquitina-proteosoma, por lo que es necesario que exista una **retrotranslocación** (o **dislocación**) de las proteínas aberrantes a través de la membrana de esta organela. El mecanismo de control se rige por las variantes estructurales incluyendo secuencias primarias, modificaciones post-traduccionales y estado de plegamiento proteico y no por la función de la proteína.

Como ya se describió, en las células de mamíferos, a medida que las proteínas son translocadas a través de la membrana del RER se le unen oligosacáridos esenciales de la estructura  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  a la cadena peptídica naciente (Figura 9). Luego los 2 primeros residuos de glucosa expuestos hacia la parte exterior, son recortados por las glucosilasas I y II, dejando una glucosa expuesta hacia el interior de la proteína, lo cual permite que esta proteína monoglicosilada se una con la calnexina y con la calreticulina. Cuando el residuo de glucosa remanente es recortado por la glucosilasa II, el complejo se disocia liberando una proteína con la estructura  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Si la glicoproteína se encuentra incorrectamente plegada, el N-glicano,  $\text{N-Man}_9\text{GlcNAc}_2$  es re-glicosilado en la misma posición por una UDP-glucosa glucosiltransferasa, lo cual induce a que la glicoproteína pase por una nueva ronda de unión calnexina/calreticulina, que a su vez, evita que la proteína escape del RER. Si el anterior ciclo persiste debido a la inhabilidad de la glicoproteína de alcanzar su conformación nativa final, la manosidasa I separa la manosa  $\alpha 1,2$ -unida de la rama central, generando un glicano con la estructura  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  que es reconocida por una lectina específica o debido a la lenta liberación de la forma reglicosilada ( $\text{Glc}_1\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ) de la calnexina, estos eventos van a determinar el direccionamiento y entrega de las glicoproteínas incorrectamente plegadas a la maquinaria de eliminación para su retrotranslocación (o dislocación) hacia el citosol donde son degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma.

### **Retrotranslocación de proteínas**

Todos los componentes asociados a la maquinaria de ubiquitinación identificados hasta el momento son citosólicos o se encuentran en la cara citosólica de las membranas. Debido a lo anterior, las proteínas aberrantes presentes en el lumen del RER deben ser extraídas de dicho compartimiento hacia el citosol, donde la maquinaria de degradación ubiquitinas-proteosoma las degradan. Aunque poco se conoce sobre este proceso, se piensa que la retrotranslocación ocurre vía un canal acuoso similar al canal de importación (Sec61) del translocón, sin embargo, se presume que este canal de exportación diferiría en composición de su análogo de importación. Las características de dichos canales permiten el transporte de proteínas a través del ambiente hidrofóbico presente en la membrana del RER mientras proveen un estrecho sello previniendo escapes de otras moléculas.

La retrotranslocación de las proteínas aberrantes necesita de un mecanismo de redireccionamiento hacia dicho canal acuoso de exportación. Posibles componentes involucrados en el redireccionamiento, que actuarían en forma cooperativa son: la disulfuro isomerasa, una lectina (Htm1p/Mnl1p), la Der1p del RER (función aún desconocida), la BiP (Kar2p) que abre el sello luminal del translocón y una proteína de membrana del RER (Hrd3p) que funciona en conjunto con la ubiquitina-ligasa (Der3p/Hrd1p) del citosol. Las glicoproteínas aberrantes son exportadas a través de la membrana del RER con sus azúcares adheridos, el retrotranslocón acomoda moléculas aún más grandes que el translocón, lo cual se lograría mediante rearreglos en sus unidades conformacionales.

### **Ubiquitinación y direccionamiento al proteosoma**

Las ubiquitinas, proteínas pequeñas y altamente conservadas, son añadidas por **enzimas-ubiquitinas** (E1, E2 y E3) a las proteínas aberrantes o que tienen que ser eliminadas por proteólisis citosólica en el proteosoma (ubiquitinación).

Las proteínas aberrantes que se encuentran presentes en el lumen de RER deben ser 'escoltadas' hacia la membrana y por lo menos parcialmente transportadas al citosol por factores adicionales antes de que la ubiquitinación se lleve a cabo. La selección del sustrato ocurre independientemente del sistema de ubiquitinas, que en este caso no confiere especificidad al proceso de degradación. El mecanismo que 'entrega' tales sustratos aberrantes desde el retranslocón (Htm1p, PDI, Sec61 o BiP) hasta las ubiquitinas para la subsiguiente ubiquitinación aún se desconoce.

Una vez ocurrida (o parcialmente ocurrida) la retrotranslocación desde el RER, casi todas las proteínas aberrantes son poliubiquitinadas (Figura 13D) antes de ser degradadas por el proteosoma (en eucariotes el proteosoma tiene un coeficiente de sedimentación de 26S, y se le conoce como proteosoma 26S para diferenciarlo del de procariones que es de 24S). En el citosol, la selección de sustratos para el sistema del proteosoma se encuentra mediada por las ubiquitinas-ligasas (E3) (Figura 13A). La poliubiquitinación proteica es un proceso dependiente de energía que involucra básicamente cuatro pasos: **1.** La ubiquitina, mediante su residuo de glicina C-terminal, se une por un enlace tio-éster a la enzima-activadora de ubiquitina (E1) (Figura 13A); este primer paso requiere de ATP. **2.** A continuación la ubiquitina es transferida a una de varias enzimas-conjugadoras de ubiquitinas (E2) mediante una esterificación trans-tiol. **3.** Posteriormente, la ubiquitina es transferida a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la proteína blanco que generalmente es facilitado por medio de una ubiquitina-ligasa (E3) (Figura 13C). Se ha encontrado que la enzima conjugadora de ubiquitinas E2 puede pasar la ubiquitina directamente a la ubiquitina ligasa E3 sin que tenga un sustrato para ser ubiquitinado (Figura 13C') y posteriormente la ubiquitina-ligasa E3-ubiquitina traspasa la ubiquitina al sustrato (Figura 13C''). **4.** La ubiquitina conjugada al sustrato (proteína aberrante) por sí sola sirve como sustrato de ubiquitinación y repetidas rondas llevan a la formación de la cadena poliubiquitinada (Figura 13D) sobre la proteína. En general, la ubiquitina K48 actúa como un receptor de conjugación y una cadena que contenga por lo menos cuatro ubiquitinas es requerida para la activación de la degradación por parte del proteosoma. Sin embargo, otros residuos de lisina también pueden aceptar ubiquitinas. La especificidad en el direccionamiento de las proteínas para ser degradadas por el proteosoma descansa sobre la peculiar interacción entre la E2 (de las cuales se encuentran pocas), la E3 (de las cuales se encuentran bastantes) y la proteína aberrante (Figura 13C). Sin embargo, existen casos excepcionales en los que la E2 es capaz de promover ubiquitinación en ausencia de E3.

Una vez que la proteína ha sido encaminada hacia el retrotranslocón, es necesario que exista una fuerza que empuje o que hale, dirigiendo de esta forma la proteína hacia el proteosoma. Es claro que la falta de poliubiquitinación no sólo previene la degradación proteica por parte del proteosoma, sino que también lleva a fallas en el transporte proteico, ya que se ha visto que la proteína, sin una adecuada ubiquitinación, pareciese 'resbalar-se' de nuevo hacia el lumen del RER, sugiriendo que la poliubiquitinación es necesaria para la retrotranslocación. La modificación de la proteína aberrante podría darse

cuando el N-terminal o el primer residuo de lisina se tornan asequibles para la maquinaria de ubiquitinación. Una poliubiquitinación progresiva podría servir como un mecanismo de remolque que mueve a la proteína desde el retrotranslocón hasta el citosol, donde las largas y 'estorbosas' cadenas de poliubiquitinas previenen que la proteína se deslice de nuevo hacia el RER.

Debido a que el proteosoma se ve inhibido por proteínas en estado glicosilado y las proteínas son retrotranslocadas hacia el citosol bajo dicho estado, una N-glicanasa debe actuar previo a la degradación proteica. De hecho, una enzima citoplasmática se ha visto implicada en la degradación proteosomal de glicoproteínas aberrantes exportadas desde el RER. Tal péptido, denominado mPng1 es un miembro de la superfamilia de las transglutaminasas, las cuales contienen una triada de aminoácidos (cisteína, histidina y ácido aspártico) supuestamente catalítica.

Finalmente, las proteínas poliubiquitinadas o con el direccionamiento para el proteosoma son llevadas al proteosoma para ser degradadas en pequeños péptidos (Figura 13E).

#### **Degradación por el proteosoma**

El proteosoma 26S es un complejo proteolítico que consiste de dos partes, la coraza 20S y la partícula reguladora 19S (Figura 13 Proteosoma). La coraza 20S es un cilindro compuesto de cuatro anillos apilados, cada uno de los cuales contiene siete diferentes subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  conformando una geometría general del tipo  $\alpha 7\beta 7 \beta 7\alpha 7$ . Los tres diferentes sitios activos se encuentran localizados al interior de la coraza cilíndrica dentro de los anillos que poseen subunidades  $\beta$  (Figura 13 Coraza). Extensio-

nes N-terminales de las subunidades  $\alpha$  externas regulan la entrada de sustratos a la coraza proteolítica. La partícula 19S se encuentra de lado y lado de la coraza y está involucrada en el reconocimiento, unión y desplegamiento de proteínas ubiquitinadas; además, se encuentra implicada en la regulación de la apertura de la coraza 20S. La partícula 19S está compuesta por 17 diferentes subunidades, funcionalmente divididas en dos partes: la base y la tapa. La base consiste de un anillo de seis ATPasas (Rpt1-Rpt6) que se acopla con los anillos  $\alpha$  de la coraza 20S y de tres subunidades (Rpn1, Rpn2 y Rpn3) que carecen de actividad ATPasa (Figura 13 Base). Se sabe que Rpt5 une al sustrato ubiquitinado, Rpt2 controla tanto la entrada del sustrato como la liberación del producto del cilindro 20S. La Rpn1 interactúa con dos proteínas (Rad23 y Dsk2) que poseen dominios tipo ubiquitina y que son capaces de unir y entregar el sustrato ubiquitinado al proteosoma. Al parecer, la Rpn10 también contribuye con la unión de cadenas de ubiquitina.

La tapa está compuesta por ocho subunidades Rpn (Figura 13 Tapa 11). La Rpn11 contiene un motivo con actividad metaloisopeptidasa altamente conservado que es necesaria para la desubiquitinación y proteólisis proteosomal de proteínas aberrantes. Se piensa que Rpn11 desubiquitina la proteína aberrante una vez ésta ha sido colocado en el cilindro 20S, lo cual resulta en un recogimiento irreversible hacia la proteólisis. Seguido de la liberación de la proteína dentro del proteosoma, la cadena de poliubiquitinas es hidrolizada a unidades de ubiquitina que pueden ahora tomar parte en una nueva ronda en la degradación proteica. Una vez la proteína es degradada del otro lado del proteosoma salen pequeños péptidos resultado de la proteólisis por parte del proteosoma (Figura 13).